UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMAURY CAMILO VALINOTE

**MONENSINA E LEVEDURA EM DIETAS COM ÓLEO
FORNECIDAS A TOUROS NELORES EM TERMINAÇÃO**

PIRASSUNUNGA – 2007

AMAURY CAMILO VALINOTE

**MONENSINA E LEVEDURA EM DIETAS COM ÓLEO
FORNECIDAS A TOUROS NELORE EM TERMINAÇÃO**

**Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Zootecnia.**

**Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal**

**Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Machado Nogueira Filho**

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

V173m

Valinote, Amaury Camilo

Monensina e levedura em dietas com óleo fornecidas a touros
Nelores em terminação. / Amaury Camilo Valinote –
Pirassununga, 2007.

71 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos – Universidade de São Paulo.

Departamento de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho.

Unitermos: 1. Ácidos graxos de cadeia longa
2. biohidrogenação 3. Ionóforos 4. Probióticos. I. Título.

Dedicatória

**Dedico este trabalho à minha
família, principais agentes do
meu sucesso.**

Agradecimentos

Agradeço à minha família e á Deus, pela vida, oportunidades, apoio, educação e tudo o que acontece em minha vida.

À Munique, meu porto seguro.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, professores, colegas e funcionários por tantos momentos, ensinamentos e auxílio prestados.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

À Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional Extremo Oeste, principalmente ao Dr. Alexandre Berndt, por fornecer os animais, estrutura e alimentação dos animais do confinamento e grande auxílio na execussão do projeto.

À Alltech pelo fornecimento da cultura de levedura.

Aos grandes amigos, de pós-graduação ou não, fundamentais para minha vida, e por mais que eu seja ausente sempre penso e torço por todos vocês.

Aos estagiários que deram duro na execução do projeto e muito me ensinaram.

Aos Professores Dr. Paulo Mazza da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e Dr. Ives Cláudio do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP, pelo auxílio durante o doutorado e pela participação e valiosas considerações na Qualificação.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho, que acreditou em mim desde o mestrado e sempre foi mais que um orientador, um amigo.

Ao Prof. Dr. Paulo Leme, grande mestre, amigo e exemplo. Espero poder ser um profissinal com pelo menos um pouco de sua competencia, ética, profissionalismo e carisma.

“Vão me perguntar sobre as razões por que escolhi o estômago da vaca e não do tigre como análogo ao da ciência. O tigre parece ser mais nobre, mais inteligente. A Esso escolheu o tigre como seu símbolo; jamais escolheria a vaca...Eu teria sido mais prudente, escolhendo a analogia do tigre, e não a da vaca, visto que ambos os estômagos conhecem apenas um tipo de comida. Mas há uma diferença. Não há nada que façamos com os produtos dos estômagos dos tigres. Mas daquilo que os estômagos das vacas produzem, os homens fazem uma série maravilhosa de produtos que contribuem para a vida e a cultura. Já imaginaram o que seria da culinária se não houvesse as vacas? Assim o estômago da ciência, com seus produtos infinitos, incontáveis, maravilhosos – se não fosse por eles eu já estaria morto –, mais se assemelha ao estômago das vacas que ao dos tigres.”

Rubem Alves

Resumo

VALINOTE, A.C. Monensina e levedura em dietas com óleo fornecidas a touros Nelores em terminação. 2007. XX f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o uso de monensina, levedura e a interação destes aditivos no metabolismo digestivo e desempenho de animais Nelores. Foram realizados dois experimentos. Experimento 1. Foram utilizados quatro novilhos Nelores com cânulas no rúmen e no duodeno para avaliar a degradabilidade, digestibilidade, biohidrogenação, microrganismos ruminais e emissão de metano quando fornecidos monensina e/ou levedura na dieta contendo óleo de girassol em experimento quadrado latino e arranjo fatorial 2x2. Os tratamentos consistiram em com e sem levedura e com e sem monensina. A levedura utilizada foi a *Sacharomyces cerevisiae* cepa 1026. As variáveis estudadas foram degradabilidade *in situ*, digestibilidade *in vivo* avaliada pelo método de indicador interno FDNi, pH, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta do rúmen, protozoários ciliados, biohidrogenação ruminal, e estimativa do número das bactérias *Anaerovibrio lipolyica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Megasphaera elsdenii*, por PCR em tempo real. Experimento 2. Foi realizado ensaio para avaliar o desempenho e características de carcaça e carne de touros Nelores utilizando os aditivos supracitados. Foram utilizados cinquenta e dois touros Nelores com aproximadamente 233kg em delineamento em blocos ao acaso. O fornecimento de monensina reduziu o número de protozoários ciliados no rúmen, aumentou a eficiência alimentar e a porcentagem de C18:1 trans10-11 e de C18:2 t11c15 na carne. O uso de levedura aumentou a degradabilidade efetiva da MS, o NDT da dieta, os protozoários ciliados, o pH ruminal, a expressão relativa da bactéria *B. fibrisolvens*, a ingestão de MS dos animais confinados, os ácidos graxos insaturados no conteúdo duodenal e os ácidos graxos saturados na carne, e reduziu a eficiência alimentar, os ácidos graxos saturados no conteúdo duodenal e os ácidos graxos insaturados na carne. Houve interação para a digestibilidade da FDN, ingestão de matéria seca por quilo de peso metabólico, espessura de gordura subcutânea, e ácidos graxos insaturados na carne. O uso de monensina em dieta com óleo foi eficiente para melhora na conversão alimentar. A utilização de cultura de levedura mesmo em dieta com óleo favoreceu os microrganismos ruminais e a energia da dieta.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia longa, biohidrogenação, ionóforos, probióticos.

Abstract

VALINOTE, A.C. Monensin e yeast on oil diets fed to Nellore finishing bulls. 2007. XX f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

This work had the objective of evaluate the use of monensin, yeast and the interaction of these additives on Nellore digestive metabolism and performance. It were conducted two trials. Experiment 1. It were utilized four Nellore steers with rumen and duodenum cannulas to evaluate the diet degradability, digestibility, biohydrogenation, rumen microorganisms and methane emission when supplied monensin and/or yeast on the diet with sunflower oil in a latin square desing and a 2x2 fatorial arrangement. The treatments were with and without yeast and with and without monensin. The yeast utilized was the *Sacharomyces cerevisiae* 1026 strain. The variables studied were in situ degradability, in vivo digestibility evaluated by indicator method NDFi, pH, ammonia nitrogen and rumen short chain fatty acid, ciliate protozoa, biohydrogenation, and estimative of bactéria *Anaerovibrio lipolyica*, *Butyrvibrio fibrisolvens* e *Megasphaera elsdenii*, by real time PCR. Experiment 2. A trial was realized to evaluate the performance and carcass and meat characteristics of Nellore steers utilizing the additives above. It were utilized fifthty two Nellore bulls with 233kg live weight average in a random blocks design. The monensin supplied decreased the protozoa number, the relative efficiency of *B. fibrosolvens*, increased feed efficiency and the percentage of C18:1 trans10-11 and C18:2 t11c15 in the meat. The use of yeast increased the effective degradability of DM, the TDN, ciliate protozoa, rumen pH, DM intake, unsaturated fatty acid on the duodenal content, and the saturated fatty acid in the meat, and decreased the feed efficiency, saturated fatty acid on the duodenum content and the unsaturated fatty acid of the meat. There were interaction effect to NDF digestibility, dry matter intake per kg of metabolic weight, fat thickness, and unsaturated fatty acid in the meat. The use of monensin was efficient to get the feed efficiency better. The utilization of yeast culture, even in a oil diet, was favorable to rumen microorganisms and the diet energy.

Key-words: biohydrogenation, ionophores, long chain fatty acid, probiotics.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	2
3	Revisão de Literatura	3
3.1	Gordura bovina.....	3
3.2	Ácido linoléico conjugado.....	4
3.3	Microingredientes na alimentação de ruminantes	6
3.3.1	Antibióticos.....	6
3.3.2	Probióticos	8
4	Material e Métodos	10
4.1	Ensaio de Metabolismo	10
4.1.1	Local	10
4.1.2	Animais e Alimentação.....	10
4.1.3	Análises	11
4.1.4	Análises estatísticas.....	26
4.2	Ensaio de desempenho.....	27
4.2.1	Local	27
4.2.2	Animais e Alimentação.....	27
4.2.3	Medidas e Análises	28
4.2.4	Análises estatísticas.....	30
5	Resultados e Discussão	32
5.1	Ensaio de Metabolismo	32
5.1.1	Degradabilidade	32
5.1.2	Digestibilidade.....	33
5.1.3	Cinética líquida.....	35
5.1.4	Fermentação	35
5.1.5	Protozoários ciliados	37
5.1.6	Bactérias ruminais.....	39
5.1.7	Metano	40
5.1.8	Biohidrogenação	40
5.2	Ensaio de Desempenho	44
5.2.1	Desempenho em confinamento	44
5.2.2	Características das carcaças	45

5.2.3	Características da carne	47
6	Conclusões.....	51
7	Referências Bibliográficas	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Degradabilidade da MS e FDN de dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes, fornecidos a novilhos Nelore.	32
Tabela 2 – Digestibilidade da MS e nutrientes, e NDT de dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes, fornecidos a novilhos Nelore.	34
Tabela 3 – Cinética líquida ruminal de novilhos Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	35
Tabela 4 – Resultados de fermentação ruminal e protozoários ciliados em novilhos Neloires alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	36
Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos do conteúdo duodenal de novilhos Neloires alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes.	42
Tabela 6 – Dados de desempenho dos touros Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	44
Tabela 7 – Características de carcaça de touros Neloires alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	46
Tabela 8 – Composição corporal de touros Neloires alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	47
Tabela 9 – Características da carne de touros Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.	47
Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos na carne de novilhos Neloires alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes.	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Dieta experimental.....	10
Quadro 2 – Sequência de <i>primers</i> , temperatura de anelamento e tamanhos dos fragmentos das bactérias <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> e <i>Megasphaera elsdenii</i>	22
Quadro 3 – Componentes utilizados para a PCR em tempo real para avaliação da especificidade e da quantidade relativa da amplificação dos <i>primers</i> das bactérias <i>Universal</i> , <i>Butirovibrio fibrosolvens</i> e <i>Megasphaera elsdenii</i>	23
Quadro 4 – Espécies de <i>Entodinium</i> identificadas no rúmen de bovinos alimentados com microingredientes e óleo de girassol.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Animal com cabresto e canga coletores para mensuração da emissão de metano.....	14
Figura 2 – Seqüência de extração de DNA pelo kit QIAamp® Stool.....	21
Figura 3 – Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos <i>primers</i> das bactérias universal, <i>Butyrivibrio fibrosolvens</i> e <i>Megasphaera elsdenii</i>	24
Figura 4 – Exemplo da determinação da eficiência das reações de PCR em tempo real para a bactéria Universal, utilizando o programa LinRegPCR: determinação dos limites superior e inferior (a), alta correlação (r^2) das amostras (b) e presença mínima de 3 pontos na curva de regressão (c). 25	
Figura 5 – Animais do experimento de confinamento contidos em baias individuais.	27
Figura 6 – Expressão relativa da bactéria <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> do conteúdo ruminal de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes. * Efeito significativo em relação ao controle ($p<0,05$).....	39
Figura 7 – Expressao relativa da bactéria <i>Megasphaera elsdenii</i> do conteúdo ruminal de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes. *Efeito significativo em relação ao controle ($p=0,143$).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Fração Rapidamente Solúvel
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ALC	Ácido Linoléico Conjugado
b	Fração Degradável
BAGI	Biohidrogenação dos Ácidos Graxos Insaturados 18 C
c	Taxa Horária de Degradação da Fração Potencialmente Degradável
CH ₄	Gás Metano
CL	Cultura de Leveduras
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
CT	Carboidratos Totais
CVz	Corpo Vazio
Def	Degradabilidade Efetiva
DMS	Degradabilidade da Matéria Seca
DMS	Digestibilidade da Matéria Seca
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
e	log natural de “-ct”
EA	Eficiência Alimentar
EE	Extrato Etéreo
EPM	Erro Padrão da Média
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDNcp	Fibra em Detergente Neutro Livre de Cinzas e Proteína
FDNi	Fibra em Detergente Neutro Indigestível
GMD	Ganho Médio Diário
iA	Indicador no Alimento
iF	Indicador nas Fezes
IMS	Ingestão de Matéria Seca
IMS/kg ^{0,75}	Ingestão de Matéria Seca por kg de Peso Metabólico
K	Taxa de Passagem Ruminal por Hora
MS	Matéria Seca
NA	Nutrientes no Alimento

NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
NF	Nutriente nas Fezes
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
PB	Proteína Bruta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCVz	Peso Corporal Vazio
Pf	Pesagem Final
Pi	Pesagem Inicial
PPC	Perda por Cozimento
PVj	Peso Vivo em Jejum
SAI	Peso do Saco Antes da Incubação Ruminal
SF ₆	Hexafluoreto de Enxofre
SPI	Peso do Saco Após a Incubação Ruminal
SV	Peso do Saco Vazio
T	Tempo de Incubação
TD	Total de Ácidos Graxos18 C na Digesta Duodenal
TDI:	Total de Ácidos Graxos18 C Insaturados na Digesta Duodenal
TI	Total de Ácidos Graxos18 C Ingeridos
TII	Total de Ácidos Graxos18 C Insaturados Ingeridos

1 INTRODUÇÃO

Além de ser um dos produtos que leva o Brasil ao patamar de maior rebanho comercial e exportador do mundo, a carne bovina é preferência nacional. O produto, além de preço competitivo, possui alto valor nutricional e boa aceitação pela população. Os consumidores estrangeiros também têm apreço pela carne bovina, sendo que alguns mercados têm aumentado a demanda pelo produto como, por exemplo, a China.

No entanto, há fatores que favorecem perdas de mercado. Uma propaganda que prejudica a imagem da carne bovina e reduz o crescimento do consumo é o da qualidade da gordura. Esta é composta em média de 50% de ácidos graxos saturados e apresentam isômeros monoinsaturados *trans*, que são associados principalmente a problemas cardiovasculares. Em atenção a isto, pesquisadores têm procurado artifícios para aumentar a quantidade de ácidos graxos insaturados na carne. Outro componente de interesse é o ácido linoléico conjugado (ALC), um conjunto de isômeros produzidos em maior parte pelos ruminantes. Esse composto promoveu, em pesquisas, efeitos benéficos no combate à aterosclerose, câncer, diabetes, entre outros.

A estratégia para aumentar a concentração desses produtos na carne bovina é tentar manipular a biohidrogenação, evento que ocorre no rúmen responsável pela hidrogenação dos ácidos graxos insaturados da dieta que resulta em maior concentração de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans*, e principal via de produção do ALC.

Produtos com objetivo de modificar a população microbiana e conseqüentemente as reações que ocorrem no rúmen têm sido desenvolvidos ou adaptados às dietas de ruminantes, onde os antibióticos e os probióticos são os mais utilizados. Pouco se sabe sobre o efeito desses microingredientes em dietas formuladas com óleos ou lipídeos insaturados *in vivo*.

No entanto, acredita-se que o uso de microingredientes em dietas contendo óleo com alta concentração de ácidos graxos insaturados para bovinos confinados pode alterar o perfil lipídico da carne.

O objetivo deste trabalho foi estudar o uso de monensina e/ou levedura em dieta com óleo de girassol fornecida a bovinos confinados.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da monensina e/ou cultura de levedura em dietas com óleo de girassol fornecidas a bovinos confinados nos seguintes parâmetros:

- Degradação, fermentação e cinética líquida ruminal;
- Identificação e contagem dos microrganismos ruminais;
- Emissão de metano;
- Digestibilidade;
- Desempenho;
- Características de carcaça e;
- Perfil lipídico da carne.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Mesmo sendo a carne bovina um alimento rico em nutrientes, algumas propagandas têm afetado a imagem do produto de forma negativa devido à associação dos ácidos graxos saturados e colesterol com doenças cardiovasculares. Embora existam controvérsias em relação a essa associação (Taubes, 2001), sabe-se que há quem opte por evitar o consumo desta carne por esta justificativa.

3.1 Gordura bovina

A composição da gordura da carne bovina é de aproximadamente 50% de ácidos graxos saturados e 50% de ácidos graxos insaturados, sendo destes a maioria monoinsaturados. Uma das principais causas desse fato é um conjunto de reações que ocorre no rúmen chamado biohidrogenação, onde há, como sugerido pelo nome, a hidrogenação dos ácidos graxos de cadeia longa insaturados através de enzimas microbianas (Jenkins, 1993). Como os ácidos linoléico e linolênico são os mais representativos entre os insaturados na dieta de ruminantes, há maior atenção a estes compostos.

Os lipídios, ao chegarem ao rúmen, são desesterificados por lipases extracelulares bacterianas (Bauman & Lock, 2006). Até o momento acredita-se que o papel de protozoários ciliados e fungos nesta atividade é pequeno ou insignificante (Bauman & Lock, 2006). Este processo, denominado lipólise, é requisito para que ocorra posterior hidrogenação dos ácidos graxos insaturados, pois para que estes sofram ação das isomerases e redutases microbianas é necessário que estejam na forma livre.

A lipólise tem sido caracterizada principalmente a duas bactérias, a *Anaerovibrio lipolytica*, que atua nos triglicerídeos, e a *Butyrivibrio fibrisolvens*, que hidrolisa fosfolipídeos e glicolipídeos (Harfoot & Hazlewood, 1997).

Logo após a lipólise inicia-se a hidrogenação propriamente dita. Há a isomerização de uma ligação *cis* a *trans*, (por exemplo *cis*-12 a *trans*-11) resultando em ácido graxo dienóico conjugado ou ácido graxo trienóico conjugado, quando o ácido graxo inicial é o ácido linoléico ou linolênico respectivamente. No momento seguinte, há a redução da ligação *cis*, do dieno

conjugado, formando o ácido vacênico no exemplo citado (C18:1 *trans*-11), com posterior redução a ácido esteárico (C18:0). Esta última, geralmente, é limitada, ocorrendo acumulação de ácidos graxos *trans* no rúmen (Bauman & Lock, 2006).

No caso do trieno conjugado, há uma redução da outra ligação *cis*, formando outro dieno conjugado (ex. *trans*-11, *cis*-13) e posterior redução até ácido vacênico.

O ácido graxo dieno conjugado, formado durante a biohidrogenação é denominado de ácido linoléico conjugado (ALC), havendo vários isômeros possíveis que recebem a mesma denominação, onde o principal é o *cis*-9, *trans*-11, conhecido como ácido rumênico, por ser a maior produção e concentração deste ácido encontradas no rúmen (Bauman & Lock, 2006).

Pouco se sabe com relação ao complexo enzimático envolvido na biohidrogenação, assim como sobre as respectivas bactérias. A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* produz isomerase específica para o complexo dieno *cis*-9, *cis*-12 (Bauman & Lock, 2006). Já a bactéria *Megasphaera elsdenii*, produz principalmente o isômero *trans*-10, *cis*-12, quando incubada com ácido linoléico, enquanto a maioria das espécies bacterianas produz o ácido rumênico (Kim et al., 2002).

Após o rúmen, os lipídios passam pelo abomaso e chegam ao intestino, onde são digeridos e absorvidos. Esta etapa da digestão dos ruminantes é semelhante à digestão lipídica de outras espécies. No intestino, os lipídeos e ácidos graxos livres sofrem ação de enzimas, sendo as principais, lipase pancreática, fosfolipase A₂ e colesterol esterase, que auxiliam na absorção intestinal. Após absorção, os lipídios são transportados para os tecidos periféricos através de lipoproteínas e quilomicron (Bauchart, 1993).

3.2 Ácido linoléico conjugado

Em alguns estudos, foram verificadas respostas positivas do ALC em relação à saúde humana, por exemplo, no combate a alguns tipos de câncer em humanos (Parodi, 2004; Bauman & Lock, 2006). Estes resultados são justificativas para atenção a este produto, cuja principal fonte é a gordura de ruminantes, por causa da biohidrogenação. Além disso, há indícios de que o

ALC possa atuar como antioxidante, aumentando a vida de prateleira da carne (Park et al. 1997, apud Mir et al. 2003).

Há outra via de produção de ALC, endógena, através da enzima Δ^9 -dessaturase, utilizando o ácido vacênico (Bauman & Lock, 2006). Esta desaturação também ocorre em humanos. Turpeinen et al. (2002) verificaram que a ingestão de ácido vacênico por humanos contribui para o aumento da quantidade de ALC disponível para o organismo. Os tecidos de ruminantes que possuem atividade substancial da Δ^9 -dessaturase são a glândula mamária, tecido adiposo e epitélio intestinal (Bauman et al., 2003).

Assim sendo, o aumento da concentração deste ácido, que também é produto intermediário da biohidrogenação, é interessante.

Desta forma, estudos têm sido conduzidos a fim de aumentar a concentração desses ácidos graxos na carcaça bovina, seja através do fornecimento de ALC protegido da biohidrogenação, ou pela manipulação da dieta visando alterar ou controlar a biohidrogenação. Esta sofre influência de inúmeros fatores, sendo a dieta o mais importante. Já foi comprovado que o fornecimento de óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados pode reduzir a lipólise e a biohidrogenação (Beam et al., 2000), resultando em maior quantidade de ácidos graxos insaturados e isômeros do linoléico para absorção e deposição na carcaça.

O óleo de girassol é rico em ácidos graxos insaturados, principalmente o linoléico, sendo seu fornecimento benéfico no aumento da concentração de ALC na carne bovina (Mir et al., 2002; Mir et al., 2003; Dhiman et al., 2005).

Não faz parte da dieta convencional de ruminantes altas concentrações de lipídios, sendo que o valor médio encontrado não superior de 4% de EE (Van Soest, 1994). Inicialmente o fornecimento de lipídeos na forma de gordura ou óleo tinha o objetivo de aumentar a densidade energética da dieta sem precisar aumentar a concentração de grãos. O fornecimento de altas quantidades de concentrado pode prejudicar o desempenho, pois aumenta a concentração de açúcares, gerando redução no pH ruminal e favorecendo distúrbios, como acidose e laminite (Palmquist et al., 1993). Em trabalho utilizando fontes de lipídeos vegetal ou animal, Brant & Anderson (1990) encontraram melhora no desempenho de bovinos em confinamento recebendo dietas com alto teor de concentrado.

Outra vantagem na utilização de lipídeos é a redução na produção de metano (Beauchemin, 2006), principalmente devido à atual preocupação com o meio ambiente, além da melhora no metabolismo energético pela diminuição da produção deste gás (Johnson & Johnson, 1995).

Embora haja justificativa para o uso de lipídeos na dieta de ruminantes, estes possuem propriedades não desejadas nutricionalmente. Quando existem ácidos graxos insaturados na composição do lipídeo, têm-se prejuízos na degradação da dieta, pois estes são tóxicos aos microrganismos ruminais, principalmente bactérias e protozoários. Outro fato é que os lipídeos recobrem a superfície do alimento não permitindo que as enzimas microbianas exerçam sua função em degradar o substrato (Jenkins, 1993). Esse problema afeta principalmente dietas com quantidades intermediárias a altas de volumoso, uma vez que os microrganismos sensíveis aos ácidos graxos, em sua maioria, são os fibrolíticos. O mecanismo de proteção dos microrganismos contra esse efeito dos ácidos graxos insaturados é a biohidrogenação (Jenkins, 1993).

Sendo a biohidrogenação fruto da atividade microbiana, a manipulação desta população pode variar a quantidade e qualidade de ácidos graxos que chegam ao intestino. Há vários mecanismos a fim de se modificar a atividade microbiana ruminal, sendo que um dos mais utilizados é a adição de microingredientes na dieta dos animais.

3.3 Microingredientes na alimentação de ruminantes

Os microingredientes são ingredientes que entram em pequenas quantidades na composição das dietas. Geralmente são produtos adicionados na ração com o intuito de modificar a microbiota gastrointestinal, principalmente na forma de antibiótico, probiótico ou prebiótico.

3.3.1 Antibióticos

O antibiótico mais utilizado na nutrição de ruminantes é a monensina sódica. Esta é um antibiótico ionóforo que age, principalmente, contra bactérias gram-positivas e protozoários ciliados.

Os ionóforos são uma classe de antibióticos lipofílicos que têm a capacidade de penetrar à membrana das células, alterando seu fluxo de íons.

No caso da monensina esse efeito ocorre através de um complexo ionóforo-íon, que age como barreira seletiva de íons (Ipharraguerre & Clarck, 2003).

A monensina tem especificidade por cátions específicos, tendo maior afinidade pelo Na, mas com capacidade de se ligar também ao K⁺ e Rb⁺. Desta forma, o ionóforo age aumentando a atividade da bomba Na/K e H⁺-ATPase para manter o balanço iônico e o pH intracelular. O desgaste energético gerado por este aumento da atividade do fluxo iônico chega a comprometer as funções microbianas de crescimento e reprodução. As bactérias gram-positivas, por terem membrana menos complexa que as gram-negativas, são mais susceptíveis aos efeitos do ionóforo (Ipharraguerre & Clarck, 2003).

Dentre vários fatores, a interação entre alimentos é um importante fator no efeito da monensina.

Segundo McIntosh et al. (2003) o uso de óleos essenciais inibe a atividade de bactérias sensíveis à monensina. Por outro lado, Van Nevel & Demeyer (1995) reportaram que alguns microrganismos gram-negativos, grupo onde estão os principais responsáveis pela lipólise e hidrogenação, modificam sua atividade na presença de monensina.

Desta forma, em estudos *in vitro* detectou-se redução da lipólise (Van Nevel & Demeyer, 1995) e da biohidrogenação (Fellner et al., 1997) quando se adicionava monensina em culturas com óleos vegetais. Kobayashi et al. (1992) verificaram maior concentração de ácidos graxos de cadeia longa insaturados no duodeno de ovelhas alimentadas com salinomicina comparadas com controle.

Fellner et al. (1997) avaliaram o efeito de monensina, nigericina e tetronasina na biohidrogenação *in vitro* do ácido linoléico, e verificaram que os antibióticos foram eficientes em reduzir a biohidrogenação, reduzindo a concentração de ácido esteárico, e aumentando a concentração de ácido oléico, ácido linoléico intacto e ALC.

Nesta revisão, poucos trabalhos foram encontrados com o propósito de avaliar o efeito de ionóforos na alimentação de ruminantes *in vivo* sobre o perfil lipídico do produto final. Marmer et al. (1985) forneceram monensina a animais alimentados apenas com forragem e observaram que esses animais apresentaram menores concentrações de ácidos graxos saturados nos tecidos, comparados aos animais controle. Em trabalho recente, Bell et al. (2006)

verificaram aumento na quantidade de ALC na gordura do leite de vacas alimentadas com óleo de açafrão (*safflower*) e monensina. Desta forma acredita-se que o uso de óleo com alta concentração de ácidos graxos insaturados e monensina poderiam aumentar a concentração de ALC e ácidos graxos insaturados na gordura da carne bovina.

Por outro lado, com a decisão da União Européia de abolir o uso de antibióticos na nutrição de ruminantes, aumentou o interesse por aditivos considerados “naturais”, como exemplo, os probióticos.

3.3.2 Probióticos

Define-se como probióticos, culturas de microrganismos vivos ou seus extratos, que melhoram o balanço microbiano intestinal (Martin & Nisbet, 1992). Em ruminantes poderia ser adicionada à definição a melhoria da população ruminal.

A cultura de leveduras vivas (CL) é o probiótico de maior interesse na pesquisa em nutrição de ruminantes, sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* uma das mais estudadas pelo benefício que provoca na digestão animal.

O modo de ação da CL no rúmen ainda não está nitidamente elucidado. Wallace (1994), em revisão sobre o assunto, sugeriu que a adição da levedura auxilia na remoção do oxigênio do rúmen, proporcionando melhor viabilidade dos microrganismos ruminais, principalmente os celulolíticos, promovendo maior estabilidade de pH através na redução da concentração de ácido láctico, aumento na degradação da fibra e no fluxo de microrganismos para o abomaso, refletindo em aumento da ingestão e desempenho.

Newbold et al. (1996) verificaram que realmente o uso de cultura de levedura reduz a concentração de oxigênio no conteúdo ruminal, aumentando assim o número de microrganismos no rúmen.

Outra hipótese para ação da levedura no rúmen é que a cultura de levedura estimula o crescimento de bactérias utilizadoras de lactato através da presença de altas concentrações de ácidos dicarboxílicos em seu conteúdo, principalmente ácido málico (Nisbet & Martin, 1991), no entanto o estudo de Newbold et al. (1996) não comprovou esta teoria.

As respostas tanto no metabolismo ruminal quanto no desempenho de ruminantes alimentados com CL variam, e muitas vezes são contraditórios. Sabe-se, portanto, que as respostas dos animais quando recebem esse aditivo é influenciada pela composição da dieta (Wallace & Newbold, 1993; Moloney & Drennan, 1994; Reverdin et al., 1996).

Alguns estudos foram conduzidos avaliando efeito de próbióticos e lipídeos, mas não foi encontrada interação entre os alimentos para digestão do trato total e crescimento microbiano (Firkins et al., 1990) e para produção de leite, digestibilidade, fermentação ruminal e redução de estresse térmico, (Bertrand & Grimes, 1997).

Não foi possível encontrar na literatura, trabalhos que tenham analisado o efeito de cultura de levedura sobre a biohidrogenação e sobre o perfil lipídico da carne.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo foram realizados dois ensaios, um avaliando a fisiologia da digestão, que será denominado de ensaio de metabolismo, e outro de desempenho.

4.1 Ensaio de Metabolismo

4.1.1 Local

Este experimento foi conduzido nas instalações do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

4.1.2 Animais e Alimentação

Foram utilizados quatro novilhos Nelores, com fístulas e cânulas no rúmen e duodeno e peso médio de 280 ± 20 kg alojados em galpão experimental, contidos por cabrestos e correntes, com cochos individuais, em delineamento experimental Quadrado Latino.

A alimentação foi fornecida diariamente pela manhã, sendo o ajuste do alimento oferecido calculado de acordo com as sobras. Procurou-se manter sobra no cocho de 5% do oferecido para evitar que a seleção da dieta influenciasse os resultados.

A dieta oferecida foi a mesma para todos os animais (Tabela 1).

Quadro 1 – Dieta experimental.

Ingredientes	%MS
Silagem de milho	40,46
Grão de milho moído	27,88
Farelo proteinoso de milho ⁽¹⁾	23,60
Farelo de algodão	3,55
Óleo de girassol	3,00
Calcáreo	0,90
Sal mineral	0,60
Nutrientes ⁽²⁾	

Matéria seca	66,16
Proteína bruta	13,54
Extrato etéreo	5,85
Fibra em detergente neutro	42,43
Carboidratos totais	75,03
Carboidratos não fibrosos	32,60
Cinzas	5,58
NDT ⁽³⁾	76,28

⁽¹⁾ Refinazil[®]. ⁽²⁾ Nutrientes calculados através de análises de laboratório, expressos em base seca. ⁽²⁾ Estimado pelo programa computacional RLM 2.0[®].

Os tratamentos experimentais foram divididos em quatro, distribuídos em arranjo fatorial 2x2, com e sem monensina e com e sem cultura de levedura.

Os tratamentos em detalhes foram:

Controle: sem aditivos;

Monensina: 0,03g/kg MS oferecida;

Levedura: 0,6g/kg MS oferecida;

Monensina+Levedura: combinação dos tratamentos com monensina e com levedura.

A monensina sódica utilizada foi o produto Rumensin[®] (Elanco Products Co., Greenfield, IN) e a cultura de levedura o produto Yea Sacc1026[®] (Alltech Inc., Lexington, KY).

Cada tratamento foi preparado misturando cada aditivo à fubá de milho e a mistura foi fornecida aos animais junto com a alimentação, de acordo com a ingestão dos animais.

Cada período experimental do Quadrado Latino foi dividido em dois subperíodos, um de 10 dias de adaptação aos tratamentos e outro de 14 dias de colheitas.

4.1.3 Análises

Foram avaliados neste ensaio, a degradabilidade e digestibilidade da dieta, a fermentação, biohidrogenação, microrganismos e cinética líquida ruminais, e a emissão de metano.

As análises bromatológicas foram realizadas de acordo com Silva & Queiroz (2002). O cálculo de carboidratos totais foi realizado de acordo com

Sniffen et al. (1992), onde $CT=100-(\%PB+\%EE+\%cinzas)$. Os carboidratos não fibrosos foram calculados de acordo com a fórmula $CNF=CT-FDN_{cp}$, onde FDN_{cp} é o FDN livre de cinzas e proteína.

Degradabilidade ruminal

Foi mensurada a degradabilidade ruminal da matéria seca da dieta total. A degradabilidade foi realizada *in situ*, utilizando sacos de náilon medindo 7 x 14 cm com poros com 50 micrômetros. Para cada saco foi adicionado 6 g de amostra da dieta total, respeitando 0,06g/cm² de saco de náilon. A amostra foi preparada homogeneizando as frações do volumoso e do concentrado em saco plástico. Os alimentos foram secos em estufa com ventilação forçada à 65°C durante 72 horas e moídas em moinho com peneira com orifícios de 2mm.

As amostras nos sacos de náilon foram incubadas durante 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas no rúmen dos animais. Para o horário 0 horas, para cálculo da fração degradável prontamente solúvel, incubou-se amostra no rúmen dos animais por 15 minutos. Após as incubações, os sacos foram lavados em água corrente até que água se apresentasse límpida.

Após as lavagens, os sacos foram secos em estufa com ventilação forçada a 65°C por 72 horas e, então, acondicionados em tubos de plástico para posterior análise de MS e FDN.

O percentual da degradabilidade de matéria seca foi calculado pela fórmula:

$$DMS\% = \left(1 - \frac{SPI - SV}{SAI - SV}\right) \times 100$$

Onde:

DMS% = percentual de degradabilidade da MS;

SPI = peso do saco após a incubação ruminal;

SAI = peso do saco antes da incubação ruminal;

SV = peso do saco vazio.

O cálculo do percentual de degradabilidade de FDN foi calculado através da fórmula acima, sendo as diferenças (SPI-SV) e (SAI-SV) multiplicadas pelas respectivas porcentagens de FDN.

Os dados de degradabilidade foram ajustados pelo modelo de Ørskov e McDonald (1979), conforme equação:

$$p = a + b(1 - e^{-ct})$$

Onde:

p = é a quantidade degradada no tempo "t";

a = é a interseção da curva no tempo zero;

b = é a fração potencialmente degradável;

c = é a taxa horária de degradação da fração potencialmente degradável;

e = o log natural de "-ct".

t = tempo

As constantes a, b e c foram utilizadas para cálculos da degradabilidade potencial e degradabilidade efetiva conforme equação de Ørskov, Hovevell e Mould (1980):

$$DEf = a + \frac{b \times c}{c + k}$$

Onde:

DEf = representa a taxa de degradabilidade efetiva;

a = é a interseção da curva no tempo zero, a fração rapidamente solúvel;

b = é a fração potencialmente degradável;

c = é a taxa horária de degradação da fração potencialmente degradável;

k = é a taxa de saída do rúmen por hora.

A taxa de saída do rúmen (k) utilizada foi igual a 5%.

Emissão de metano

A emissão de metano foi estimada através da técnica proposta por Primavesi et al. (2004) adaptada, utilizando como indicador o gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆).

Dez tubos de permeação contendo SF₆ foram mantidos em banho-maria e foi medida a taxa de liberação do indicador por pesagens dos tubos durante

cinco semanas. Foram escolhidos os quatro tubos que tiveram emissão aproximada de 2000 ng/min, sendo que foi direcionado um tubo por animal.

Realizou-se colheita de material para análise da emissão de metano dos cinco primeiros dias do período de colheita. Para amostragem, utilizou-se de aparato tipo canga coletora-armazenadora, que eram trocadas diariamente pela manhã, antes da alimentação dos animais. Essas cangas eram despressurizadas até a pressão de aproximadamente zero, acopladas a cabrestos que continham tubo capilar de aço inoxidável com 0,127 mm de diâmetro interno, que controlavam a pressão das cangas (Figura 1).

Figura 1 – Animal com cabresto e canga coletores para mensuração da emissão de metano.

As concentrações de CH_4 e SF_6 foram determinadas em cromatógrafo a gás HP6890, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna megabore (0,53 μm , 30 m) Plot HP-Al/M (para CH_4) e detector de captura de elétrons ($\mu\text{-ECD}$) e coluna megabore HP-MolSiv (para SF_6), com dois *loops* de 0,5 cm^3 acoplados a duas válvulas de seis vias. Foi realizada pressurização das cangas até atingir uma pressão aproximada de 1,2 atm utilizando nitrogênio especial 5.0, com as leituras de pressão feitas em medidor digital ($\pm 0,01$). As

curvas de calibração foram estabelecidas utilizando-se padrões de gases certificados pela White Martins (Praxair), com concentração em ppt (34 ± 9 , 91 ± 9 e 978 ± 98 ppt) para SF_6 e em ppm (4,85 e 20 ppm) para CH_4 , conforme Westberg et al. (1998).

Foi realizado o cálculo da emissão de metano de acordo com Primavesi et al., (2004).

Digestibilidade “in situ”

Utilizou-se o método de estimativa de digestibilidade pelo indicador FDN indigestível.

Foram realizadas colheitas de alimentos, sobras e fezes durante quatro dias consecutivos nos horários:

dia 6 – 8:00 e 14:00 h;

dia 7 – 9:00 e 15:00 h;

dia 8 – 11:00 e 17:00 h;

dia 9 – 12:00 e 18:00 h.

As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da análise.

Alíquotas do alimento, sobras e das fezes foram separadas para determinação de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). O procedimento foi *in situ*, utilizando os mesmos animais fistulados, alimentados com dieta a base de cana-de-açúcar. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada à 60°C por 72 horas. Posteriormente foram moídas em moinho com peneira com poros de 2mm. Para cada amostra de fezes foram retiradas duas alíquotas de 5g e de alimento, dez alíquotas de 5g. Cada uma foi colocada em saco de náilon, que foi posteriormente incubado no rúmen dos animais por 144 horas. Após incubação os sacos de náilon foram lavados em água corrente por mais ou menos 30 minutos, até que a água de lavagem estivesse clara como a água que saía da torneira. Logo após, eram levados à estufa com ventilação forçada à 60°C onde permaneciam por 72 horas.

O resíduo da incubação foi utilizado para determinação de FDN de acordo com Silva & Queiroz (2005), sendo este resultado considerado FDNi.

O cálculo da digestibilidade da MS foi realizado segundo fórmula:

$$DMS(\%) = 100 - \left[\left(\frac{\%iA}{\%iF} \right) \times 100 \right]$$

Onde:

DMS(%): digestibilidade da matéria seca em porcentagem,

%iA: porcentagem do indicador no alimento,

%iF: porcentagem do indicador nas fezes.

Para cálculo da digestibilidade dos nutrientes utilizou-se a seguinte fórmula:

$$DMS(\%) = 100 - \left[\left(\frac{\%iA \times \%NF}{\%iF \times \%NA} \right) \times 100 \right]$$

Onde:

DMS(%): digestibilidade da matéria seca em porcentagem,

%iA: porcentagem do indicador no alimento,

%NF: nutriente nas fezes em porcentagem,

%iF: porcentagem do indicador nas fezes,

%NA: nutriente no alimento em porcentagem.

Biohidrogenação ruminal

Para cálculo da biohidrogenação, foram colhidas amostras de conteúdo duodenal nos mesmos horários das colheitas de fezes, na quantidade de 250mL por amostra.

Realizou-se análise do perfil de ácidos graxos dos alimentos fornecidos, sobras e conteúdo duodenal.

A extração dos lipídios das amostras de conteúdo ruminal, duodenal e alimentar foi realizada utilizando-se metodologia de Hara e Radin (1978) adaptada. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 28 mL de solução de hexano/isopropanol (3:2); v/v e homogeneizadas (Polytron) durante 1 minuto, filtradas sob vácuo com filtro de papel, adicionadas de solução de sulfato de sódio (67 g/L) até 50% do volume do filtrado e agitadas em vortex por 30 segundos. A camada sobrenadante foi transferida para tubo contendo 2 g de sulfato de sódio, seguido de insuflação de N₂ e descanso por 30 minutos. Logo após, o líquido foi transferido para frascos de 10 mL, insuflado N₂, vedado com tampa e mantido à -20°C até secagem com N₂ para posterior metilação.

Os lipídios extraídos foram hidrolisados e metilados de acordo com metodologia descrita por Christie (1982), com modificações. Aproximadamente 40 mg de lipídios foram transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se 2 mL de hexano, seguido de 40 µL de acetato de metila, agitado em vortex e adicionando-se 40 µL de solução de metilação (1,75 mL de metanol/0,4 mL de 5,4mol/L de metóxido de sódio). Em seguida a mistura foi agitada em vortex durante 2 minutos, seguido de descanso durante 10 minutos, e adicionada de 60 µL de solução reagente de terminação (1 g ácido oxálico/30mL dietil éter), agitada em vortex por 30 segundos, adicionado de 200 mg de cloreto de cálcio, descanso por 1 hora, seguido de centrifugação a 3200 rpm, durante 5 minutos à 5°C e transferência do sobrenadante para frasco para a cromatografia gasosa.

As determinações qualitativas dos ácidos graxos foram feitas através de cromatografia em cromatógrafo ThermoFinnigan, modelo Trace com detector de ionização de chama (FID), utilizando coluna capilar de sílica fundida de 100 m de comprimento, diâmetro de 0,25 mm e 0,2 µm de espessura do filme (Supelco SP-2560, Bellefonte, PA, USA). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo ajustado a 1,2 mL/min. Foi injetado 1 µL de amostra em modo *split*, com razão de divisão 1/21 e temperatura de 250°C. A temperatura do forno foi programada para iniciar em 70°C, permanecendo assim durante 4 minutos, elevada a 170°C a 13°C/min. e finalmente para 250°C a 35°C/min. por 5 minutos. A temperatura do detector foi de 300°C, e o fluxo dos gases será de 450, 40 e 45 mL/min. para o ar sintético, hidrogênio e nitrogênio (*makeup*). A identificação e taxa de recuperação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi por comparação com os tempos de retenção e as concentrações dos ácidos graxos de um padrão conhecido (CRM-164, Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

O valor da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados de cadeia longa com 18 átomos de carbono (AGI) foi estimada pela equação adaptada de Aldrich et al. (1995).

$$BAGI = 100 - 100 [(TDI/TD)/(TII/TI)]$$

Onde:

BAGI: biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados 18 C

TDI: total de ácidos graxos 18 C insaturados na digesta duodenal

TD: total de ácidos graxos 18 C na digesta duodenal

TII: total de ácidos graxos 18 C insaturados ingeridos

TI: total de ácidos graxos 18 C ingeridos

Fermentação ruminal

Para análise da fermentação ruminal mensurou-se o pH, ácidos graxos voláteis (AGV) e o nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH₃).

As colheitas foram realizadas no sexto dia do período de colheita. Foram realizadas colheitas de líquido ruminal às 0, 2, 4 e 6 horas após a alimentação utilizando bomba de vácuo, no quinto dia do período de colheita. Logo após a colheita realizava-se imediatamente a mensuração de pH com potenciômetro de mesa. Um alíquota de 2 mL era transferida para frasco de vidro contendo 1 mL de ácido sulfúrico 1N, para fixação da amônia ruminal e outra alíquota de 5 mL de líquido ruminal era transferida para frasco contendo 1 mL de ácido fórmico para fixação dos ácidos graxos de cadeia curta. As amostras foram armazenadas a -20°C e mantidas congeladas até o momento das análises.

Foram mensurados os ácidos graxos propiônico, acético e butírico, assim como a taxa de acético:butírico e a quantidade total de ácidos graxos de cadeia curta.

As análises de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta foram realizadas de acordo com Valinote et al. (2006).

Cinética líquida ruminal

A cinética líquida ruminal foi avaliada através da taxa de passagem líquida, fluxo líquido por kg de MS consumida por hora e volume ruminal, através de técnica de Hyden (1959) utilizando como marcador de fase líquida, o polietilenoglicol (Carbowax F-4.000, marca Synth) com peso molecular 4.000 (PEG-4.000F).

As colheitas foram realizadas no sexto e sétimo dia do período de colheita. Foram adicionados 250 g de PEG diretamente no rúmen dos animais uma hora antes da alimentação. A primeira amostragem foi realizada antes da adição do indicador e as demais 1,5, 3, 6, 12 e 24 horas após a adição.

Alíquotas de aproximadamente 50 mL de fluído ruminal foram armazenadas em frascos de vidro e congeladas a -20°C para posterior análise do marcador.

A taxa de passagem de líquidos ou taxa eferente de fluxo, em porcentagem por hora, foi calculada através da regressão linear do logaritmo natural da concentração do PEG 4.000 em função do tempo. O volume de líquido ruminal, em litros, estimado através da extrapolação da concentração inicial (zero hora) e a dosagem do marcador (250g/animal). Estes dados foram ainda utilizados para calcular o fluxo líquido por kg de MS consumida por hora (L/kg MS/h).

Microrganismos ruminais

Foram realizadas colheitas de conteúdo ruminal para identificação e contagem de gêneros de protozoários ciliados e para contagem das bactérias ruminais *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Megasphaera elsdenii*.

Para contagem de ciliados, foram realizadas colheitas logo antes da alimentação dos animais e após quatro horas de alimentação, no mesmo dia das colheitas de material para análise de fermentação ruminal.

Uma alíquota de 10 mL de conteúdo ruminal foi transferida para frascos de vidro com 10mL de formaldeído a 37%. As amostras permaneceram em repouso até o momento das determinações que foram executadas de acordo com metodologia de Dehority (2003) para determinação das curvas de aparecimento dos gêneros de ciliados, utilizando câmara de contagem de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1mL. Utilizou-se microscópio ótico comum provido de retículo com área de $0,4362\text{ mm}^2$.

As colheitas para contagem das bactérias ruminais foram realizadas de acordo com o cronograma dos dias de colheita:

- dia 6 – 8:00 e 14:00 h;
- dia 7 – 9:00 e 15:00 h;
- dia 8 – 11:00 e 17:00 h;
- dia 9 – 12:00 e 18:00 h.

Foram colhidos aproximadamente 900 mL de conteúdo ruminal que eram imediatamente após a colheita homogeneizados a 900mL de solução

salina. Após 15 minutos as amostras eram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante era desprezado e o *pelet* bacteriano armazenado a -80°C para posterior análise.

Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA foi realizado com o kit da QIAamp® Stool (Figura 5). A extração foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante. A extração iniciou-se com a separação de 200uL de *pellet* ruminal em tampão. Em seguida, a amostra foi aquecida a 70°C e, posteriormente, a amostra foi incubada com uma resina (INHIBITEX®) que tem por finalidade retirar as substâncias nocivas ao DNA e inibidores da PCR. Foi realizada a digestão de proteínas com proteinase K e aquecimento (70°C). Nos próximos passos foram realizadas sucessivas lavagens com tampões, para permitir a ligação do DNA a membrana e retirada das impurezas. O último passo envolveu a adição de tampão de recuperação, centrifugação e a diluição em 200 µL de um tampão contendo baixa quantidade de sais, para facilitar a separação do DNA da membrana de sílica.

Figura 2 – Seqüência de extração de DNA pelo kit QIAamp® Stool.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi conduzido PCR das amostras para avaliação dos *primers*. O DNA extraído foi utilizado como molde (*template*) da PCR. As seqüências dos *primers* estão descritas no quadro 2. As condições para a amplificação e termociclagem seguiram as seguintes descrições: desnaturação (94°C por 2 min), 40 ciclos (94°C por 15 seg, 57°C por 15 seg e 72°C por 30 seg) e extensão por 72°C por 1 min para as bactérias *Anaerovibrio lipolytica* e *Megasphaera elsdenii*. Para a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, as condições foram as seguintes: desnaturação (95°C por 10 min), 40 ciclos (95°C por 15

seg, 55,8°C por 15 seg e 72°C por 35 seg). Os resultados da PCR foram verificados em gel de 1,0% de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

Quadro 2 – Sequência de *primers*, temperatura de anelamento e tamanhos dos fragmentos das bactérias *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Megasphaera elsdenii*.

Nome da Bactéria	Seqüência do Primer	Sentido	T ⁰ C de Anelamento	Tamanho do fragmento
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	5' TGGGTGTTAGAAATGGATTC 3'	Foward	57,0°C	597bp
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	: 5' CTCTCCTGCACTCAAGAATT 3'	Reverse	57,0°C	597bp
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	5' ACACACCGCCCGTCACA 3'	Foward	55,8°C	63bp
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	5' TCCTTACGGTTGGGTACACAGA 3'	Reverse	55,8°C	63bp
<i>Megasphaera elsdenii</i>	5' GACCGAAACTGCGATGCTAGA 3'	Foward	57,0°C	129bp
<i>Megasphaera elsdenii</i>	5' CGCCTCAGCGTCAGTTGTC 3'	Reverse	57,0°C	129bp

Quantificações das bactérias ruminais

Não foi realizada quantificação da bactéria *Anaerovibrio lipolytica* pelo fato desta ter apresentado dímeros na PCR. Para avaliação da quantidade relativa das bactérias *Butirovibrio fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii* foram realizadas análises de quantificação relativa de expressão através da PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 e tecnologia SYBR™ Green (Applied Biosystems®), molécula fluorescente empregada nos kits de amplificação que emitem sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla fita.

O corante ROX foi usado como referência passiva do equipamento. Uma vez que a quantificação relativa baseia-se na frequência relativa das bactérias de interesse em comparação com uma bactéria que represente a quantidade total de bactérias presentes no líquido ruminal, foi utilizada uma seqüência universal para a normalização dos dados.

Para amplificação das bactérias, foram empregados os seguintes *primers* ou sequência de oligonucleotídeos iniciadores (5'_3'):

- UNIVERSAL: 193 pares de base (MUYSER et al., 1993)
 - CCTACGGGAGGCAGCAG
 - ATTACCGCGGCTGCTGG

- *Butirovibrio fibrosolvens*: 63 pares de base (KLIEVE et al., 2003)
 - ACACACCGCCCGTCACA
 - TCCTTACGGTTGGGTCACAGA

- *Megasphaera elsdenii*: 119 pares de base
 - AAGCGGTGGAGTATGTGGTTTA
 - CACCACCTGTTTTCTTGTCTC

A PCR em tempo real foi realizada em volume de 20µL para cada bactéria, sendo que a composição final dos reagentes está descrita conforme o quadro 3.

Quadro 3 – Componentes utilizados para a PCR em tempo real para avaliação da especificidade e da quantidade relativa da amplificação dos *primers* das bactérias Universal, *Butirovibrio fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii*.

	Universal	<i>Butirovibrio fibrosolvens</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>
Água	9,5µL	9,5 µL	9,5 µL
Master Mix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
“Primer” Foward	1,0 µL (400nM)	1,0 µL (400nM)	1,0 µL (400nM)
“Primer” Reverse	1,0 µL (400nM)	1,0 µL (400nM)	1,0 µL (400nM)
DNA	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Total	25,0 µL	25,0 µL	25,0 µL

As condições de amplificação empregadas na PCR em tempo real foram: um ciclo inicial de 2 min a 50°C (etapa 1), 1 ciclo de 10min a 95°C (etapa 2), seguido de 40 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturação) e 1 min a

62°C (anelamento e extensão) (etapa 3). Os valores de emissão de fluorescência foram determinados ao término de cada ciclo. A Curva de Dissociação foi realizada após o último ciclo de amplificação normal: 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C e 15 seg a 95°C (etapa 4).

A Curva de Dissociação de cada uma das bactérias está apresentada na figura 3. Com o aumento gradual de temperatura de 60°C para 95°C, verificou-se que a emissão da fluorescência do SYBR™ Green diminuiu em um único momento, com a desnaturação dos produtos da PCR em tempo real ocorrendo quando atingiu uma temperatura específica para cada uma das bactérias, não havendo, portanto, amplificação inespecífica.

Figura 3 – Curva de Dissociação para avaliação da especificidade da amplificação dos primers das bactérias universal, *Butirovibrio fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii*.

Para a análise de quantificação relativa das bactérias universal, *Butirovibrio fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii* no líquido ruminal dos animais utilizou-se a mesma quantidade de DNA (1µL) para todas as amostras.

A composição final da reação está descrita no quadro 3. Cada amostra analisada foi conduzida em quadruplicata, seguindo as mesmas condições da

reação anterior: 1 ciclo inicial de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturação) e 1 min a 62°C (anelamento e extensão) (etapa 3). O nível de expressão relativa para cada bactéria foi calculado baseado na expressão de um calibrador, no caso, a amostra do animal controle universal que foi usado em todas as placas.

Ao término das reações, com base nos valores detectados de fluorescência de cada ciclo das amostras analisadas para cada bactéria, determinou-se a eficiência média da reação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR –Analysis of Real Time PCR Data, versão 7.5 (RAMARKERS et al., 2003), estabelecendo-se limites inferior e superior (“janela de linearidade”) em que as amostras estejam em fase logarítmica, mínimo de 3 pontos incluídos na regressão e alta correlação (Figura 4). A partir dos dados da eficiência da reação de cada uma das amostras, calculou-se a média da eficiência da PCR para cada gene bem como o limiar”, pela média do limite inferior e superior.

Figura 4 – Exemplo da determinação da eficiência das reações de PCR em tempo real para a bactéria Universal, utilizando o programa LinRegPCR: determinação dos limites superior e inferior (a), alta correlação (r^2) das amostras (b) e presença mínima de 3 pontos na curva de regressão (c).

Com base na eficiência média da reação para cada gene e do limiar”, determinou-se os valores dos Cts de cada amostra em cada ciclo no programa “7500 System SDS Software”. A quantificação final da expressão relativa das bactérias de interesse foi realizada utilizando-se a comparação dos Cts de acordo com a eficiência da reação, conforme descrito por PFAFFL e colaboradores (2001). Os cálculos foram realizados pelo método REST® - “Relative Expression Software Tool” (Pfaffl et al., 2002), baseado na razão da expressão das bactérias alvos (*Butirivibrio fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii*), com normalização dos dados realizada com a expressão da bactéria universal (tratamento controle), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Razão de expressão} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta Ct_{\text{alvo}}(\text{controle-amostra})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{controle-amostra})}},$$

onde: E = eficiência da reação;

Ct = ciclo em que cada curva de amplificação passa pelo limiar ,servindo como base para comparação entre as amostras;

Δ = diferença entre amostra *versus* controle.

4.1.4 Análises estatísticas

As variáveis de fermentação ruminal foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando-se o PROC MIXED do programa computacional SAS (SAS Inc., Carry, NC). As demais variáveis deste experimento foram analisadas através do PROC GLM do mesmo programa. As análises foram realizadas como contrates, sendo avaliados os efeitos do uso de monensina, levedura e a interação entre monensina e levedura.

A expressão relativa das bactérias alvos (*Butirivibrio fibrisolvens* e *Megasphaera elsdenii*) e da bactéria universal foram comparadas utilizando-se um teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (“Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test®”), descrito por PFAFFL e colaboradores (2002), considerando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

4.2 Ensaio de desempenho

4.2.1 Local

Este ensaio foi conduzido nas instalações de confinamento da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios Pólo Regional Extremo-Oeste, em Andradina, SP.

4.2.2 Animais e Alimentação

Foram utilizados 52 touros Nelores, com aproximadamente 18 meses e 233 kg de peso inicial na adaptação, em Delineamento Blocos ao Acaso, mantidos em baias individuais (Figura 6). Os animais foram divididos em dois blocos sendo um de animais mais pesados e o outro dos animais mais leves. Cada baia possuía piso de cimento e cochos individuais.

Figura 5 – Animais do experimento de confinamento contidos em baias individuais.

Os animais ficaram 60 dias em adaptação às instalações e às dietas.

A alimentação foi oferecida diariamente pela manhã, sendo as dietas as mesmas descritas no item 4.1.2, de forma que cada tratamento possuiu 13 repetições.

As sobras foram retiradas e pesadas diariamente antes do fornecimento do alimento. Procurou-se manter 5% de sobras no cocho.

4.2.3 Medidas e Análises

Foram realizadas medidas de desempenho, características de carcaça e análise da carne.

Desempenho

Foram realizadas pesagens após jejum completo de 16 horas a cada 28 dias.

Foram calculados os dados de ingestão de matéria seca (IMS), ingestão de matéria seca por kg de peso metabólico ($IMS/kg^{0,75}$), ganho de peso médio diário (GMD) e a eficiência alimentar calculada pela razão GMD:IMS (EA).

Foram realizados dois lotes de abate, realizado em abatedouro comercial localizado na cidade de Ilha Solteira. Um com 119 dias de confinamento, sendo o bloco dos animais mais pesados, e outro com 140 dias, o bloco dos animais mais leves.

Características de carcaça

Logo após o abate, foram obtidos os pesos de carcaça quente (PCQ), sendo estas encaminhadas imediatamente a câmara fria à temperatura entre 0 e 2°C.

Vinte e quatro horas após o abate, realizou-se as medidas de comprimento e profundidade das meia carcaças esquerdas.

Após essas medidas, cada meia carcaça esquerda foi cortada entre a 12ª e a 13ª costelas para avaliar a área de olho de lombo (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS). Foi utilizada régua quadriculada, com escala em cm^2 , específica, pelo método de quadrante de pontos. A referência para avaliar a EGS foi no $\frac{3}{4}$ da distância entre a parte medial da espinha dorsal e a parte lateral da AOL.

Em seguida procedeu-se a desossa, onde duas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de 2,5 cm foram retiradas para análise de maciez e ácidos graxos de cadeia longa.

Foram realizadas pesagens das peças inteiras, ossos e carne do dianteiro e traseiro+ponta de agulha, e calculado o rendimento de carne das mesmas.

Foi retirado o corte da 9^a-10^a-11^a costelas, segundo metodologia de Hankins & Howe (1946), para estimativa da composição corporal.

Para o cálculo da composição corporal, seguiram-se os seguintes procedimentos.

As amostras do corte da 9^a-10^a-11^a costelas foram congeladas e depois moídas em moedor de grande porte (Herman P – 33a – 3 - 789, 15 HP). Foram então liofilizadas até atingirem peso constante, para obtenção da porcentagem de água no corte.

O cálculo do peso corporal vazio (PCVz) foi realizado utilizando-se a equação de Leme et al. (1994):

$$\text{PCVz} = -16,15438 + (0,94245 \times \text{peso vivo em jejum});$$

$$(R^2 = 0,99; \text{Sy.x} = 4,99)$$

Utilizando-se o teor de água do corte da 9^a-10^a-11^a costelas, estimou-se as porcentagens de água e extrato etéreo (EE) no corpo vazio (CVz) através das equações de Lanna (1988):

$$\% \text{H}_2\text{O CVz} = 24,1936 + (0,6574 \times \% \text{H}_2\text{O corte 9-10-11a costelas});$$

$$(R^2 = 0,911; \text{Sy.x} = 0,82)$$

$$\% \text{EE CVz} = 60,815 - (0,7968 \times \% \text{H}_2\text{O corte 9-10-11a costelas});$$

$$(R^2 = 0,911; \text{Sy.x} = 0,82)$$

Para a estimativa dos teores de proteína e cinzas no corpo vazio foram utilizadas as relações proteína:água de 0,3009 e cinzas:água de 0,0747, calculadas para novinhos Nelores por Leme et al. (1994).

Análise da carne

Uma amostra por animal do músculo *Longissimus dorsi* foi embalada a vácuo e maturada por 7 dias, à temperatura entre 0 e 2°C, em câmara fria. Após a maturação, procedeu-se a análise de maciez objetiva.

As amostras foram retiradas das embalagens e pesadas. Foram colocados termômetros de perfuração no centro geométrico das amostras, que então foram levadas a forno elétrico pré-aquecido a temperatura de 170°C.

Estas permaneceram até que atingissem a temperatura de 71°C no centro da amostra.

Após o cozimento, realizou-se a perda de peso por cozimento (PPC), determinada pela diferença de peso antes e depois do cozimento [$PPC = (P_i - P_f) / P_i$], através da pesagem inicial do bife (P_i) e da pesagem final (P_f), expressa em porcentagem.

Todas as pesagens foram realizadas com balança semi-analítica (Marte, AS 2000).

Após a pesagem das amostras, foram inseridos termômetros individuais de perfuração, atingindo o centro geométrico das amostras. Em seguida, as mesmas foram levadas ao forno elétrico pré-aquecido a uma temperatura de aproximadamente 170°C, permanecendo no forno até que a temperatura do centro das amostras atingisse 71°C e foram então retiradas do forno (WHELLER et al., 2001).

As amostras foram deixadas, a seguir, em temperatura ambiente (25°C) até resfriarem e armazenadas em geladeira à temperatura de aproximadamente 2°C por aproximadamente 24 horas. Após isso, foram retirados, de cada amostra, seis cilindros, com 12,7 mm de diâmetro, para as análises de maciez, utilizando-se o aparelho Warner Bratzler Shear Force. A força de cisalhamento de cada amostra foi considerada como a média dos valores de seis cilindros.

Outra amostra do músculo *Longissimus dorsi* foi embalada a vácuo e levada ao túnel de congelamento para posterior análise de ácidos graxos de cadeia longa.

A extração, metilação e determinação dos ácidos graxos de cadeia longa foram realizados como descrito no item 4.1.3 na parte de Biohidrogenação Ruminal.

4.2.4 Análises estatísticas

As variáveis de desempenho foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando-se o PROC MIXED do programa computacional SAS (SAS Inc., Carry, NC). As demais variáveis deste experimento foram analisadas através do PROC GLM do mesmo programa. As análises foram realizadas

como contrastes, sendo avaliados os efeitos do uso de monensina, levedura e a interação entre monensina e levedura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor discussão dos temas, foram separados sub-itens para cada experimento.

5.1 Ensaio de Metabolismo

O experimento de metabolismo foi dividido em degradabilidade, digestibilidade, cinética líquida ruminal, fermentação, e protozoários ciliados.

5.1.1 Degradabilidade

A monensina aumentou a fração solúvel da MS da dieta ($p=0,1081$) e o uso de levedura aumentou a degradabilidade efetiva da MS ($p=0,1063$). As demais frações de degradabilidade não foram alteradas pela utilização dos aditivos (Tabela 1).

Tabela 1 – Degradabilidade da MS e FDN de dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes, fornecidos a novilhos Nelore.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				Valor de p ⁽²⁾			
	CM		SM		EPM	MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
a	38,37	42,65	36,86	38,18	0,9476	0,1081	NS	NS
b	56,18	55,36	56,70	55,50	1,6887	NS	NS	NS
c	0,05	0,05	0,06	0,05	0,0044	NS	NS	NS
DP	93,43	94,75	93,55	93,35	0,9375	NS	NS	NS
DE (0,05)	62,96	59,83	64,77	61,80	1,1275	NS	0,1063	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ a – fração solúvel (%); b – fração potencialmente degradável (%); c – taxa de degradação (kg.h^{-1}); DP – degradabilidade potencial (%); DE – degradabilidade efetiva com taxa de degradação de 5% (%).

Na literatura, as respostas da adição de monensina em dietas com lipídeos sobre a degradabilidade são variadas. Benchaar et al. (2006) não encontrou interação entre óleos essenciais e monensina para o desaparecimento *in situ* da MS e PB de farelo de soja, MS e amido do grão de milho, e MS, FDA e FDN da silagem de capim. Embora não significativo, ao adicionar monensina à dieta com óleos essenciais, observou redução do *lag time* na degradação da PB farelo de soja (2,61 vs 1,62h), MS e FDN da silagem

de capim (2,56 vs 1,91 e 3,62 vs 2,05, respectivamente), e aumento do *lag time* na degradação da MS do farelo de milho.

A monensina reduziu a digestão ruminal da matéria orgânica, FDA e nitrogênio em trabalho conduzido por Zinn & Borques (1993), estudando o ionóforo adicionado a dietas com gordura animal.

No entanto em estudos anteriores avaliando o caroço de algodão como fonte de lipídeo, a utilização de monensina aumentou a degradabilidade efetiva da FDN e a potencialmente degradável da MS da dieta total (Valinote et al., 2006).

Em relação a probiótico, Firkins et al. (1990) avaliaram o uso de extrato de *Aspergillus oryzae*+cultura de levedura e gordura animal-vegetal na dieta de novilhas de leite, e não verificaram efeito da interação entre as variáveis para a digestão ruminal, taxa de desaparecimento da FDN e *lag time*, *in situ*.

O efeito de cultura de levedura sobre o *lag time* é variável. Williams et al. (1991) e Kumar et al. (1997) verificaram redução no *lag time* de forragens utilizando cultura de levedura na dieta, por outro lado Mir & Mir (1994) encontraram aumento do tempo de colonização em silagem de milho no primeiro ano de experimento, e redução no segundo ano.

5.1.2 Digestibilidade

Os dados da digestibilidade *in situ* estão representados na tabela 2. Pode-se observar que os valores numéricos estão muito a baixo do encontrado na literatura para este tipo de dieta e de animal, inclusive os valores de NDT estão inferiores aos estimados (Quadro 1). A justificativa para tal fato é o uso de FDNi como indicador da digestibilidade. Em trabalhos anteriores foi possível observar subestimação da digestibilidade pelo uso deste método, fato ocorrido pela recuperação do indicador ficar aproximadamente em 83% (Valinote et al., dados não publicados).

A utilização de monensina afetou apenas a digestibilidade da FDN ($P=0,0274$), porém houve interação entre o uso dos aditivos ($p=0,0035$), onde a adição de levedura reduziu a digestibilidade quando na dieta com o ionóforo e aumentou quando a dieta não possuía monensina.

O uso de levedura aumentou a digestibilidade de todos os nutrientes ($p<0,08$), exceto EE e FDN, e o NDT ($p=0,0289$).

Tabela 2 – Digestibilidade da MS e nutrientes, e NDT de dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes, fornecidos a novilhos Nelore.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
DMS	55,73	54,46	55,56	48,27	1,8665	NS	0,0586	NS
DPB	59,79	54,98	61,07	49,62	2,6285	NS	0,0718	NS
DEE	60,44	60,08	63,64	53,35	1,5213	NS	NS	NS
DFDN	47,01	54,08	49,70	40,50	1,9524	0,0274	NS	0,0035
DCT	56,63	55,12	57,22	50,76	1,9361	NS	0,0286	NS
DCNF	67,61	55,92	65,46	62,46	2,905	NS	0,0527	NS
DMO	57,29	55,47	58,13	50,79	1,8219	NS	0,0251	NS
NDT	58,46	56,64	59,43	51,88	1,8546	NS	0,0289	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ DMS – digestibilidade da matéria seca (%); DPB – digestibilidade da proteína bruta (%); DEE – digestibilidade do extrato etéreo (%); DFDN – digestibilidade da fibra em detergente neutro (%); DCT – digestibilidade dos carboidratos totais (%); DMO – digestibilidade da matéria orgânica (%); NDT – nutrientes digestíveis totais (%).

Assim como encontrado, Benchaar et al. (2006) não detectaram efeito quando do uso de óleos essenciais e monensina na dieta de vacas em lactação para a digestibilidade. De forma semelhante Jenkins et al. (2003) não encontraram efeito do uso da monensina+óleo de soja sobre a digestibilidade em fermentadores *in vitro*.

De acordo com Zinn & Borques (1993) a adição da monensina em dietas com gordura animal aumentou a digestão pós-ruminal, porém pouco afetou na digestão total. A monensina pode ter aumentado a digestão pós-ruminal da FDN, uma vez que a degradabilidade da MS não foi afetada pelo antibiótico.

Por outro lado, no que se refere ao probiótico, Firkins et al. (1990) não obtiveram interação entre extrato de *Aspergillus oryzae*+cultura de levedura e gordura para digestibilidade total e dos nutrientes.

Bertrand & Grimes, (1997) não obtiveram melhora na digestão total quando adicionaram extrato de *Aspergillus oryzae* em dieta contendo sebo. A hipótese desses autores de que o extrato compensaria a redução da digestibilidade da fibra ocorrida pela adição de gordura não foi comprovada, pelo contrário, embora não tenha havido diferença, a adição do extrato à dieta com gordura reduziu numericamente a digestão da FDN, sendo 63,7% e

61,7%, para as dietas com sebo e com sebo+extrato de *A. oryzae*, respectivamente.

Neste trabalho, o aumento da digestibilidade promovido pela utilização da cultura de levedura está coerente com o aumento da degradabilidade efetiva da MS observada.

5.1.3 Cinética líquida

Os aditivos não interferiram na resposta da cinética líquida ruminal ($p>0,05$) como pode-se observar na Tabela 3, concordando com Clary et al. (1993) que não encontraram diferenças na cinética líquida ruminal quando adicionaram ionóforos em dietas contendo gordura animal.

Esta avaliação é interessante, pois é na fase líquida do rúmen que está presente a maioria dos microrganismos.

A taxa de passagem líquida e o fluxo líquido por kg de MS ingerida por hora foram reduzidos em trabalho conduzido por Valinote et al. (2006) quando adicionaram monensina em dietas com lipídeo fornecido na forma de caroço de algodão, já o volume ruminal não foi afetado.

Tabela 3 – Cinética líquida ruminal de novilhos Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
TL, %.h ⁻¹	6.40	6.52	6.96	6.85	0.2146	NS	NS	NS
FL, L.kgMSI. h ⁻¹	1.53	1.56	1.67	1.64	0.0515	NS	NS	NS
VR, L	23.59	23.40	23.43	23.37	0.4648	NS	NS	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. MON – efeito de monensina. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ TL – taxa de passagem de fluídos; FL – fluxo líquido por kg de MS consumida por hora; VR – volume ruminal.

5.1.4 Fermentação

A utilização de aditivos não interferiu na produção e proporção dos ácidos graxos de cadeia curta ($p>0,05$), no entanto o uso de levedura aumentou o valor de pH ruminal ($p=0,0206$).

Tabela 4 – Resultados de fermentação ruminal e protozoários ciliados em novilhos Nelores alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
Ácidos graxos cadeia curta, mM	75,56	72,87	75,13	75,25	3,0528	NS	NS	NS
Ácido acético, mol/100 mol	61,18	59,31	59,13	60,95	0,7201	NS	NS	NS
Ácido propiônico, mol/100 mol	29,07	30,51	31,82	29,84	0,0587	NS	NS	NS
Ácido butírico, mol/100 mol	9,75	10,18	9,05	9,20	0,3065	NS	NS	NS
Acético:Propiônico	2,22	1,99	1,96	2,12	0,07	NS	NS	NS
Nitrogênio amoniacal, mg.dL ⁻¹	15,88	15,85	16,13	16,16	0,1639	NS	NS	NS
pH	6,64	6,42	6,70	6,47	0,058	NS	0,0206	NS
Protozoários ciliados, .10 ⁴ .mL ⁻¹	22,26	7,06	59,59	52,84	4,2706	<0.0001	0,0049	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação.

Semelhante ao encontrado, Valinote et al. (2006) não encontraram efeitos na produção e concentração de ácidos graxos voláteis quando adicionaram monensina à dieta com caroço de algodão como fonte de lipídeos. Por outro lado houve aumento da concentração de nitrogênio amoniacal quando fornecido o ionóforo. De forma semelhante à Benchaar et al. (2006) que não verificaram efeito na fermentação ruminal quando adicionaram monensina em dietas com óleos essenciais.

Outro trabalho onde não houve efeito da adição de ionóforo em dieta com gordura sobre a fermentação ruminal foi o de Clary et al. (1993) que utilizaram lasalocida ou monensina+tilosina em dietas contendo gordura animal. A adição de gordura nas dietas com os antibióticos não afetou o pH e ácidos graxos de cadeia curta. A amônia ruminal aumentou quando no tratamento com lasalocida, em comparação à controle e monensina+tilosina.

Jenkins et al. (2003) não encontraram diferença para a concentração de nitrogênio amoniacal em trabalho *in vitro* utilizando ionóforo em meio com óleo.

No que refere à probiótico Firkins et al. (1990) avaliando mistura de extrato de *Aspergillus oryzae* e cultura de levedura com gordura animal-vegetal

não encontraram efeito da adição do pró-biótico quando adicionado à dieta com gordura sobre o pH, ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal. Neste experimento, houve grande diferença nestes parâmetros quando houve adição de gordura na dieta e de acordo com os autores este pode ser explicação pelo não efeito do aditivo.

Bertrand & Grimes (1997) não encontraram interação entre sebo e extrato de *Aspergillus oryzae* para a produção de ácidos graxos voláteis. A adição do extrato proporcionou pequeno aumento (0,7 mol/100mol) na concentração de ácido acético, mas que não foi estatisticamente significativa.

Em alguns trabalhos os resultados foram diferentes. Jenkins et al. (2003) em experimento *in vitro*, obtiveram redução na concentração de ácido propiônico no tratamento monensina+óleo de soja, comparado ao tratamento com óleo de soja apenas.

Já, Fellner et al. (1997), em ensaio *in vitro* adicionando ácido linoléico no meio de fermentação e ionóforos, verificaram redução na concentração de ácido acético e butírico, e aumento na concentração de ácido propiônico, embora a concentração total de AGV não tenha sido afetada. Zinn & Borques (1993), da mesma forma, obtiveram aumento da concentração de ácido propiônico e redução na concentração de ácido acético com a adição de monensina em dieta com gordura animal.

Assim como encontrado, Zinn, (1998), Clary et al. (1993), Zinn & Borques (1993), Jenkins et al. (2003) e Valinote et al. (2006) não encontraram alteração no pH do rúmen quando adicionaram monensina à dieta com óleo.

5.1.5 Protozoários ciliados

Foram encontrados apenas protozoários do gênero *Entodinium*, no conteúdo ruminal, desta forma o número total de ciliados é igual ao deste gênero. A defaunação ocorrida pela adição de lipídeos é comum à maioria dos trabalhos, sendo os ciliados do gênero *Entodinium* os mais resistentes, ou os que prevaleceram mais (Oldick & Firkins, 2000, Ivan et al., 2001, Valinote et al., 2005).

A monensina reduziu de forma expressiva a quantidade de ciliados ($p < 0,0001$), contrário ao encontrado por Valinote et al. (2005) que não verificaram diferença estatística no número de protozoários quando

adicionaram monensina à dieta enriquecida com lipídeo, fornecido na forma de caroço de algodão, embora a adição do antibiótico tenha aumentando numericamente os protozoários totais e do gênero *Entodinium*. Benchaar et al. (2006) também não encontraram diferenças no número de células ao adicionar monensina em dietas com óleos essenciais.

Houve aumento do número de ciliados ao se adicionar levedura à dieta ($p=0,0049$). Um dos resultados encontrados em trabalhos é que o uso de levedura como probiótico favorece o crescimento de microrganismos no rúmen (Newbold et al., 1996). De acordo com o encontrado, esta afirmação também é válida quando há presença de óleo insaturado na dieta, em contraste pelo achado por Firkins et al. (1990) utilizando gordura animal-vegetal e probiótico.

Pode-se perceber que além da redução no número de células e de gêneros, a monensina também reduziu as espécies do gênero *Entodinium*.

A espécie que apareceu em maior percentagem em todos os tratamentos foi o *Entodinium bovis*, mas a que apareceu em segunda maior percentagem variou conforme os tratamentos. Para os tratamentos sem monensina e sem levedura e sem monensina e com levedura foi a *Entodinium indicum*, já para os tratamentos com monensina e sem levedura e o tratamento com ambos aditivos foram o *Entodinium bursa* e o *Entodinium caudatum* respectivamente (Quadro 4).

Quadro 4 – Espécies de *Entodinium* identificadas no rúmen de bovinos alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis	Tratamentos ⁽¹⁾			
	CM		SM	
	CL	SL	CL	SL
<i>E. bovis</i>	43,7	38,4	65,18	54,68
<i>E. nanellum</i>	6,56	8,88	0	3,16
<i>E. longinucleatum</i>	4,7	6,7	0	5,23
<i>E. bursa</i>	8,8	11,7	14,68	6,7
<i>E. simplex</i>	6,16	4,18	0	2,18
<i>E. indicum</i>	11	13,4	6,89	6,78
<i>E. dilobum</i>	7,68	8,68	0	4,78

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura.

Este resultado confirma que mesmo na presença do óleo, a monensina é ativa contra os microrganismos do rúmen.

5.1.6 Bactérias ruminais

Nas figuras 6 e 7 estão representadas as expressões relativas das bactérias estudadas.

Figura 6 – Expressão relativa da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* do conteúdo ruminal de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes. * Efeito significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 7 – Expressão relativa da bactéria *Megasphaera elsdenii* do conteúdo ruminal de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes. *Efeito significativo em relação ao controle ($p = 0,143$).

Tanto o tratamento com levedura quanto o tratamento com monensina e levedura apresentaram expressão relativa maior que o controle ($p = 0,049$) para a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*. O tratamento com levedura apresentou

menor expressão relativa em relação ao tratamento controle para a bactéria *Megasphaera elsdenii* ($p=0,143$).

Ambas bactérias são gram-positivas, principal grupo favorecido pela adição de levedura, desta maneira o aumento da *Butyrivibrio fibrisolvens* está em acordo com o esperado.

Sendo a *B. fibrisolvens* umas das principais bactérias degradadoras de fibra (Weimer et al., 1999) o aumento da degradabilidade efetiva pela levedura e o aumento na expressão relativa desta bactéria são coerentes.

O fato de ter ocorrido provavelmente pouca produção de ácido láctico no rúmen dos animais pode ser explicação pelo não aumento da bactéria *M. elsdenii*, que utiliza principalmente este ácido como substrato (Hino et al., 1994).

5.1.7 Metano

As colheitas de metano não foram bem sucedidas. A alta proporção de concentrado somada ao efeito aglutinante do óleo obstruíam o canal de colheita de gás, portanto acreditamos que esta metodologia não é adequada para as condições do presente experimento. Até o momento, os experimentos que utilizaram esta metodologia no Brasil foram a pasto (Primavesi et al., 2004) ou com alta proporção de volumoso. Sugere-se que sejam realizados ensaios a fim de adaptar a metodologia a condições de confinamento com alta proporção de concentrado.

Zinn & Borques (1993) obtiveram redução na emissão de metano quando utilizaram monensina em dieta contendo gordura animal. Da mesma forma, em experimento *in vitro*, Fellner et al. (1997) reduziram a produção de metano em 29% na presença de monensina em meio contendo lipídeo.

5.1.8 Biohidrogenação

Não foi possível realizar as análises de ácidos graxos de cadeia longa no alimento e das sobras, desta forma não foi possível realizar os cálculos de biohidrogenação. No entanto os valores de ácidos graxos de cadeia longa do conteúdo duodenal estão representados na tabela 5.

A utilização de monensina reduziu as porcentagens dos ácidos C16:0 ($p=0,0133$) e C18:2 c9c12 ($p=0,0850$), sem desta forma apresentar claros indícios de alteração na biohidrogenação.

Já, o uso de cultura de levedura favoreceu a concentração dos ácidos C17:1 e C18:1 c15 ($p=0,0837$ e $p=0,0517$, respectivamente) e reduziu a concentração dos C18:0, C18:1 t10-11 e C18:1 t12 ($p=0,0584$, $p=0,0053$ e $p=0,0038$, respectivamente) assim como reduziu a concentração total de ácidos graxos saturados ($p=0,0269$) e ácidos graxos trans ($p=0,0057$) o que pode ser uma redução da biohidrogenação pela adição do probiótico.

Os ácidos C11:0 e C:13:0 Anteiso apresentaram interação entre os tratamentos ($p=0,0325$ e $p=0,0575$, respectivamente), sendo que a cultura de levedura aumentou ambos ácidos na presença de monensina e reduziu-os na ausência desta.

Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos do conteúdo duodenal de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
C 4:0	0.0000	0.0000	0.0974	0.1432	0.0373	NS	NS	NS
C 6:0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 8:0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0128	0.0026	NS	NS	NS
C 10:0	0.0127	0.0103	0.0379	0.0599	0.0140	NS	NS	NS
C 10:1	0.1161	0.0812	0.0969	0.1508	0.0150	NS	NS	NS
C 11:0	0.0133	0.0062	0.0086	0.0300	0.0035	NS	NS	0.0325
C 12:0	0.1330	0.1714	0.114	0.2094	0.0258	NS	NS	NS
C 12:1	0.1286	0.0671	0.0788	0.1090	0.0147	NS	NS	NS
C 13:0 ISO	0.0000	0.0156	0.0000	0.0000	0.0030	NS	NS	NS
C 13:0 ANTEISO	0.1922	0.1316	0.1482	0.1918	0.0129	NS	NS	0.0575
C 14:0	0.4167	0.5006	0.2916	0.3239	0.0486	NS	NS	NS
C 14:0 ISO	0.0420	0.0654	0.0407	0.0534	0.0056	NS	NS	NS
C 14:1 c9	0.0133	0.0235	0.0099	0.0065	0.0038	NS	NS	NS
C 15:0	0.4109	0.4383	0.2947	0.2702	0.0426	NS	NS	NS
C 15:0 ISO	0.1790	0.2228	0.1246	0.1450	0.0245	NS	NS	NS
C 15:0 ANTEISO	0.3683	0.3914	0.2572	0.2587	0.0437	NS	NS	NS
C 16:0	14.7399	15.0342	15.1695	14.7378	0.3173	0.0133	NS	NS
C 16:1 c9	0.1745	0.2688	0.2750	21.8100	0.0479	NS	NS	NS
C16:0 ISO	0.3632	0.1802	0.3406	0.1734	0.0351	NS	NS	NS
C 17:0	0.3929	0.4303	0.4023	0.4540	0.0139	NS	NS	NS
C 17:0 ISO	0.1841	0.1862	0.2582	0.2214	0.0322	NS	NS	NS
C 17:1	0.0190	0.0103	0.0351	0.0306	0.0050	NS	0.0837	NS
C 18:0	65.1641	63.9579	67.2254	69.6945	0.9858	NS	0.0584	NS
C 18:1 t6-9	0.3269	0.5581	0.1581	0.5283	0.1041	NS	NS	NS
C 18:1 t10-11	8.6780	9.3717	6.6433	6.1039	0.4914	NS	0.0053	NS
C 18:1 t12	0.4799	0.7058	0.0956	0.0400	0.0969	NS	0.0038	NS
C 18:1 c9	3.0801	2.8467	2.7448	2.6163	0.2130	NS	NS	NS
C 18:1 c11	0.2821	0.4198	0.0475	0.0667	0.0741	NS	0.0586	NS
C 18:1 c12	0.1091	0.0305	0.0238	0.0447	0.0189	NS	NS	NS
C 18:1 c13	0.0229	0.0179	0.0155	0.0169	0.0038	NS	NS	NS
C 18:1 c16	0.8296	0.9065	0.7883	0.7415	0.0363	NS	NS	NS
C 18:1 c15	0.1573	0.1064	0.0352	0.0618	0.0210	NS	0.0517	NS
C 18:2 c9t11	0.0444	0.0567	0.0401	0.0493	0.0110	NS	NS	NS
C 18:2 t10c12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 18:2 t11c15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 18:2 c9c12	3.7136	2.9046	4.6817	3.1785	0.3262	0.0850	NS	NS
C 18:3 n3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 18:3 n6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 20:1	0.0637	0.0656	0.0752	0.0619	0.0119	NS	NS	NS

Continua

Continuação

C 20:3	0.1418	0.1214	0.1106	0.1783	0.0173	NS	NS	NS
C 20:4	0.0000	0.0000	0.0578	0.0000	0.0154	NS	NS	NS
C 20:5	0.0000	0.1808	0.0000	0.0000	0.0480	NS	0.0624	NS
C 22:0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 22:1	0.0228	0.0228	0.0305	0.0413	0.0074	NS	NS	NS
C 22:2	0.0000	0.4948	0.0000	0.0000	0.1313	NS	NS	NS
C 22:5	0.0173	0.0179	0.0356	0.0408	0.0051	NS	NS	NS
C 22:6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	NS	NS	NS
C 24:0	0.0136	0.0269	0.0179	0.0163	0.0076	NS	NS	NS
C 24:1	0.0075	0.0111	0.0059	0.0032	0.0019	NS	NS	NS
Saturados	81.2972	80.5662	83.6567	85.9522	0.8592	NS	0.0269	NS
Monoinsaturados	4.1971	3.9716	3.4742	3.4277	0.2119	NS	NS	NS
Monoinsaturados trans	10.3145	11.5422	7.6853	7.4137	0.6361	NS	0.0057	NS
Poliinsaturados	3.8726	3.7195	4.8857	3.3976	0.3270	NS	NS	NS
ALC	0.0444	0.0567	0.0401	0.0493	0.0110	NS	NS	NS
Insaturados	8.0698	7.6911	8.3599	6.8253	0.4530	NS	NS	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽²⁾ ALC – ácido linoléico conjugado; Insaturados – ácidos graxos monoinsaturados + ácidos graxos poliinsaturados.

A falta de efeito da monensina na concentração de ácidos graxos insaturados foi contrário ao esperado. Em estudos *in vitro* observou-se redução da lipólise (Van Nevel & Demeyer, 1995) e da biohidrogenação (Fellner et al., 1997) ao utilizar monensina em culturas com óleos vegetais. Concordando com isso, Kobayashi et al. (1992) em estudo avaliando fornecimento de salinomicina a ovelhas, verificaram maior concentração de ácidos graxos de cadeia longa insaturados no conteúdo duodenal dos animais alimentados com o antibiótico.

Em estudo *in vitro*, Kepler et al. (1965) encontrou que os principais produtos da *B. fibrisolvens* são os ácidos ALC cis9 trans11, C18:1 trans 9 e C18:1 trans 11, no entanto outras variáveis afetam quando se realiza estudos *in vivo*, por este motivo não foi encontrado aumento destes ácidos quando utilizado a cultura de levedura. Deve-se conduzir mais estudos para elucidar o mecanismo de microrganismos no rúmen e suas interações.

A provável diminuição da biohidrogenação pela adição de levedura pode ser em parte explicada pelo aumento do número de ciliados, pois estes

engolfam bactérias e podem, desta maneira, reduzir a atividade bacteriana no rúmen.

5.2 Ensaio de Desempenho

No experimento de desempenho, foram avaliados o desempenho dos animais em confinamento, as características de carcaça e da carne.

5.2.1 Desempenho em confinamento

Os dados de desempenho estão representados na tabela 6.

Tabela 6 – Dados de desempenho dos touros Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾					Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM		EPM	MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
IMS, kg.kg								
PV	2,27	2,24	2,35	2,25	0,0222	NS	0,0133	NS
IMS, kg.kg.(PV ⁻⁷⁵) ⁻¹	0,095	0,096	0,101	0,096	0,0767	NS	0,0126	0,0533
PVI, kg	248,81	258,61	258,47	250,99	5,8067	NS	NS	NS
PVF, kg	407,23	426,41	423,88	411,9	6,2543	NS	NS	NS
GMD, kg.d ⁻¹ (*)	1,13	1,17	1,07	1,13	0,0315	NS	NS	NS
EA, GMD:IMS	0,151	0,156	0,136	0,151	0,0041	0,0897	0,0511	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ IMS – ingestão de matéria seca; PVI – peso vivo inicial; PVF – peso vivo final; GMD – ganho médio diário; EA – eficiência alimentar.

O uso de levedura aumentou a ingestão de matéria seca por kg de peso vivo (p=0,0133). Em relação ao consumo por kg de peso metabólico, houve interação (p=0,0533). A cultura de levedura aumentou esta variável quando a dieta não tinha monensina.

A monensina aumentou a eficiência alimentar (p=0,0897) e a levedura reduziu a mesma (p=0,0511).

Semelhante ao encontrado, Clary et al. (1993) não obtiveram diferença na ingestão de MS e no ganho de peso quando adicionaram monensina+tilosina ou quando trabalharam com fornecimento em dias alternados de lasalocida e monensina+tilosina em dietas com gordura animal, comparado a dieta controle com gordura. No entanto, dos 62 ao término do

confinamento (116 dias), os autores verificaram redução da IMS para o tratamento monensina+tilosina. O ganho de peso diário foi reduzido pelo tratamento monensina+tilosina, mas a eficiência (GMD:IMS) não foi afetada pelos tratamentos. Da mesma forma, não houve diferença no desempenho de animais alimentados com monensina adicionada a dieta com gordura animal comparada a tratamento controle, em trabalho de Zinn e Borques (1993).

Bell et al. (2006) não verificaram diferença na IMS de vacas em lactação alimentadas com monensina adicionada a dieta com óleo de açafrão.

De forma contrária, Benchaar et al. (2006) encontrou aumento da IMS quando adicionou monensina à dieta de vacas fistuladas em lactação recebendo produto a base de óleos essenciais.

A mistura de extrato de *Aspergillus oryzae* e cultura de levedura com gordura animal-vegetal não apresentaram diferença na IMS quando adicionados a dieta com gordura (Firkins et al., 1990). Da mesma forma (Bertrand & Grimes, 1997) não encontraram efeito do uso de extrato de *Aspergillus oryzae* em dietas com sebo para a IMS.

Segundo Zinn e Borques (1993), podem haver dois motivos para a falta de efeito da monensina na presença da gordura na dieta. Primeiro é que ambos alimentos têm efeitos parecidos sobre a fermentação ruminal, e o uso desses ao mesmo tempo pode alterar a resposta. O outro motivo seria que por ser a monensina lipossolúvel, a gordura adicionada à dieta pode absorver o ionóforo e diminuir a reatividade do antibiótico.

5.2.2 Características das carcaças

Em relação às características de carcaça, a monensina apresentou efeito no rendimento de carne de traseiro ($p=0,0684$). Houve interação entre o ionóforo e levedura para espessura de gordura subcutânea ($p=0,0213$), sendo que a levedura aumentou a quantidade de EGS, porém na presença de monensina reduziu esse parâmetro. Os resultados das características de carcaça estão apresentados na tabela 7. Contrário ao encontrado neste trabalho, Clary et al. (1993), verificaram que o tratamento monensina+tilosina obteve menor peso de carcaça quente e área de olho de lombo em dietas com gordura animal, não havendo diferença para as demais observações na

carcaça. Zinn e Borques (1993) verificaram aumento na EGS quando adicionaram monensina à dieta com gordura animal.

A espessura de gordura subcutânea foi maior para bovinos alimentados com cultura de levedura, comparado a tratamento controle, em trabalho conduzido por Mir & Mir (1994), corroborando com o encontrado neste ensaio.

Tabela 7 – Características de carcaça de touros Nelores alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
PCQ, kg	230,52	237,27	239,91	230,79	3,6974	NS	NS	NS
RC, %	53,84	57,26	58,09	57,47	1,1053	NS	NS	NS
CC, cm	122,23	121,29	122,69	122,10	0,6886	NS	NS	NS
PC, cm	39,25	39,21	39,56	39,20	0,2124	NS	NS	NS
RCD, %	43,58	45,45	45,91	43,56	0,2989	NS	NS	NS
RCT, %	67,44	68,35	69,07	67,10	0,2507	0,0648	NS	NS
AOL, cm ²	68,52	68,64	68,74	67,89	1,1493	NS	NS	NS
EGS, mm	4,70	6,01	6,07	4,65	0,3159	NS	NS	0,0213

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ AOL – Área de olho de lombo; EGS – Espessura de gordura subcutânea.

Quanto à composição corporal, não houve diferença entre os tratamentos, inclusive nas estimativas de peso vivo em jejum e peso do corpo vazio ($p>0,05$).

Os resultados da composição corporal (Tabela 9) refletem o encontrado no desempenho e nas características de carcaça, embora pudesse esperar diferentes percentagens de EE por estes terem apresentado interação para EGS.

A resposta positiva da monensina no desempenho e na espessura de gordura pode ser explicada pela redução nas exigências de manutenção causada pelo o ionóforo (Goodrich et al., 1984 e Zinn, 2006). Este efeito pode estar ligado à provável redução da massa microbiana ruminal e menor tamanho de vísceras causado pela redução da ingestão, porém não se sabe ao certo o fator principal. Com menor exigência de manutenção o animal pode disponibilizar nutrientes tanto para o desempenho quanto para a deposição de gordura.

A ausência de resposta da levedura no desempenho, apesar desta ter gerado maior ingestão e melhoria na digestão da dieta pode estar no fato destes resultados favorecerem precocidade na deposição de gordura, explicado pela maior espessura de gordura na carcaça. O ganho de gordura na carcaça é menos eficiente do que o ganho de proteína, o que explica a piora na eficiência alimentar.

Tabela 8 – Composição corporal de touros Nelores alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis ⁽³⁾	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
Água PVz, %	63,52	63,35	63,51	64,17	0,1926	NS	NS	NS
EE PVz, %	13,15	13,35	13,15	12,35	0,2334	NS	NS	NS
PB PVz, %	10,98	11,03	10,98	10,78	0,0579	NS	NS	NS
MM PVz, %	2,72	2,74	2,72	2,68	0,0144	NS	NS	NS
PVj, kg	428,55	412,15	422,11	406,96	6,3008	NS	NS	NS
PCVz, kg	387,71	372,15	381,69	367,50	5,9416	NS	NS	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽³⁾ PVz – Peso vazio; PVj – Peso vivo em jejum; PCVz – Peso do corpo vazio.

5.2.3 Características da carne

Para perda de água ao cozimento e força de cisalhamento, não foram detectadas diferenças entre os tratamentos ($p>0,05$), com melhores valores numéricos para os tratamentos com microingredientes.

Tabela 9 – Características da carne de touros Nelore alimentados com microingredientes e óleo de girassol.

Variáveis	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM	Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM			MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
Perdas por cozimento, %	13.01	13.09	11.45	14.04	0.6426	NS	NS	NS
Força de cisalhamento, kg	4.38	4.31	3.90	5.08	0.2374	NS	NS	NS

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. MON – efeito de monensina. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação.

O perfil lipídico da carne dos animais está representado na tabela 12. A adição de monensina aumentou a porcentagem do C15 ISO ($p=0,0619$), C18:1 t10-11 ($p=0,0876$) e C18:2 t11c15 ($p=0,0531$). O uso de levedura reduziu as porcentagens dos ácidos C6:0 ($p=0,1041$), C8:0 ($p=0,0287$), C22:0 ($p=0,0081$), C22:1 ($p=0,0206$) e ácidos graxos poliinsaturados (0,0256) e aumentou C16:0 ($p=0,0483$), C18:3 n3, ácidos graxos saturados totais ($p=0,0084$).

Houve efeito de interação para alguns ácidos graxos. Para o C17:0 ISO, o uso de levedura aumentou a porcentagem do ácido na presença de monensina mas reduziu na ausência desta ($p=0,1039$). Os ácidos graxos C20:5, C22:6 e ácidos graxos insaturados totais reduziram suas concentrações quando adicionado aditivos ($p=0,0989$, 0,0289 e $p,0491$ respectivamente).

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos na carne de novilhos Nelores alimentados com dietas com óleo de girassol e diferentes microingredientes.

Variáveis	Tratamentos ⁽¹⁾					Valor de p ⁽²⁾		
	CM		SM		EPM	MON	LEV	INT
	CL	SL	CL	SL				
C 4:0	0,0386	0,0621	0,0316	0,0404	0,0114	NS	NS	NS
C 6:0	0,0013	0,0042	0,0005	0,0022	0,0007	NS	0,1041	NS
C 8:0	0,0146	0,0395	0,0151	0,0449	0,0063	NS	0,0287	NS
C 10:0	0,0034	0,0129	0,0074	0,0101	0,0021	NS	NS	NS
C 10:1	0,0109	0,0097	0,0040	0,0085	0,0034	NS	NS	NS
C 11:0	0,0005	0,2200	0,0040	0,0031	0,0013	NS	NS	NS
C 12:0	0,0301	0,0493	0,0445	0,0431	0,0060	NS	NS	NS
C 12:1	0,0016	0,0005	0,0010	0,0006	0,0003	NS	NS	NS
C 13:0 ISO	0,0012	0,0027	0,0016	0,0016	0,0004	NS	NS	NS
C 13:0 ANTEISO	0,0043	0,0059	0,0028	0,0063	0,0012	NS	NS	NS
C 14:0	2,6414	2,5515	2,9920	2,3810	0,1270	NS	NS	NS
C 14:0 ISSO	0,0428	0,0503	0,0423	0,0455	0,0037	NS	NS	NS
C 14:1 c9	0,0413	0,0157	0,0370	0,0037	0,0120	NS	NS	NS
C 15:0	0,4085	0,3486	0,3745	0,3860	0,0278	NS	NS	NS
C 15:0 ISO	0,0998	0,0989	0,0932	0,0869	0,0057	NS	NS	NS
C 15:0 ANTEISO	0,1208	0,1169	0,0880	0,0707	0,0101	0,0619	NS	NS
C 16:0	24,1259	23,8890	24,8892	23,4426	0,2147	NS	0,0483	NS
C 16:0 ISO	0,1574	0,1505	0,1247	0,1492	0,0089	NS	NS	NS
C 16:1 c9	1,7732	2,0349	1,8302	1,9260	0,1364	NS	NS	NS
C 17:0	0,5393	0,3677	0,4341	0,5133	0,0541	NS	NS	NS
C 17:0 ISO	0,2111	0,1262	0,1695	0,1801	0,0147	NS	NS	0,1039
C 17:1	0,5451	0,5038	0,4763	0,6096	0,0281	NS	NS	NS
C 18:0	18,1703	18,1786	17,9955	17,0547	0,2959	NS	NS	NS
C 18:1 c9	27,7311	32,9082	33,5375	32,5795	1,5110	NS	NS	NS
C 18:1 c11	8,5058	2,2405	2,8663	3,1115	1,4467	NS	NS	NS
C 18:1 c12	0,0805	0,0729	0,0375	0,1651	0,0257	NS	NS	NS
C 18:1 c13	0,2498	0,2046	0,2235	0,2518	0,0160	NS	NS	NS
C 18:1 c16	0,1459	0,0611	0,1364	0,1291	0,0150	NS	NS	NS
C 18:1 c15	0,0875	0,0395	0,0726	0,0744	0,0083	NS	NS	NS
C 18:1 t6-9	0,0090	0,0159	0,1580	0,0000	0,0392	NS	NS	NS
C 18:1 t10-11	1,9785	2,8139	1,8449	1,7174	0,1760	0,0876	NS	NS
C 18:1 t12	0,3398	0,0518	0,2039	0,2868	0,1040	NS	NS	NS
C 18:2 c9c12	6,8748	8,1704	7,2215	8,3652	0,3870	NS	NS	NS
C 18:2 c9t11	0,5419	0,5818	0,0519	0,4485	0,0338	NS	NS	NS
C 18:2 t10c12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	NS	NS	NS
C 18:2 t11c15	0,0263	0,0474	0,0228	0,0205	0,0038	0,0531	NS	NS
C 18:3 n3	0,2257	0,3016	0,2446	0,3221	0,0223	NS	0,0975	NS
C 18:3 n6	0,8663	0,2547	0,4906	1,1343	0,3692	NS	NS	NS
C 20:1	0,0872	0,0287	0,0198	0,0313	0,0183	NS	NS	NS
C 20:3	0,1880	0,0491	0,1449	0,2276	0,0852	NS	NS	NS

C 20:4	0,0344	0,0352	0,0273	0,0423	0,0028	NS	NS	NS
C 20:5	0,2739	0,3113	0,2051	0,3922	0,0232	NS	0,0152	0,0989
C 22:0	0,1321	0,2968	0,1079	0,3068	0,0341	NS	0,0081	NS
C 22:1	1,5949	1,9415	1,4323	2,1426	0,1119	NS	0,0206	NS
C 22:2	0,0008	0,0013	0,0017	0,0011	0,0002	NS	NS	NS
C 22:5	0,6041	0,6959	0,6054	0,8348	0,0641	NS	NS	NS
C 22:6	0,0910	0,1070	0,0667	0,1492	0,0090	NS	0,0104	0,0289
C 24:0	0,2791	0,1421	0,2135	0,2443	0,0389	NS	NS	NS
C 24:1	0,0020	0,0022	0,0000	0,0310	0,0075	NS	NS	NS
Saturados	46,6160	45,8600	47,0566	44,4866	0,3435	NS	0,0084	NS
Monoinsaturados	40,6491	39,9985	40,5849	41,0424	0,3489	NS	NS	NS
Monoinsaturados trans	2,4721	2,9410	2,3145	2,1299	0,1472	NS	NS	NS
Poliinsaturados	9,3171	9,8897	8,9436	11,4301	0,3666	NS	0,0256	NS
ALC	0,5688	0,6292	0,5415	0,4690	0,0353	NS	NS	NS
Insaturados	49,8256	49,9593	49,4573	52,4787	0,4153	NS	0,0327	0,0491

⁽¹⁾ Tratamentos: CM – adição de monensina; SM – sem monensina; CL – adição de levedura; SL – sem levedura. EPM – erro padrão da média. MON – efeito de monensina. ⁽²⁾ MON – efeito de monensina; LEV – efeito de levedura; INT – efeito de interação. ⁽²⁾ ALC – ácido linoléico conjugado; Insaturados – ácidos graxos monoinsaturados + ácidos graxos poliinsaturados.

Pode-se observar que o perfil de ácidos graxos da carne está muito diferente do perfil encontrado no duodeno. Isso, provavelmente, devido à ação da enzima Δ^9 -dessaturase. Esta enzima promove a dessaturação de ácidos graxos saturados à insaturados e de monoinsaturados a poliinsaturados (Bauman & Lock, 2006). A percentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados trans reduziu comparando o perfil lipídico do conteúdo de duodeno com a carne, por outro lado a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados, ALC e Insaturados aumentou, reforçando a hipótese da ação da enzima. O mecanismo de ação da dessaturase ainda não é muito bem entendido, mas faz grande diferença na composição lipídica da carne de bovinos.

6 CONCLUSÕES

O uso de monensina em dieta com óleo de girassol reduziu o número de protozoários e aumentou a eficiência alimentar, assim como a porcentagem de C18:1 trans10-11 e de C18:2 t11c15 na carne.

O uso de levedura aumentou a degradabilidade efetiva da MS, o NDT da dieta, os protozoários ciliados, o pH ruminal, a expressão relativa da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, a ingestão de MS dos animais confinados, os ácidos graxos insaturados no conteúdo duodenal e os ácidos graxos saturados na carne, e reduziu a eficiência alimentar, os ácidos graxos saturados no conteúdo duodenal e os ácidos graxos insaturados na carne.

Houve interação para a digestibilidade da FDN, ingestão de matéria seca por quilo de peso metabólico, espessura de gordura subcutânea, e ácidos graxos insaturados na carne, sendo que nas três primeiras variáveis o resultado foi redução das mesmas pelo uso conjunto dos aditivos. Em relação aos ácidos graxos insaturados na carne, houve redução da porcentagens destes com o uso de aditivos.

Estudos devem ser conduzidos de modo a elucidar o modo de ação das dessaturases da absorção à deposição dos ácidos graxos na carne, assim como o efeito dos aditivos nos microorganismos ruminais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, C.G.; MERCHEN, N.R.; DRAKLEY, J.K. The effect of roasting temperature applied to whole soybeans on site of digestion by steers: 1.Organic matter, energy, fiber, and fatty acid digestion. **Journal of Animal Science**. V.73, p.2120-2130. 1995.
- BAUMAN, D.E.; CORL, B.A.; PETERSON, D.G. The biology of conjugated linoleic acid in ruminants. In: SEBEDIO, J.; CHRISTIE, W.W.; ADOLF, R. **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. AOCS Press, Champaign, IL. v. 2, pp: 146-173. 2003.
- BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, R.A.; PALMQUIST, D.L. Effects of Amount and Source of Fat on the Rates of Lipolysis and Biohydrogenation of Fatty Acids in Ruminal Contents. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2564-2573. 2000.
- BENCHAAR,C.; PETIT, H.V.; BERTHIAUME,R.; WHYTE, T.D.; CHOUINARD, P.Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.89, p.4352–4364. 2006.
- BERTRAND, J.A.; GRIMES, L.W. Influence of Tallow and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract in Dairy Cattle Rations. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1179-1184. 1997.
- BRANT, R.T.; ANDERSON, S.J. Supplemental fat source affects feedlot performance and carcass traits of finishing yearling steers and estimated diet net energy value. **Journal of Animal Science**. v. 68, p.2208-2216. 1990.
- CHRISTIE, W.W. The composition, structure and function of lipids in the tissue of ruminant animals. In: **Lipids Metabolism in ruminant Animals**. Ed. W.W. Christie, Pergamon Press, Oxford, UK, p. 95-191, 1981.
- CLARY, E.M.; BRANDT JR., R.T.; HARMON, D.L.; *et al.* Supplemental fat and ionophores in finishing diets: feedlot performance and ruminal digesta kinetics in steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3115-3123, 1993.

DEHORITY, B.A. **Rumen Microbiology**. Thrumpton, Nottigham, Nottigham University Press, 2003. 372 p.

DHIMAN, T.R.; ZAMAN, S.; OLSON, K.C.; BINGHAM, H.R.; URE, A.L.; PARIZA, M.W. Influence of feeding soybean oil on conjugated linoleic acid content in beef. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v. 53, p.684-689. 2005.

ERWIN, W.S.; MARCO, G.J.; MERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal Dairy Science**, v. 44, p. 1768-1771, 1961.

FELLNER, V.; SAUER, F.D.; KRAMER, J.K.G. Effect of nigericin, monensin, and tetrosin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 921-928, 1997.

FIRKINS, J.L.; WEISS, W.P.; EASTRIDGE, M.L. HULL, B.L. Effects of feeding fungal culture extract and animal-vegetable fat on degradation of hemicellulose and on ruminal bacterial growth in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1812-1822. 1990.

GOODRICH, R.D.; GARRET, J.E.; GAST, D.R.; KIRICK, M.A.; LARSON, D.A.; MEISKE, J.C. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v. 58, p. 1484-1498. 1984.

HANKINS, O. G.; HOWE, P. E. **Estimation of the composition of beef carcasses and cuts**. Washington, USDA, 1946. (Tech. Bulletin 926).

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extration of tissues of low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v.90, p.420-426, 1978.

HINO, T.; SHIMADA, K. MARUYAMA, T. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p.1827-1831. 1994.

HYDEN, S.A. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. **Kungl Lantbruks-Högskolans Annales**, v.22, p.139-145, 1956.

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 106, p. 39-57. 2003.

IVAN, M.; MIR, P.S.; KOENIG, K.M.; RODE, L.M.; NEILL, L.; ENTZ, T.; MIR, Z. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 215-227, 2001.

JENKINS, T.C.; FELLNER, V.; MCGUFFEY, R.K. Monensin by fat interactions on *trans* fatty acid in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 324-330. 2003.

KEPLER, C.R.; HIRONS, K.P.; MCNEILL, J.J.; TOVE, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. The Journal of Biological Chemistry. v. 241, p.1350-1354. 1965.

KIM, Y.J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J.L.; RUSSELL, J.B. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal of Applied Microbiology** V.92, p.976-982. 2002.

KOBAYASHI, Y.; WAKITA, M.; HOSHINO, 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**. v. 36, p.67-76. 1992.

KUMAR, U.; SAREEN, V.K.; SINGH, S. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diets. **Journal of Science of Food Agriculture**. v.73, p. 231-236. 1997.

MARMER, W.N.; MAXWELL, R.J.; WAGNER, D.G. Effects of dietary monensin on bovine fatty acid profiles. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v.33, p. 67-70. 1985.

MARTIN, S.A.; NISBET, D.J. Effect of directed fed microbials on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 1736-1744. 1992.

McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R.J.; BEEVER, D.A., NEWBOLD, C.J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environmental Microbiology**. v.69, p.5011–5014. 2003.

MIR, P. S.; MCALLISTER, T. A.; ZAMAN, S.; MORGAN JONES, S. D.; HE, M. L.; AALHUS, J. L.; JEREMIAH, L. E.; GOONEWARDENE, L. A.; WESELAKE, R. J.; MIR, Z. Effect of dietary sunflower oil and vitamin E on beef cattle performance, carcass characteristics and meat quality. **Canadian Journal of Animal Science**. v.83, p.53–66. 2003

MIR, P. S.; MIR, Z.; KUBER, P. S.; GASKINS, C. T.; MARTIN, M. V.; DODSON, M. V.; ELLIAS CALLES, J. A.; JOHNSON, K. A.; BUSBOOM, J.R.; WOOD, A. J.; PITTENGER, G. J.; REEVES, J. J. Growth, carcass characteristics, muscle conjugated linoleic acid (CLA) content and response to intravenous glucose challenge in high percentageWagyu, Wagyu × Limousin and Limousin steers fed sunflower oil-containing diets. **Journal of Animal Science**. v. 80, p.2996–3004. 2002.

MIR, Z.; MIR, P. S. Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and in situ degradability. **Journal of Animal Science**. v. 72, p.537–545. 1994.

MOLONEY, A.P.; DRENNAN, M.J. The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. **Animal Feed Science and Technology**. v. 50, p. 55-73. 1994.

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

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

OLDICK, B.S.; FIRKINS, J.L. Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2412-2420. 2000.

ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F. D. DEB.; MOULD, F. Uso de la tecnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. **Prod. Animal Trop.**, n. 5, p. 213, 1980.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science.**, v.92, n.1, p.499-503, 1979.

PALMQUIST, D.L.; WEIBSJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Ruminant, intestinal, and total digestibility of nutrients in cow fed diets high in fat and undegradable protein. **Journal of Dairy Science**. v.26, p. 1353-1364. 1993.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**. v. 32, p.853–858. 1997.

PARODI, P.W. Milk fat in human nutrition. **Australian Journal of Dairy Technology** 59, 3–59. 2004

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S.; PEDREIRA, M.S.; LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P.B. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, p.277-283. 2004.

REVERDIN, S.G.; BEZAULT, N.; SAUVANT, D.; BERTIN, G. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science and Technology**. v. 63, p. 149-162. 1996.

ROSSI, F.; LUCCIA, A.D.; VINCENTI, D.; COCCONCELLI, P.S. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolismo f the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. **Animal Research**. v.53, p.177-186. 2006.

SILVA, J.D.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 156p.

TAUBES, G. The soft science of dietary fat. **Science**, v. 251, p. 2536-2541, 2001.

TURPEINEN, A.M.; MUTANEN, M.; ARO, A.; SALMINEN, I.; BASU, S.; PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. V.76, p.504–510. 2002.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; SILVA, S.L.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídio e monensina na alimentação de novilhos Nelore e sua relação com a população de protozoários ciliados do rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, p. 1418-1423. 2005.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; SILVA, S.L.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídio e monensina sódica na fermentação, cinética e degradabilidade ruminal de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, p. 117-124. 2006.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D.I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2797-2806, 1995.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca, London: Cornell University, 1994.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C.J.. Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast cultures as feed additives. In: T. P. Lyons (Ed.) **Biotechnology in the Feed Industry**. p 173. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY, 1993.

WEATHERBURN, M.V. Phenol-hipochlorite reaction for determination of ammonia. **Analisis Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEIMER, P.J.; WAGHORN, G.C.; ODT., C.L.; MERTENS, D.R. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulytic bacteria in lactating cows. **Journal of Dairy Science**. v.82, p.122-134. 1999.

WESTBERG, H.H.; JOHNSON, K.A.; COSSALMAN, M.W.; MICHAL, J.J. **A SF6 tracer technique**: methane measurement from ruminants. Washington State University, Pullman, Washington, 1998. 40p. 1998.

WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. **Shear force procedures for meat tenderness measurement**. Roman L. Hruska U.S. Marc. USDA, Clay Center, NE, 2001.

WILLIAMS, P.E.V.; TAIT, C.A.G.; INNES, G. M.; NEWBOLD, C. J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **Journal of Animal Science**. v.69, p. 3016-3026. 1991.

ZINN, R. A. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. **Journal of Animal Science**. v. 66, p.213-227. 1988

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