

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

**EFEITO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS OU MONENSINA
SÓDICA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Álison Minozzo da Silveira

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Efeito de ácidos orgânicos ou monensina sódica sobre a fermentação ruminal

Álison Minozzo da Silveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS – Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silveira, Álisson Minozzo da
Efeito de ácidos orgânicos ou monensina sódica sobre a
fermentação ruminal / Álisson Minozzo da Silveira.-2013.
54 p.; 30cm

Orientador: Julio Viégas
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2013

1. Aditivos alimentares 2. Ionóforos 3. Técnica de
digestibilidade in vitro gás 4. Nitrogênio amoniacal 5.
pH I. Viégas, Julio II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS OU MONENSINA SÓDICA SOBRE
A FERMENTAÇÃO RUMINAL**

elaborada por
Álison Minozzo da Silveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Analívia Martins Barbosa, Dra. (UFBA)

Clair Jorge Olivo, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

A todos que foram importantes para que eu passasse mais esse obstáculo em minha caminhada.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, professor e orientador Dr. Julio Viégas, obrigado pela confiança, compreensão, apoio e dedicação.

Aos estagiários, Mestrandos, Doutorandos e amigos do setor de Bovinocultura de Leite, Stela, Cátia, Leticia, Lisi, Roty, Guidi, Tonin, Cerutti e Marcelo pelo grande apoio, ajuda e dedicação.

A todos meus amigos, sem privilegiar nomes, pela amizade, companheirismo, apoio e experiências transmitidas.

Ao amigo Diego, pela amizade e paciência durante as tardes de ajuda em relação ao Excel e SAS, sempre serei grato.

Ao amigo Abraão pela sua ajuda e apoio com as questões envolvendo o projeto e os experimentos.

Ao pessoal do LABRUMEN, Prof. Gilberto Vilmar Kozloski, e seus orientados, Cristiano, Tiago, Suélen e Gisele, pela amizade e pela ajuda na realização das análises laboratoriais.

Ao pessoal do LANA/CENA-USP, Profa. Ana Paula e do Laboratório do Departamento de solos da UFRGS-RS, Prof. Cimelio Bayer e Paulo Carvalho pela realização das análises cromatográficas.

Ao Prof. Paulo Pacheco pela colaboração durante a realização das análises estatísticas.

Aos meus pais e meu irmão pelo apoio e incentivo durante todo o tempo.

A minha namorada Hellen pelo apoio, paciência, dedicação e amor em todos os momentos.

Aos demais professores do PPGZ-UFSM, pelo convívio e colaboração com a minha formação.

Ao PPGZ pela oportunidade em fazer parte do seu corpo discente e ao Prof. Paulo Rorato e a Dona Olirta Giuliane, pela boa disposição em todos os momentos que se fizeram necessários.

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

A todos que, de forma indireta, colaboraram com este projeto.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS OU MONENSINA SÓDICA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

AUTOR: ÁLISSON MINOZZO DA SILVEIRA

ORIENTADOR: JULIO VIÉGAS

Data de Defesa: Santa Maria, 22 de Fevereiro de 2013.

Os aditivos alimentares são substâncias que controlam o metabolismo animal, aumentando a eficiência de utilização de alimentos e proporcionando maior produção animal. A monensina sódica é certamente a mais estudada e empregada, porém nos últimos anos sua utilização tem sofrido diversas restrições, principalmente pela União Européia e Estados Unidos, portanto, é fundamental o estudo de novas alternativas de aditivos que apresentem resultados satisfatórios no desempenho animal. Assim, foi conduzido um experimento avaliando, pela técnica de digestibilidade *in vitro* gás, o uso de produto à base de ácidos orgânicos em comparação à monensina sódica. Foram testados quatro tratamentos: CTL (sem aditivo), MON (monensina) e CTX 250 e 500 (aditivo orgânico 250 e 500ppm), com três repetições em um delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Foram avaliados os parâmetros de produção de gás, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metano (CH₄), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e pH. O tratamento MON aumentou (P<0,05) a produção de propionato e diminuiu (P<0,05) a produção de gás, CH₄, acetato, butirato, valerato, isobutirato, isovalerato, a relação de acetato/propionato e a produção total AGCC em relação ao CTL, não alterando a concentração de N-NH₃. Dos tratamentos com ácidos orgânicos CTX 250 e 500, somente o CTX 500 mostrou diminuição nas concentrações de N-NH₃, os demais parâmetros avaliados não mostraram alterações significativas (P>0,05) com adição dos ácidos orgânicos em relação ao CTL. Neste sentido a monensina sódica apresenta características de modulação do ambiente ruminal.

Palavras-chave: Aditivos alimentares. Ionóforos. Técnica de digestibilidade *in vitro* gás. Nitrogênio amoniacal. pH.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF ORGANIC ACIDS OR MONENSIN ON RUMINAL FERMENTATION

AUTHOR: ÁLISSON MINOZZO DA SILVEIRA

ADVISOR: JULIO VIÉGAS

Date Defense's: Santa Maria, February 22TH of 2013.

Food additives are substances that control animal metabolism, increasing the efficiency of feed utilization and providing greater animal production. Monensin is certainly the most studied and used, but in recent years its use has undergone several constraints, mainly by the European Union and the United States, so it is crucial to study new alternatives which present satisfactory results additives on animal performance. Thus, an experiment was conducted evaluating, by the *in vitro* gas technique, the use of a product based on organic acids compared to monensin. Four treatments were used: CTL (no additives), MON (monensin) and CTX 250 and 500 (250 and 500ppm organic additive) with four replications in a completely randomized design with repeated measures in time. Were evaluated the parameters of gas production, production of short chain fatty acids (SCFA), methane (CH₄), ammoniacal nitrogen (NH₃-N) and pH. MON treatment increased (P <0.05) propionate production and decreased (P <0.05) gas production, CH₄, acetate, butyrate, valerate, isobutyrate, isovalerate, the ratio of acetate/propionate and SCFA total production relative to CTL, not changing the NH₃-N concentration. Treatments with organic acids 250 and CTX 500, CTX 500 only showed a decrease in the concentrations of NH₃-N, the other parameters showed no significant changes (P >0.05) with the addition of organic acids in relation to CTL. In this sense the monensin presents characteristics of modulation rumen environment.

Keywords: Food additives. Ionophores. In vitro gas digestibility technique. Ammoniacal nitrogen. pH.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Valores acumulados de produção de gás (ml) observados para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 96 horas de fermentação *in vitro* gás. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação.36
- Figura 2 – Valores acumulados de produção de metano (CH₄) observados para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 96 horas de fermentação *in vitro* gás. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação.37
- Figura 3 – Concentração de acetato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação38
- Figura 4 – Concentração de propionato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação39
- Figura 5 – Concentração de butirato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação40
- Figura 6 – Concentração de valerato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação41

- Figura 7 – Concentração de isobutirato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação 42
- Figura 8 – Concentração de isovalerato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação 43
- Figura 9 – Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas dos parâmetros de produção de gás, taxa de degradação, produção de metano (CH ₄), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), Nitrogênio amoniacal e pH observados através da fermentação in vitro gás sob efeito da adição de Monensina Sódica (Rumensin®) e Aditivo a base de ácidos orgânicos.....	32
--	----

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
2.3 Hipóteses	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Utilização de aditivos alimentares	15
3.2 Ionóforos.....	16
3.3 Ácidos orgânicos	18
3.4 Ambiente Ruminal.....	20
3.5 Técnica de produção de gases “in vitro”	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Local e época	26
4.2 Tratamentos.....	26
4.3 Produção “in vitro” de gás como estimativa da digestibilidade.....	26
4.3.1 Preparo dos alimentos para incubação	27
4.3.2 Inoculação com líquido ruminal.....	27
4.3.3 Leituras e interpretação.....	27
4.3.4 Determinação da proporção dos AGCC, N-NH ₃ e pH	28
4.3.5 Determinação da produção de metano	29
4.4 Delineamento experimental e análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O avanço científico sobre as exigências dos animais e dos valores nutritivos dos alimentos disponibilizou aos pesquisadores o conhecimento técnico e as informações necessárias para o balanceamento de dietas precisas de acordo com cada categoria animal e nível de produção desejado (BERCHIELLI et al., 2011). Assim, a descoberta de substâncias que controlam o metabolismo animal, aumentando a eficiência de utilização de alimentos e proporcionando maior produção animal, deu origem a uma nova classe de substâncias denominadas de aditivos alimentares. Segundo a definição de Loyola e Paule (2006), aditivos são substâncias ou mistura de substâncias adicionadas à ração com a finalidade de incrementar a produção animal e também melhorar a qualidade dos produtos de origem animal. Entre os aditivos utilizados na alimentação de ruminantes atualmente estão os antibióticos ionóforos e não-ionóforos, leveduras, probióticos, prebióticos, óleos essenciais, extratos de plantas e ácidos orgânicos.

Os ionóforos foram utilizados inicialmente como coccidiostáticos na avicultura, passando a ser utilizados também como promotores de crescimento para bovinos desde 1975. São produzidos por várias linhagens de *Streptomyces*, existindo mais de 120 diferentes ionóforos descritos, diferindo entre si pela especificidade por cátions. A monensina sódica é certamente a mais estudada e empregada, porém nos últimos anos sua utilização tem sofrido diversas restrições, principalmente pela União Europeia, que em 25 de maio de 2002, propôs, a partir de janeiro de 2006, banir de seu mercado qualquer produto animal que tenha sido produzido com uso de antibióticos promotores de crescimento, incluindo entre eles a monensina sódica (McCARTNEY, 2002). Essa nova legislação previa também a abolição da importação de produtos de origem animal provenientes de países que utilizam essa substância.

Tal medida almeja prevenir os efeitos de uma possível relação entre o aumento da incidência de microorganismos resistentes aos antibióticos, observada na medicina humana, e a utilização destas substâncias nas rações animais (MARINO et al., 2008). A OMS (Organização Mundial da Saúde) também considera o uso de antibióticos na produção animal um risco crescente para a saúde humana. Perante tais restrições, tem crescido o interesse pela utilização de outros aditivos,

surgindo então oportunidades para se pesquisar aditivos que ofereçam resultados semelhantes ao dos ionóforos, entretanto sem riscos à saúde humana.

Em vista disso, produtos orgânicos têm sido estudados com o intuito de manipular a fermentação ruminal e aumentar a eficiência alimentar dos animais. Portanto, é fundamental o estudo de novas alternativas de aditivos que apresentem resultados satisfatórios no desempenho animal como, por exemplo, uma solução orgânica, resultante da ativação do ácido ascórbico com ácidos orgânicos naturais (cítrico e láctico) em uma matriz de glicerina. Isso permitiria a substituição dos aditivos sintéticos como a monensina, por exemplo, por aditivos orgânicos, diminuindo assim, as limitações impostas por alguns mercados consumidores quanto ao consumo de leite e carne bovina produzida com promotores de crescimento de origem sintética.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 Objetivo geral

Avaliar “in vitro” o uso de uma solução de ácidos orgânicos, resultante da ativação do ácido ascórbico com ácidos orgânicos naturais (cítrico e láctico) em uma matriz de glicerina como alternativa ao ionóforo monensina sódica.

2.2 Objetivos Específicos

Quantificar a produção de gases “in vitro”, como parâmetro da atividade fermentativa de microrganismos ruminais sobre alimentos misturados a um produto à base de ácidos orgânicos ou monensina sódica;

Estabelecer a relação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos “in vitro” como parâmetro da atividade fermentativa de microrganismos ruminais sobre alimentos misturados ao aditivo à base de ácidos orgânicos ou ao ionóforo monensina sódica;

Quantificar a produção de metano e nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) “in vitro” como parâmetro da atividade fermentativa de microrganismos ruminais sobre alimentos misturados ao aditivo à base de ácidos orgânicos ou ao ionóforo monensina sódica.

2.3 Hipóteses

A adição de um produto a base de ácidos orgânicos altera a atividade fermentativa dos microrganismos ruminais, alterando assim os produtos da sua degradação (metano, AGCC e nitrogênio amoniacal).

O efeito dos ácidos orgânicos pode ser similar aos da monensina sódica, ou seja, diminuir a produção de metano, alterar a proporção de AGCC e diminuir a relação acetato/propionato e também alterar a produção de nitrogênio amoniacal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Utilização de aditivos alimentares

O avanço científico sobre as exigências dos animais e dos valores nutritivos dos alimentos disponibilizou aos pesquisadores o conhecimento técnico e as informações necessárias para o balanceamento de dietas precisas de acordo com cada categoria e nível de produção desejado (BERCHIELLI et al., 2011). Assim, a manipulação da fermentação ruminal para melhorar o desempenho produtivo de bovinos e ruminantes tem sido o objetivo de alguns nutricionistas por décadas (DILORENZO, 2004). Essa manipulação da fermentação é um esforço que levou a extensa pesquisa na área de microbiologia ruminal nas últimas décadas, com o objetivo de controlar alguns processos metabólicos no rúmen, atingindo assim uma utilização mais eficiente dos nutrientes (NAGARAJA, 2003).

A descoberta de substâncias que controlam o metabolismo animal, aumentando a eficiência de utilização de alimentos e proporcionando uma maior produção animal, deu origem a uma nova classe de substâncias denominadas de aditivos alimentares. Aditivos são ingredientes com ou sem valor nutricional que, ao serem fornecidos aos animais, irão promover ganhos metabólicos digestivos, auxiliando no incremento produtivo. Esses aditivos são administrados em pequenas quantidades na dieta durante longo período de tempo. Várias pesquisas evidenciam que existe uma grande variedade de aditivos com potencial de influenciar alguns componentes do metabolismo do rúmen, como inibidores de metano, de proteólise e de deaminação, antibióticos, agentes defaunantes, enzimas microbianas, alimentação com ácidos graxos e lipídios, agentes tamponantes, produção de propionato por ionóforos, probióticos, ácidos orgânicos, aditivos microbianos e surfactantes não-iônicos (BERCHIELLI et al., 2011).

Calsamiglia et al. (2006) consideram algumas rotas como objetivos da modulação da fermentação microbiana ruminal de alguns aditivos: 1- Aumentar a degradação da fibra e do amido; 2- Estimular a produção de propionato; 3- Inibir a produção de metano; 4- Controlar a concentração de lactato e o pH ruminal.

Em 2003, a União Europeia criou o EFSA (Autoridade Europeia da Segurança do Alimento), órgão que classificou os aditivos da alimentação animal em cinco categorias novas de acordo com a função:

- Aditivos tecnológicos: referem-se a qualquer substância adicionada ao produto destinado à alimentação animal com fins tecnológicos.
- Aditivos sensoriais: referem-se a qualquer substância adicionada ao alimento para melhorar ou modificar as propriedades organolépticas ou as características visuais.
- Aditivos nutricionais: referem-se a qualquer substância utilizada para manter ou melhorar as propriedades nutricionais do produto.
- Aditivos zootécnicos: referem-se a qualquer substância utilizada na melhoria do desempenho dos animais.
- Aditivos anticoccidianos: referem-se à substância medicamentosa utilizada na prevenção da coccidiose.

Atualmente, o desafio da exploração pecuária é estabelecer sistema de produção de ruminantes de maneira rentável, que respeite o bem-estar animal e, cujos produtos e resíduos não representem risco a saúde do consumidor ou ao meio ambiente. Uma estratégia para manter os níveis de produção sem reduzir os rendimentos é a utilização de aditivos na dieta, com permissão legal do seu uso, e cuja eficiência seja representativa na resposta animal (CAJA et al., 2003). Como os ionóforos são classificados atualmente como antibióticos, sua restrição ao uso nos sistemas de produção de ruminantes é iminente (NEWBOLD, et al. 2001).

3.2 Ionóforos

Os ionóforos são utilizados na alimentação de bovinos de corte desde a década de 70 quando foi lançado o primeiro antibiótico ionóforo. Esses aditivos são produtos da fermentação de vários actinomicetos, produzidos principalmente por fungos do gênero *Streptomyces*. Possuem efeito coccidiostático, o qual incide principalmente sobre a fermentação ruminal, causando melhorias na eficiência alimentar dos animais (NRC, 1996).

A ação desses promotores de crescimento ocorre pela alteração no crescimento e metabolismo dos microorganismos do rúmem, beneficiando o

desenvolvimento de bactérias gram-negativas em detrimento das gram-positivas. Os ionóforos são moléculas altamente lipofílicas, em função disso, acoplam-se à membrana das bactérias gram-positivas e permitem a passagem de sódio e prótons para o interior celular, dissipando o gradiente eletroquímico em nível de membrana. Isso diminui a entrada de substratos fermentáveis na célula e o metabolismo celular.

A dupla camada de membranas das bactérias gram-negativas as tornam resistentes aos ionóforos. Devido à redução da atividade fermentativa das bactérias gram-positivas, há menor produção de H₂ e CO₂ e menor oxidação de aminoácidos no rúmen. Consequentemente diminui a produção de metano e de amônia. Os ionóforos também aumentam a produção de propionato no rúmen, principalmente por favorecer o crescimento de bactérias gram-negativas produtoras de propionato. Além disso, em animais alimentados com dietas ricas em grãos, os ionóforos inibem bactérias produtoras de lactato, impedindo a produção de ácido láctico e a queda do pH ruminal (KOZLOSKI, 2009).

Com base nisso, as alterações que ocorrem na microflora ruminal provocam aumento da quantidade de ácido propiônico no rúmen, seguido por elevação dos níveis de glicose sanguínea (MAAS et al., 2001). Ocorre também diminuição dos ácidos acético e butírico (McGUFFEY et al., 2001) e da concentração de amônia, com posterior aumento do aporte de aminoácidos digeridos e absorvidos diretamente no intestino delgado (RUSSELL & STROBEL, 1989; HEGAZY & ELIAS, 1997). Basicamente o aumento da eficiência alimentar em animais que recebem ionóforo é resultado do aumento de produção de propionato, da redução da energia perdida como metano, do aumento da passagem de proteína do alimento para os intestinos sem ser degradada no rúmen (KOZLOSKI, 2009) e também reduzem o consumo devido melhor aproveitamento do alimento (SCHELLING, 1984).

Experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*” indicam que a monensina diminui a produção de metano, podendo diminuir a emissão de metano em 25% (VAN NEVEL & DEMEYER, 1995). Segundo O'Kelly & Spiers, 1992, à redução de emissão de metano com o uso de ionóforos é atribuído 55% a redução no consumo de alimento, e o restante, 45%, são devidos a efeitos específicos na fermentação ruminal. Em experimento “*in vitro*” de produção de gases, Morsy et al., (2010), observou que adição de monensina reduziu a produção de gás e a produção de metano, sem apresentar efeitos negativos sobre a digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca e da

matéria orgânica. Houve também aumento da produção de propionato, alterando assim a relação acetato:propionato.

A monensina sódica, pela ampla utilização comercial e vasta literatura científica, é proposta como o composto padrão para a comparação de efeitos entre substâncias com possível potencial em alterar benéficamente a fermentação ruminal. Seus efeitos considerados positivos em experimentos *in vitro* são: menor produção de gás e metano por unidade de substrato degradado, menor relação CH₄:Gás, maior degradação de substrato, maior concentração de AGCC totais ou propionato, menor concentração de acetato ou relação C₂:C₃ e menor concentração de isoácidos (CASTILLEJOS et al., 2008; SOLIVA et al., 2008)

Apesar do uso de ionóforos apresentar resultados satisfatórios em sistemas de produção intensivos, seu uso vem sofrendo intensa restrição por parte de determinados grupos de consumidores, o que induz a busca de alternativas que venham a substituir e alcançar os mesmos benefícios aos processos de fermentação ruminal (DILorenzo, 2004).

3.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são considerados seguros para serem usados como aditivos na alimentação animal, sendo uma alternativa aos antibióticos utilizados atualmente por criarem um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos probióticos. Existem alguns ácidos orgânicos que podem ser considerados como alternativas aos ionóforos e antibióticos promotores de crescimento utilizados como aditivos na nutrição de ruminantes. Alguns dos ácidos orgânicos com potencial para essa utilização são o aspartato, cítrico, succínico, pirúvico, málico e fumárico (MARTIN, 1998).

Silva et al. (2001), a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos resulta de sua ação lipofílica, durante a qual os íons de hidrogênio penetram a membrana celular do microrganismo, acidificando o seu interior e inibindo o transporte de nutrientes. Já para Adams (1999) a eficácia dos ácidos orgânicos puros ou combinados é o resultado da concentração, pKa e da capacidade de quelação dos ácidos. Segundo o autor os ácidos orgânicos tem sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, na síntese do DNA e no metabolismo energético dos microrganismos.

Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana com o bloqueio do substrato do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzem íons H⁺ que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez os ânions do ácido, impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique (CHOCT, 2004).

O uso dos ácidos orgânicos como aditivos na nutrição de ruminantes pode levar a benefícios semelhantes aos encontrados com a utilização dos ionóforos e antibióticos promotores de crescimento (CASTILHO et al., 2004), por exemplo, prevenindo a queda acentuada do pH ruminal (MONTANO et al., 1999), e reduzindo a produção e emissão de metano (ASANUMA et al., 1999). A maior parte dos estudos realizados com ácidos orgânicos como aditivos nutricionais concentram-se na utilização do ácido málico e/ou o ácido fumárico. Os ácidos málico e fumárico são dicarboxílicos tetracarbonados, presentes nos tecidos biológicos intermediários do ciclo do ácido cítrico (KHAMPA & WANAPAT, 2007).

O ácido málico altera de maneira favorável a fermentação ruminal através do aumento nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, ocasionando um aumento do ganho de peso diário e melhor conversão alimentar de bezerros em crescimentos alimentados com rações concentradas contendo esse ácido. Evidências mostram que a adição de ácido málico em meio rico em lactato estimula o desenvolvimento da bactéria *Selenomonas ruminantium*. Esta bactéria apresenta vantagens em relação aos outros microrganismos, sobrevive no rúmen por ser capaz de fermentar diferentes carboidratos solúveis e de utilizar o lactato, retardando assim o aparecimento de problemas metabólicos no animal (MARTIN, 1998). O ácido fumárico é considerado um dreno ativo de hidrogênio, pois os microrganismos utilizadores de fumarato, competem com as bactérias metanogênicas pelo H₂, diminuindo, portanto a produção de metano (ASANUMA et al., 1999), juntamente com a diminuição da metanogênese, ocorre um aumento na produção de propionato e acetato (LÓPEZ et al., 1999).

Callaway & Martin (1996), testaram a utilização conjunta entre monensina sódica e ácidos orgânicos (málico e fumárico) em ensaios de digestibilidade *in vitro* de milho quebrado, e encontraram resultados melhores no uso conjunto que na utilização isolada da monensina ou dos ácidos orgânicos para aumento do propionato, diminuição do lactato e aumento do pH final. Os autores explicaram que a melhora se deve pela soma dos efeitos, da diminuição da produção de lactato pelo *Streptococcus bovis* e do aumento da utilização de lactato pelas *Selenomonas ruminantium*.

Segundo Adams (1999) as funções dos ácidos orgânicos são variadas e amplas, nem todas relacionadas à nutrição. Produzem acidez, a qual por sua vez age como flavorizante e também retarda a degradação enzimática. Atuam como agentes quelantes que se ligam a metais formando os quelatos metálicos, os quais previnem ou reduzem a oxidação oriunda da catálise dos metais-íons. Agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano podendo ter uso na preservação de grãos e rações, sanitização da carne e como aditivo alimentar em rações.

O procedimento de adicionar ácidos orgânicos nas dietas de monogástricos (suínos e aves) tem sido empregado há mais de uma década, como por exemplo, o trabalho de Krause e Easter (1994), que adicionaram os ácidos fumárico, málico, cítrico e uma base inorgânica em dietas para leitões. Mas em ruminantes o uso é recente, e à necessidades de pesquisas que comprovem efeitos positivos na manipulação da fermentação ruminal.

3.4 Ambiente Ruminal

O rúmen apresenta um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico. O ecossistema é estável porque o ruminante saudável não sofre a contaminação do ecossistema, apesar de entrada de milhões de microrganismos no rúmen diariamente por meio dos alimentos, água e ar. É dinâmico pelo fato da população variar consideravelmente por alterações na dieta do animal. O rúmen é considerado um ecossistema aberto e contínuo, que proporciona um ambiente ideal para a manutenção da população microbiana estável, pela evolução de milhões de anos de seleção (KOZLOSKI, 2009).

Os ruminantes têm a capacidade de utilizar grande variedade de alimentos como fonte de nutrientes. O sucesso destes animais se deve a relação simbiótica do hospedeiro com microrganismos ruminais que possibilitam o uso da parede celular de vegetais e nitrogênio não protéico como fonte de nutrientes, compostos complexos e não utilizáveis para a maioria dos outros animais. A relação simbiótica ocorre porque o animal fornece alimento e um ambiente (rúmen) para o crescimento dos microrganismos que por sua parte, suprem o animal com ácidos resultantes da fermentação e proteína microbiana. O ecossistema do rúmen consiste principalmente de bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), protozoários (10^4 - 10^6 /mL), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoosporo/mL) e bacteriófagos (10^8 - 10^9 /mL) (KAMRA, 2005).

O pH ruminal exerce grande influência sobre o ambiente ruminal por permitir ou não a proliferação de determinadas espécies de microrganismos que habitam o rúmen, exercendo assim, grande impacto sobre o perfil de fermentação ruminal, além de outras influências, como motilidade e absorção ruminal. Quando o pH é alterado, a concentração de íons e a permeabilidade celular desses microrganismos podem mudar, reduzindo o potencial de geração de ATP. Assim, o crescimento microbiano por unidade de energia fermentada é menor quando o pH é baixo, possivelmente em virtude da redução na geração de ATP. Dessa forma, o perfil de fermentação é alterado pelo menor crescimento microbiano e pela redução da digestão da celulose, afetando a o perfil fermentativo dos microorganismos ruminais (NAGARAJA & TITGEMEYER, 2007).

No ecossistema anaeróbio do rúmen, os microrganismos fermentam carboidratos e proteínas para obter nutrientes necessários para seu crescimento. Muitos dos produtos finais dessa fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a proteína microbiana, são as principais fontes de nutrientes (energia e nitrogênio) para o ruminante. Em contrapartida, outros produtos da fermentação, como calor, metano e amônia, representam perdas de energia e proteína do alimento para o ambiente. De 2 a 12% da energia consumida pelos ruminantes pode ser perdida na forma de metano, um gás produzido no rúmen durante o processo de fermentação dos carboidratos. No rúmen, o hidrogênio é produzido durante a fermentação anaeróbia das hexoses. Esse hidrogênio pode ser usado durante a síntese dos AGCC e da matéria orgânica microbiana. O excesso de hidrogênio é eliminado, principalmente pela formação de metano (BAKER, 1999).

Os AGCC são estruturas hidrossolúveis ímpares e ramificadas, constituídas de um a cinco carbonos e se encontram altamente concentradas no rúmen (GONZALEZ, 2003). São produtos do metabolismo microbiano, sendo muito importantes para o hospedeiro, pois, sendo energéticos, suprem de 60% a 80% do requerimento energético dos ruminantes. Assim, é fundamental que o animal ruminante tenha boa capacidade de absorção desses (FURLAN et al., 2006). De acordo com KOZLOSKI (2009), a estequiometria da conversão de um mol de glicose para AGCC e a proporção em que cada ácido é produzido depende da espécie bacteriana, que pode ser especializada em produzir um ou outro de ácido e principalmente da concentração de nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e H_2 na célula.

Todos os carboidratos, digeridos no rúmen, transformam-se em AGCC sendo que os principais são o acético (C2), o propiônico (C3) e o butírico (C4) e suas concentrações e porções relativas dependem da dieta (LUCCI, 1997). Com dietas à base de forragem, o pH se mantém bastante estável devido à lenta digestão da fibra. As variações destas proporções com dietas à base de forragens são bruscas e não podem ser previstas. As mudanças que a taxa de fermentação sofre com dietas ricas em concentrados são mais fáceis de prever, pois a microflora é menos variada que nas dietas à base de forragem (CHURCH, 1993). Quando se diminui a proporção volumoso:concentrado, também diminui a proporção de acetato:propionato (C2:C3) (ANNISON & ARMSTRONG, 1970). A proporção C2:C3 é utilizada para comparar dietas e prever um valor nutritivo relativo. Em geral, quando na dieta se aumenta os níveis de celulose e hemicelulose em relação aos níveis de carboidratos solúveis e amidos, também se aumenta a proporção C2:C3 (MURPHY et al., 1982).

Ainda, podemos utilizar substâncias (aditivos) que alteram o padrão fermentativo, reduzindo a relação C2:C3, tornando o rúmen energeticamente mais eficiente e reduzindo a geração de CH_4 . Ao se produzir propionato não há produção de H^+ como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato. Além disso, as vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H^+ (RUSSELL, 2002). A produção de metano é modulada principalmente pela presença de CO_2 e de H^+ no ambiente ruminal, onde, a partir do H^+ , ocorre a redução do CO_2 por microrganismos metanogênicos, com conseqüente formação de metano (LASSEY et al., 1997). Logo, maximizar a produção de propionato é

competir com as metanogênicas por substrato, já que a rota para produção de propionato consome H^+ , que é necessário para a atividade das bactérias metanogênicas.

A intensidade da emissão de metano proveniente da fermentação ruminal depende principalmente do tipo de animal, do consumo de alimento e do grau de digestibilidade da massa ingerida. O metano, além de ser diretamente relacionado com eficiência da fermentação ruminal e conseqüente perda de energia nos sistemas de produção, caracteriza-se como um importante gás de efeito estufa, contribuindo com aproximadamente 15% do aquecimento global (COTTON & PIELKE, 1995).

Em relação aos compostos nitrogenados, pesquisas consideram que em rebanhos leiteiros, de 20% a 30% do nitrogênio (N) consumido diariamente encontram-se na proteína do leite e na carne produzida, sendo o restante excretado pelas fezes e urina (OENEMA et al., 2001). Ruminantes possuem baixa eficiência de utilização de N. Assim, alterar o metabolismo ruminal do N é ótima forma de reduzir o custo de alimentação desses animais, de maneira a melhorar o desempenho animal e reduzir a poluição ambiental causada pela uréia/ NH_3 (CALSAMIGLIA et al., 2007). Esse nitrogênio perdido pode ser lixiviado para lençóis freáticos ou emitido para atmosfera na forma de compostos voláteis. Deve-se considerar que concentrações superiores a 50mg de nitrato/L nos lençóis freáticos são potencialmente nocivas à saúde humana (DI & CAMERON, 2002). A emissão de amônia para a atmosfera contribui para a fertilização do ecossistema, acidificação e eutrofização do ambiente (NRC, 1996). Da mesma forma, óxido nítrico é um potente gás de efeito estufa, contribuindo para o aquecimento global. A redução na eliminação desses produtos tem concentrado os esforços dos pesquisadores mundiais para, além de aumentar a eficiência de conversão dos nutrientes consumidos em produtos consumíveis (carne e leite), reduzir o impacto dos sistemas de produção no ambiente.

Em termos simplificados, os principais objetivos da manipulação ruminal são: melhorar os processos benéficos, minimizar ou alterar os processos ineficientes, minimizar ou alterar os processos prejudiciais para o animal hospedeiro. Exemplos de processos cuja maximização seria válida em todas as circunstâncias são degradação da fibra, fermentação do lactato e conversão de compostos nitrogenados não-proteicos em proteína microbiana, enquanto os processos que

deveriam ser minimizados incluem a produção de metano, degradação da proteína e produção de amônia (BERCHIELLI et al., 2011).

3.5 Técnica de produção de gases “*in vitro*”

Técnicas de laboratório para avaliar alimentos certamente desempenham uma importante função nos futuros sistemas de produção animal (KRISHNAMOORTHY et al., 2005). Sistemas de fermentação *in vitro* são amplamente utilizados na identificação de substâncias capazes de manipular a fermentação ruminal (CASTILLEJOS et al., 2008; SOLIVA et al., 2008). Várias são as técnicas *in vitro* de produção de gás (GETACHEW et al., 2004). Dentre as principais vantagens dos métodos *in vitro*, encontram-se o baixo custo, a rapidez na obtenção de resultados, o elevado controle ambiental e a possibilidade de se trabalhar com grande número de tratamentos e baixas quantidades de amostra (MAKKAR, 2004). Graças a isto, é a técnica geralmente utilizada nas fases iniciais de pesquisa com novos aditivos alimentares.

As técnicas de produção de gases “*in vitro*” foram desenvolvidas para prever a fermentação de alimentos para ruminantes. O alimento é incubado com líquido ruminal, meio e os gases produzidos são medidos como indicadores indiretos da cinética de fermentação. Quando o alimento é incubado, este primeiramente é degradado e a fração degradada pode ser fermentada e produzir gases e ácidos da fermentação ou incorporar-se à biomassa microbiana (RYMER et al., 2005). O principal objetivo da técnica de produção de gases “*in vitro*” é prover informação que é relevante na interpretação de valores nutricionais de alimentos e/ou respostas animais e/ou impactos animais no ambiente (KRISHNAMOORTHY et al., 2005).

A técnica de produção de gases “*in vitro*”, baseada na simulação das fermentações ruminais em frascos de vidro inoculados com microrganismos ruminais tem sido utilizada com a finalidade de estudar o efeito de alimentos e aditivos que possuem fatores bioativos na fermentação ruminal e degradabilidade da matéria orgânica (BUENO et al., 2008). Segundo Bueno et al. (2005), os sistemas de produção de gases *in vitro* proporcionam uma estimativa da digestibilidade da matéria seca (MS) e/ou da matéria orgânica (MO), e são um indicador direto dos produtos finais produzidos, como a produção de gases, e indireta como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Ainda, em sistemas *in vitro* capazes de aprisionar o

gás gerado durante a fermentação, possibilitam determinar a concentração de CH₄ e de outros gases (CO₂, H₂, etc). Por esta razão, técnicas *in vitro* gás são sempre utilizadas em estudos com aditivos antimetanogênicos.

Segundo Getachew et al. (2004), a quantidade de gases produzidos de um alimento em incubação reflete a produção de AGCC, os quais são a principal fonte de energia dos ruminantes. Os gases surgem diretamente da degradação microbiana dos alimentos, e indiretamente da reação do tampão com os ácidos gerados como resultado da fermentação.

Wilkins (1974) descreveu uma aproximação diferente de medição das cinéticas de fermentação *in vitro*, onde a fermentação foi realizada em garrafas seladas e os gases produzidos foram determinados usando um transdutor ou sensor de pressão para medir o acúmulo de pressão na parte superior da garrafa, este princípio tem sido amplamente adotado por ser simples e sensitivo. A técnica *in vitro* de produção de gás utilizada neste trabalho foi a semiautomática com transdutor de pressão descrita em Theodorou et al. (1994) e Maurício et al. (1999). Frascos de vidro são preenchidos com líquido ruminal + meio de incubação + substrato, sendo em seguida selados e incubados em estufa ou banho-maria, permitindo dessa forma o acúmulo de gás dentro do frasco. A pressão interna do frasco é determinada periodicamente com o uso de transdutor de pressão. Logo, determina-se o volume de gás produzido utilizando curva de regressão “pressão × volume de gás” previamente definida para as condições laboratoriais. Conjuntamente com as leituras de pressão, são realizadas amostragens de líquido da fermentação e gás, que é armazenado em tubos a vácuo. Assim, posteriormente determina-se a concentração de AGCC no líquido coletado e também CH₄ no gás produzido. Esta é uma técnica robusta, precisa e que permite a incubação simultânea de muitas amostras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, no município de Santa Maria, RS, situado na região fisiográfica denominada Depressão Central, tendo como coordenadas, 29° e 43' de Latitude Sul e 53° e 42' de Longitude Oeste. No período de dezembro de 2011 a maio de 2012.

4.2 Tratamentos

Foram testados 2 tipos de aditivos, totalizando 4 tratamentos: CTL (Controle, ausência de aditivo), MON (ionóforo monensina sódica), CTX250 (aditivo orgânico, 250ppm) e CTX500 (aditivo orgânico, 500ppm). Para o tratamento MON foi utilizado o produto comercial Rumensin (Elanco®) na dosagem recomendada pelo fabricante, de 2g/animal/dia de Rumensin®. Já para os tratamentos CTX foi utilizado o produto comercial a base de ácidos orgânicos, resultante da ativação do ácido ascórbico com ácidos orgânicos naturais (cítrico e láctico) em uma matriz de glicerina, nas concentrações de 250 e 500ppm. Sendo que a concentração de 250ppm é a recomendada pelo fabricante.

Foi considerado como base de cálculo um bovino com peso vivo médio de 400kg e volume ruminal de 60L (15% do peso vivo), assim, proporcionalmente foram adicionados 1,67mg de Rumensin® para o tratamento MON, 1,69mg e 3,38mg do produto orgânico para os tratamentos CTX 250 e 500, respectivamente em cada frasco com 50 ml de solução de incubação.

4.3 Produção “in vitro” de gás como estimativa da digestibilidade

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP), para estimar a digestibilidade, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), N- amoniacal (N-NH₃) e metano (CH₄).

4.4 Preparo dos alimentos para incubação

Como alimentos foram utilizados feno de tifton (volumoso) e milho (concentrado), sendo eles pré-secos em estufa (55-60°C/72h) sob ar forçado, moídos em peneira de 1 mm tipo Willey. Esses alimentos foram utilizados como substrato de fermentação, obedecendo a relação volumoso:concentrado de 55:45. Os tratamentos com os aditivos foram adicionados, manualmente a mistura dos alimentos, conforme concentrações descritas acima. Amostras do substrato, pesando 0,5g, foram colocadas dentro de frascos de fermentação com capacidade de 100 mL de volume, onde foram adicionados 40 mL de meio de cultura (tampão), conforme descrito por THEODOROU et al. (1994). Os frascos foram vedados com rolhas (14 mm) de borracha e selados com anilhas de alumínio. Para evitar que qualquer tipo de fermentação ocorresse, os frascos ficaram armazenados em geladeira a 4°C no período (8-12h) que antecede a inoculação.

4.5 Inoculação com líquido ruminal

Os frascos contendo o substrato e meio de cultura foram removidos da geladeira e colocados em banho-maria a 39°C cinco horas antes da inoculação. O líquido ruminal foi obtido de um bovino fistulado e alimentado com a mesma dieta experimental à base de volumoso e concentrado; o material foi coletado e armazenado conforme a técnica descrita por Senger (2005). O líquido ruminal foi filtrado por duas camadas de gazes de algodão sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39°C. Volumes de 10 ml do líquido ruminal filtrado foram injetados nos frascos dos respectivos tratamentos supracitados; Frascos contendo líquido ruminal e meio de cultura (tampão) foram usados como brancos, para descontar a produção de gás vinda do líquido ruminal. Após a inoculação do líquido ruminal, os frascos foram vedados e colocados em banho-maria a 39°C com agitação constante por 96 horas, em uma sala com temperatura controlada.

4.6 Leituras e interpretação

A pressão originada pelos gases, acumulados na parte superior dos frascos, foi medida por intermédio de um transdutor de pressão conectado em sua

extremidade a uma agulha (0,6 mm). As leituras de pressão foram tomadas nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96h após incubação. A partir da inserção da agulha na tampa de borracha a pressão produzida no interior dos frascos foi lida no leitor digital do transdutor de pressão.

Para interpretação das leituras de pressão (psi= pressão por polegada quadrada) foi utilizada a seguinte equação $V = 4,9515p + 0,656$, desenvolvida no LABRUMEN da UFSM. Onde, V = volume de gás (mL); p = pressão mensurada (psi), essa equação matemática permite a conversão das medida realizadas em psi pelo transdutor de pressão para ml de gás. A produção total de gás foi considerada como a soma das produções parciais de cada leitura.

4.7 Determinação da proporção dos AGCC, N-NH₃ e pH

Para análise da relação de produção de AGCC, amostras de 1ml do líquido de fermentação dos frascos foram coletadas com seringa de 1ml e agulha nos tempos de incubação 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, essas amostras foram armazenadas em tubos eppendorfs, congeladas e enviadas em caixa isotérmica para o Laboratório LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP, Brasil. No laboratório para a determinação das concentrações dos AGCC (incluindo os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico), as amostras foram centrifugadas a 30.000 rpm por 30 minutos a 10°C, após ao sobrenadante de 0,5mL foi adicionado 0,1 mL de ácido fórmico, para análise em Cromatógrafo gasoso (SHIMADZU, modelo GC-2014), equipado com detector de ionização de chama (DIC), utilizando coluna capilar HP-INNOWax 19091N-213 (30m, 0.32mm, 0.5um). A temperatura do injetor foi de 200°C e do detector de 250°C. A injeção foi no modo “split”, com relação 1:30, utilizando o nitrogênio como gás de arraste. A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4).

Para determinação do N-NH₃, 100 µl de amostra do líquido de fermentação foi coletada, nos mesmos tempos das coletas de AGCC e diluídas e analisadas através do método fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). Após as 96 horas de

incubação, os frascos foram abertos e mensurou-se o pH com potenciômetro digital (Digimed DM21, São Paulo-SP).

4.8 Determinação da produção de metano

Para determinação do metano, um ensaio independente em relação ao de produção de gás e AGCC foi realizado com intervalos maiores de medição de pressão e coleta de gás, seguindo a mesma metodologia supracitada. Os tempos de leitura foram de 6, 12, 24, 48 e 96 horas, onde em cada tempo era feita a leitura da pressão, e com o uso de uma torneira de três vias acoplada ao sistema coletava-se uma amostra de 10 mL do gás produzido através de uma seringa que era armazenado em tubos a vácuo do tipo “extainer” e enviados ao Laboratório do Departamento de Solos da UFRGS-RS, onde as análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2014 Modelo “Greenhouse”) equipado com três colunas empacotadas operando à 80°C, utilizando N₂ como gás de arraste (25 mL min⁻¹), injetor (250 °C) com amostragem direta de 1 mL, e detector de captura de elétrons (DCE) com Ni63 a 325°C. No DCE utilizou-se uma mistura de 5% Argônio/Metano (P5) como gás “make-up”, para melhorar a detecção do N₂O.”

Para calcular a quantidade de metano produzido em cada intervalo de leitura, foi utilizada a equação matemática $Px_iV=n_iRT$ de fluxo de gases utilizada pelo mesmo laboratório. Onde P=pressão do sistema (atmosférica); x_i =fração molar do gás; V=volume de gás produzido; n_i =número de mols do gás (metano); R= constante dos gases ideais; T=temperatura. Os resultados de volume de gás produzido e da concentração de metano por cromatografia foram adicionados a equação sendo assim possível prever quanto de metano era produzido em cada intervalo, e com a soma da produção de metano de cada intervalo foi possível determinar a produção total de metano em 96 horas de incubação.

4.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental para produção de gases “in vitro” foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 3 repetições (frascos) e medidas repetidas no tempo.

Para a quantificação dos AGCC, N-NH₃ e metano o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições (frascos), em um esquema fatorial 4 x 5 com os fatores: 4 tratamentos (CTL, MON, CTX250 e CTX 500) e 5 tempos de incubação (AGCC e N-NH₃= 2, 6, 12, 24 e 48h; Metano= 6, 12, 24, 48, 96h).

Os dados de produção de gás, AGCC, N-NH₃ e metano foram submetidos à análise de variância e teste F, pelo procedimento PROC MIXED com base no seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + R_k(\beta_i) + \beta_{\alpha ij} + \epsilon_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = variáveis dependentes;

μ = média geral das observações;

β_i = efeito do i – ésimo tratamento;

α_j = efeito do j – ésima medida de tempo;

$R_k(\beta_i)$ = efeito da repetição aninhada em tratamento - erro a;

$\beta_{\alpha ij}$ = interação entre tratamento de índice i e medida de tempo de índice j.;

ϵ_{ijk} = erro residual – erro b.

Quando o teste F foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Os efeitos de tempo e interação tratamento*tempo foram submetidas à análise de regressão linear e polinomial (PROC REG), e a regressão não linear (PROC NLIN), conforme o modelo de Schnute's (SIT e POULIN-COSTELLO, 1994), todas análises através do pacote estatístico SAS (2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nos ensaios de fermentação *in vitro* gás estão expressos na Tabela 1, onde os parâmetros de produção de gás, metano e taxa de degradação foram analisados no final de 96 horas de fermentação e os dados de ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal em 48 horas.

A monensina sódica reduziu ($P < 0,05$) a produção de gás em relação ao controle, o que não foi observado para os tratamentos com ácidos orgânicos, CTX 250 e 500. Essa diminuição na produção de gás proporcionado pela monensina deve-se principalmente pela sua ação nas bactérias metanogênicas, proporcionando menor produção de metano e por consequência menor produção total de gás, como podemos observar na Tabela 1. Em média, a redução da produção de gás foi de 15% em relação ao Controle, enquanto a diminuição de metano foi mais significativa, em torno de 60%. Essa redução na produção de gás também foi observada por Araujo et al., (2010), que ao testar monensina sódica na técnica de sistema *in vitro* gás constatou uma diminuição média de 20%, com variações entre 15 e 25%. Experimentos *in vitro* indicam que a monensina diminui a produção de metano, podendo diminuir a emissão em 25% (VAN NEVEL & DEMAYER, 1995), podendo chegar a reduções na produção total de CH_4 de 48, 52 e 58%, como foram observadas ao usar *in vitro* 2,5; 5,0 e 12,5 mg/L de monensina, respectivamente (RUSSEL e STROBEL, 1989).

A maior parte dos estudos realizados com ácidos orgânicos como aditivos nutricionais concentram-se na utilização do ácido málico e/ou o ácido fumárico, intermediários do ciclo do ácido cítrico (KHAMPA & WANAPAT, 2007) que quando utilizados *in vitro*, observa-se os mesmos efeitos da monensina na diminuição da produção de gás e metano (MOHAMMED et al, 2004; CARRO & RANILLA, 2003). Já outros trabalhos (CALLAWAY e MARTIN, 1996; GOMEZ et al., 2005) observaram resultados semelhantes a esse, onde não houve redução da produção de gás e metano pela utilização dos ácidos orgânicos *in vitro*, como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1 Estimativas dos parâmetros de produção de gás, taxa de degradação, produção de metano (CH₄), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), Nitrogênio amoniacal e pH observados através da fermentação *in vitro* gás sob efeito da adição de Monensina Sódica (Rumensin®) e Aditivo a base de ácidos orgânicos

Item ¹	Tratamentos ²				Significância de P	CV (%)
	CTL	MON	CTX250	CTX500		
Gás, mL (96h)	81,06 ^a	69,23 ^b	82,63 ^a	80,53 ^a	0,0001	2,19
Tx. Degradação, %/h	3,47 ^a	2,26 ^b	3,50 ^a	3,52 ^a	0,0001	4,00
CH ₄ , µg (96h)	3607,0 ^a	1402,1 ^b	3595,2 ^a	3621,5 ^a	0,0001	4,62
AGCC, mM(48h)						
Total	93,77 ^a	81,87 ^b	92,26 ^a	93,82 ^a	0,0001	1,78
Acetato (%)	60,66 ^a (64,69)	47,93 ^b (58,54)	59,89 ^a (64,91)	60,95 ^a (64,96)	0,0001	1,60
Propionato (%)	18,45 ^b (19,67)	24,04 ^a (29,36)	18,17 ^b (19,69)	18,43 ^b (19,64)	0,0001	2,98
Isobutirato (%)	1,13 ^a (1,20)	0,79 ^b (0,96)	1,13 ^a (1,22)	1,12 ^a (1,19)	0,0001	4,27
Butirato (%)	10,57 ^a (11,27)	6,88 ^b (8,40)	10,10 ^a (10,94)	10,36 ^a (11,04)	0,0001	3,86
Isovalerato (%)	1,86 ^a (1,98)	1,33 ^b (1,62)	1,87 ^a (2,02)	1,84 ^a (1,96)	0,0001	4,49
Valerato (%)	1,08 ^a (1,15)	0,88 ^b (1,07)	1,08 ^a (1,17)	1,09 ^a (1,16)	0,0017	4,66
C ₂ :C ₃	3,28 ^a	1,99 ^b	3,29 ^a	3,30 ^a	0,0001	2,01
N-NH ₃ ,mg/dl(48h)	28,34 ^a	27,79 ^{ab}	26,66 ^{ab}	25,99 ^b	0,0619	3,52
pH	6,22	6,26	6,20	6,21	0,4494	0,66

1AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C2:C3 = relação acetato:propionato.

2CTL = Controle; MON = Monensina a 30ppm; CTX = Aditivo orgânico a 250 e 500 ppm.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P≤0,05), de acordo com o teste Tukey.

Há duas hipóteses para o decréscimo nas produções de gás e CH₄ causada pela monensina sódica. Primeiramente, monensina reduz a degradação *in vitro* da

matéria orgânica, fato sustentado pela menor ($P < 0,05$) taxa de degradação observada na Tabela 1, do tratamento monensina em comparação ao controle. Esta redução na degradação da matéria orgânica é uma típica limitação de experimentos *in vitro* de curta duração, pois a monensina inibe bactérias gram-positivas relacionadas à fermentação, o que inclui alguns *Ruminococcus* sp. celulolíticos (CHEN; WOLIN, 1979). Sob condições *in vivo*, não são observados efeitos deletérios sobre a degradação de fibra, já que nestas condições bactérias celulolíticas tolerantes à monensina são capazes de substituir aquelas sensíveis (RUSSELL e STROBEL, 1989).

A segunda explicação para a menor produção de gás e CH_4 é que monensina aumenta a produção de propionato (RUSSEL e STROBEL, 1989). De acordo com a estequiometria da produção de gases, a formação de propionato está associada a decréscimos nas produções de CO_2 e CH_4 (WOLIN, 1960). Por fim, protozoários ruminais são sensíveis à monensina, o que também causa redução de CH_4 . Já que esses são produtores de H_2 , que é utilizado pelas bactérias metanogênicas (RUSSELL e STROBEL, 1989) e vivem associados às *Archaea* metanogênicas. Provocando também diminuição dessas bactérias e por consequência diminuição da produção de metano (NEWBOLD et al., 1995).

As concentrações de AGCC totais e de cada AGCC (acetato, propionato, butirato, valerato, isobutirato e isovalerato) foram semelhantes ($P < 0,05$) entre os tratamentos com ácidos orgânicos e o controle em 48 horas de incubação *in vitro* gás. CARRO & RANILLA, 2003 observaram aumento da concentração total de AGGC, e também aumento da produção de propionato e butirato, sem alteração na produção de acetato, quando adicionado o ácido málico no sistema de cultivo *in vitro*. Porém Callaway e Martin, (1996), usando diferentes níveis dos ácidos orgânicos málico e fumárico não observaram alterações na concentração total de AGGC, resultado semelhante foi observado no tratamento com a mistura dos ácidos orgânicos nesse trabalho. Já no tratamento com monensina sódica houve alteração na proporção molar dos AGCC. Houve decréscimo de cerca de 12% em relação ao controle, na produção total de AGCC. Resultados diferentes dos observados por Makkar, (2004) e Castillejos et al., (2008) que observaram a mesma produção total de AGCC em relação ao controle. A concentração de acetato do grupo monensina sódica foi menor em torno de 21% em relação ao controle. Isso ocorre porque as bactérias gram-positivas são sensíveis à monensina, sendo elas grandes produtoras

de acetato (RUSSELL, 2002). Em decorrência da menor produção de acetato, há redução na produção de CO_2 e H_2 , fato que parcialmente explica a menor produção de CH_4 devido ao uso de monensina (CALLAWAY et al., 2003).

A concentração de propionato aumentou ($P < 0,05$) devido à inclusão de MON em cerca de 21% em relação ao controle. Sabe-se que o estímulo à produção de propionato causa redução na produção de CH_4 . As vias metabólicas produtoras de propionato competem com a metanogênese por H_2 (RUSSELL, 2002). Vários microrganismos produtores de propionato (Ex: *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*) não são afetados pelo fornecimento de monensina (CALLAWAY et al., 2003). A concentração de butirato e valerato foi menor ($P < 0,05$) para MON. A produção de butirato é normalmente reduzida por monensina, pois ionóforos inibem a bactéria gram-positiva *Butyrivibrio fibrisolvens*, que é considerada a maior produtora de butirato (RUSSELL, 2002).

Quanto aos isoácidos, o tratamento com MON reduziu ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato e isovalerato em cerca de 30% (Tabela 1). As reduções nas concentrações de isoácidos indicam menor deaminação, pois os mesmos são originados pelo catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, como a valina e leucina. A menor deaminação dietética no rúmen é compensada pelo seu maior aproveitamento no intestino delgado (RUSSELL, 2002). Isso leva a uma menor conversão de proteínas e aminoácidos a amônia, ocasionando diminuição nas perdas de amônia através de uréia na urina, proporcionando um aproveitamento maior de N da dieta. Busquet et al. (2006) também observaram menor concentração *in vitro* de isoácidos com 12,5 mg/L de monensina. A relação C2:C3 decresceu pela adição de MON ($P < 0,05$), mas não foi alterada pelos tratamentos com ácidos orgânicos, já que os valores de produção de acetato e propionato foram semelhantes ao controle. Apesar da menor relação C2:C3 proporcionada pela monensina, temos que salientar que a produção total dos AGCC foi reduzida com o seu uso.

Ao analisarmos a produção de nitrogênio amoniacal, podemos perceber que houve diminuição significativa ($P < 0,1$) da concentração de N-NH_3 para o tratamento com ácidos orgânicos na concentração de 500ppm em relação ao controle, já os tratamentos monensina sódica e ácidos orgânicos 250 ppm não diferiram ($P < 0,10$) em relação ao controle em 48 horas de incubação. Isso indica que possivelmente os ácidos orgânicos do presente trabalho controlem as bactérias proteolíticas e

deaminadoras, proporcionando uma redução da produção de nitrogênio amoniacal. Em contrapartida não foi observada alterações na produção dos isoácidos, que são produtos da degradação de aminoácidos e proteínas. Por isso devemos tratar com cautela essa redução de N-NH₃, necessitando de mais trabalhos que comprovem essa ação inibidora de proteólise e deaminação proporcionada pelos ácidos orgânicos.

Em relação a monensina, Morsy et al., (2010) também não observou diferença no N-NH₃ com a adição de monensina em trabalho *in vitro* comparando o seu efeito com o extrato de própolis. Já em trabalhos *in vivo* Russell et al. (1989) e Haimoud et al. (1995) constataram redução da produção de amônia causada pelo antibiótico ionóforo monensina sódica. Essa redução é causada pela sua atuação sobre as bactérias gram-positivas, uma vez que estas bactérias possuem alta especificidade para produção de amônia, ao contrário das bactérias gram-negativas, resistentes à monensina (BERGEN & BATES, 1984).

Não houve diferenças significativas nos valores de pH *in vitro* entre os diferentes tratamentos. A monensina sódica *in vivo* pode causar elevação de pH, principalmente por inibir bactérias produtoras de lactato, ex: *Streptococcus bovis*. (RUSSELL e STROBEL, 1989). Já os ácidos orgânicos (malato, fumarato e aspartato) em meio rico em lactato estimula o desenvolvimento da bactéria *Selenomonas ruminantium*. Esta bactéria apresenta vantagens em relação aos outros microrganismos, sobrevive no rúmen por ser capaz de fermentar diferentes carboidratos solúveis e de utilizar o lactato, retardando assim a queda do pH e o aparecimento de problemas metabólicos no animal (CALLAWAY E MARTIN, 1996). Todavia, é comum inexistir efeitos sobre o pH *in vitro*, já que este é controlado pelos agentes tamponantes do meio de cultura da técnica. Se existentes, o efeito está comumente relacionado à inibição da fermentação e menor produção de AGCC (BUSQUET et al., 2006).

Na Figura 1 podemos observar diferença significativa entre os tratamentos no decorrer do tempo, sendo que a monensina produziu menos gás em relação ao controle e aos tratamentos com ácidos orgânicos. Pode-se observar que até em torno das 10 horas a produção de gás foi semelhante entre os tratamentos, e após esse tempo a monensina diminuiu a produção de gás em relação aos demais tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato de que nessas horas iniciais de incubação as bactérias estão em fase de aderência e colonização, e a monensina

acaba não afetando a produção de gás. Já nas horas posteriores onde ocorre proliferação das bactérias, a monensina acaba agindo e diminuindo assim a população bacteriana e por consequência a produção de gás.

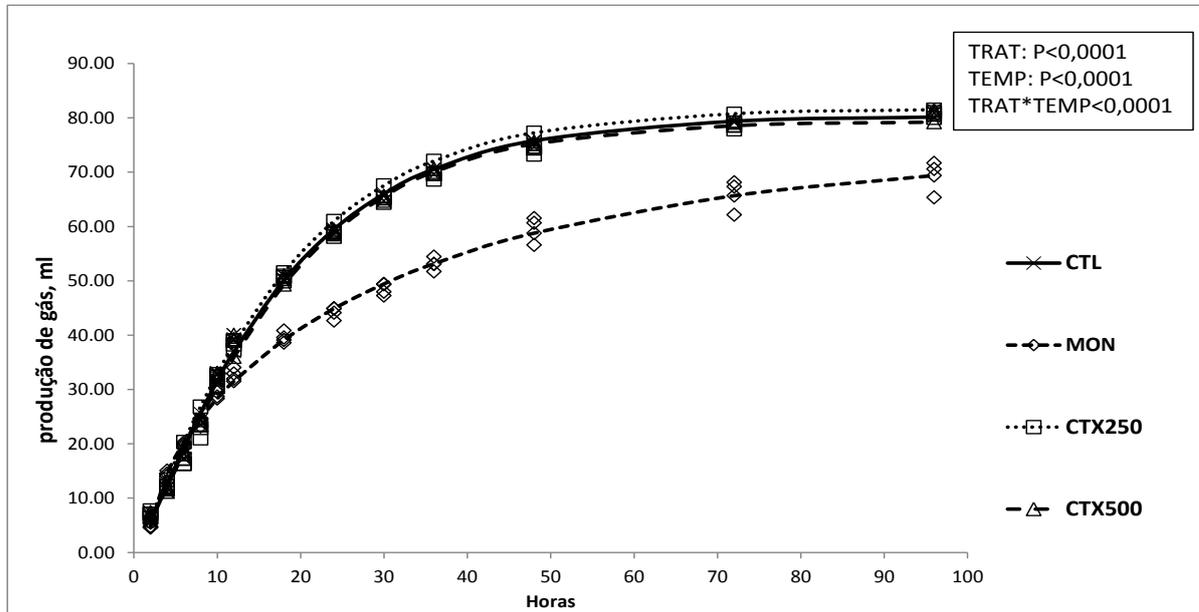


Figura 1 – Valores acumulados de produção de gás (ml) observados para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 96 horas de fermentação *in vitro* gás. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP=efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação.

Os valores encontrados neste trabalho para produção de gás foram semelhantes aos encontrados por Araujo et al., (2010), que ao comparar a monensina com alguns óleos essenciais, observou a produção de gás em 24 horas de fermentação em 54,2 ml para grupo controle e 40,7 ml para grupo monensina, enquanto os valores obtidos no presente trabalho foram de 59 e 43,93 ml para controle e monensina, respectivamente.

A menor produção de gás, observado com a adição da monensina, podem ser explicados pela sua ação sobre a metanogênese ruminal. Segundo Nagaraja et al. (1997), o uso de monensina promove redução nos precursores de metano, o que leva à queda na metanogênese entre 4 e 31%. Situação semelhante foi observada no presente trabalho (Figura 2), onde houve inibição da metanogênese com adição do tratamento monensina, sem observar os mesmos efeitos com a adição dos ácidos orgânicos em nenhum intervalo de tempo observado. Nas primeiras 6 horas

de fermentação a monensina reduziu em torno de 40% a produção de metano, chegando ao fim de 96 horas de fermentação, a uma redução de cerca de 60%. Quanto aos tratamentos com ácidos orgânicos não foram observados efeitos sobre a produção de metano, resultado semelhante encontrado por Callaway e Martin, (1996), que ao testar à adição do ácido orgânico málico em diferentes concentrações não observou efeito sobre a metanogênese e produção de metano.

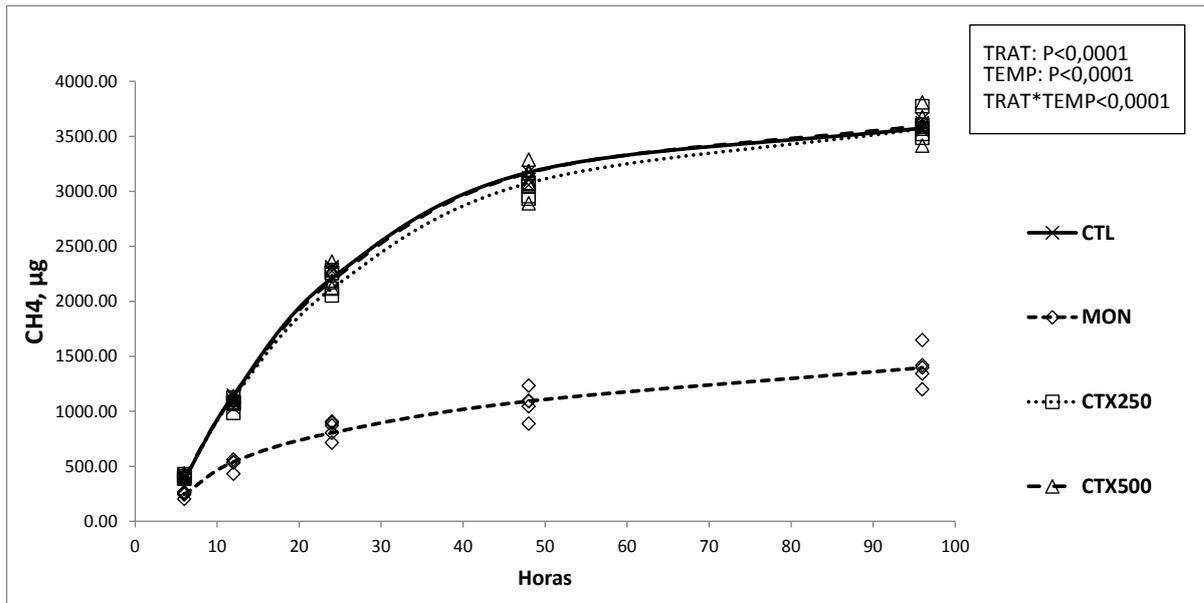


Figura 2 – Valores acumulados de produção de metano (CH₄) observados para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 96 horas de fermentação *in vitro* gás. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP=efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação.

Na figura 3 pode-se observar que houve interação entre tratamento e tempo, o tratamento com monensina sódica apresentou menor produção de acetato em relação ao controle e ácidos orgânicos no decorrer dos intervalos analisados. A produção de acetato de 50,45mM nas 24 horas foi similar as encontradas por Araujo et al., (2009), que ao testar duas fontes de substrato, uma somente volumoso (feno de tifton) e outra fonte com alto concentrado, observou valores de acetato do grupo controle de 50,59 e 54,3mM para cada fonte, respectivamente. Esse mesmo autor observou que houve diminuição da produção de acetato com a adição de diferentes concentrações de monensina somente para o ensaio com substrato a base de alto concentrado. Já para a produção de propionato o autor observou que houve um

aumento nas concentrações tanto para o substrato a base de feno de tifton quanto o substrato a base de alto concentrado, notando que esse aumento foi mais expressivo no substrato a base de alto concentrado.

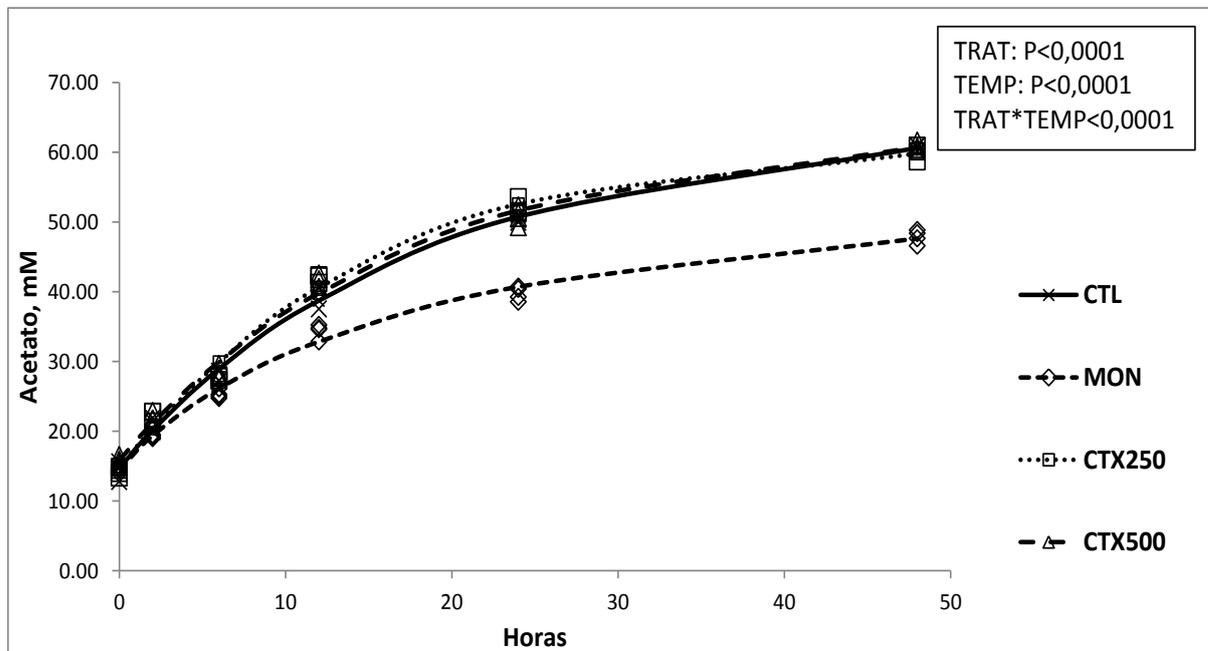


Figura 3 – Concentração de acetato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

Observa-se que a adição de monensina alterou tanto a produção de acetato (Figura 3), como também a produção de propionato (Figura 4), havendo interação entre tratamento e tempo. O grupo controle produziu 18,45 mM de propionato em 48 horas de fermentação, enquanto o grupo monensina produziu 23,61 mM e os grupos com ácidos orgânicos 250 e 500 ppm produziram 18,17 e 18,43 mM, respectivamente. Assim, constata-se que os efeitos proporcionados pela monensina na alteração da relação acetato/propionato não foram observados para os tratamentos com os ácidos orgânicos nas distintas dosagens utilizadas. Também, pode-se observar claramente na Figura 4, que até as 24 horas os tratamentos se comportam de uma forma semelhante, com valores crescentes de produção de propionato muito próximos, mas a partir das 24 horas os grupos controle e os ácidos

orgânicos sofrem uma queda de produção mas, a monensina mantém a produção crescente até atingir uma produção em torno de 21% maior que os demais tratamentos nas 48 horas de fermentação.

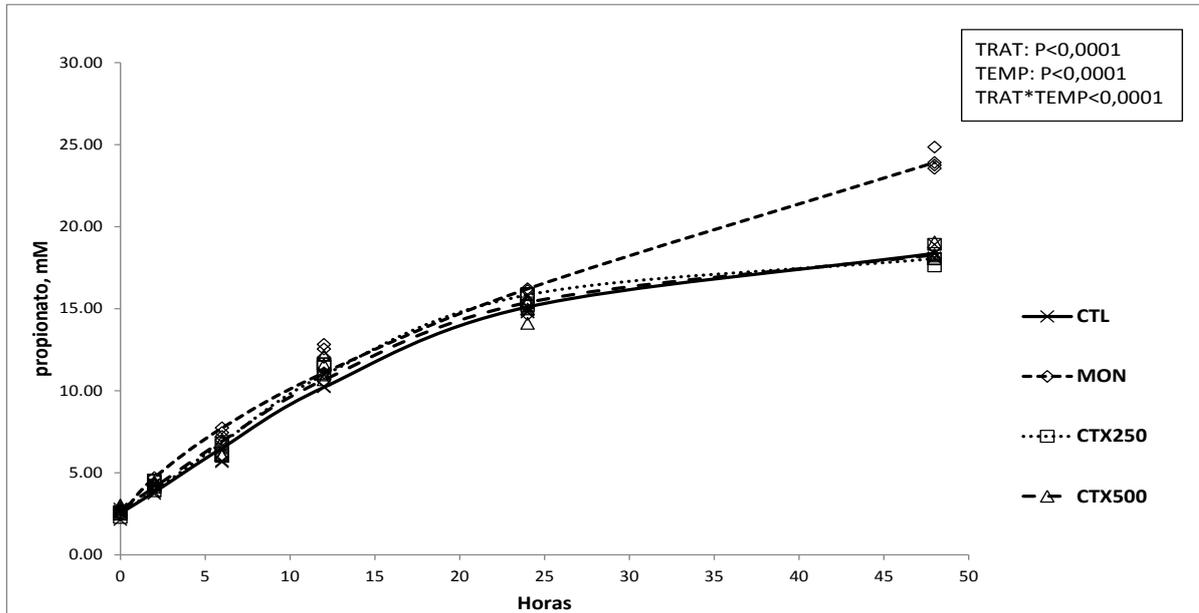


Figura 4 – Concentração de propionato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

Nas Figuras 5 e 6, são apresentados os valores de butirato e valerato, respectivamente, pode-se observar que como o acetato houve interação entre tratamento e tempo, apresentando um decréscimo de produção no tratamento com monensina, tanto nos níveis de produção de butirato como os de valerato. Não observando diferenças entre os tratamentos controle e ácidos orgânicos ao longo dos tempos avaliados. Percebe-se na Figura 6 que houve uma queda de produção de valerato no intervalo das 12 a 24 no tratamento com monensina, nos restantes dos tempos os tratamentos tiveram uma produção crescente semelhantes, apesar de serem menores as produções no uso da monensina.

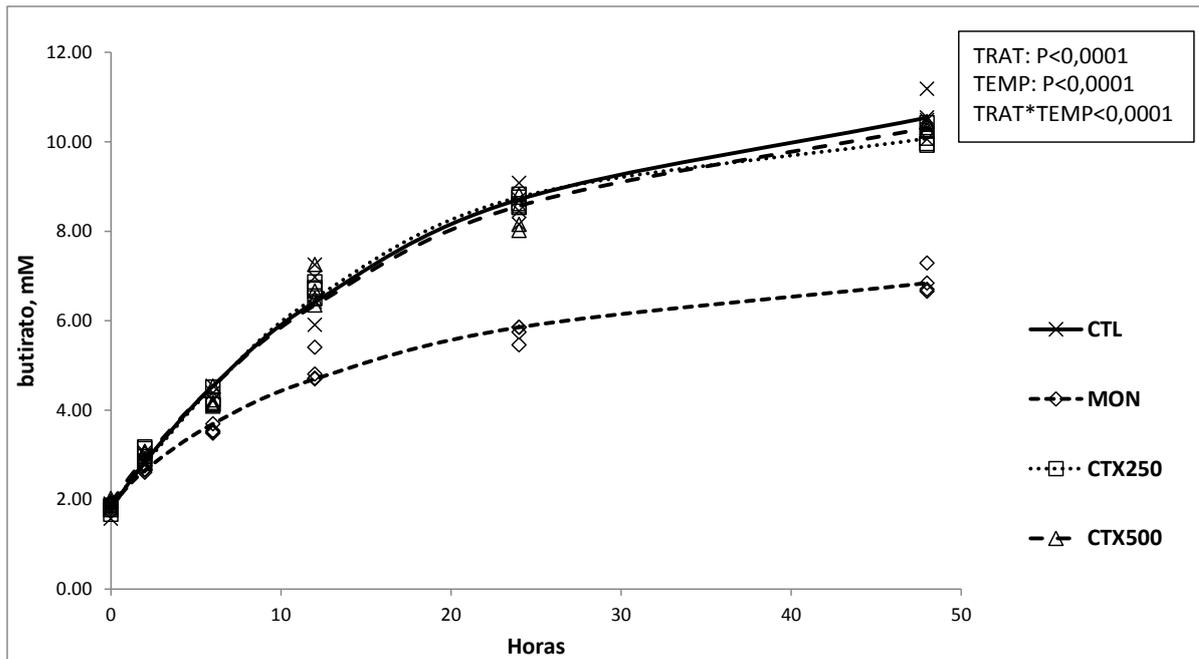


Figura 5 – Concentração de butirato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

O padrão de ácidos graxos cadeia curta como resultado da adição de monensina tem sido bem documentado na literatura em várias espécies de ruminantes, tanto em trabalhos *in vitro* como *in vivo*. Na maioria das vezes ocorre aumento da concentração de propionato e diminuição significativa das concentrações de acetato, butirato e valerato (GREEN et al., 1999; RUSSEL et al., 2002; ARAUJO et al., 2010; MORSY et al., 2010). Já para os ácidos orgânicos, existem poucas pesquisas sobre o padrão dos AGCC produzidos com a adição destes ácidos. No trabalho de Callaway e Martin, (1996), que testaram diferentes concentrações dos ácidos orgânicos fumárico e málico, observaram que não houve alterações significativas no padrão de produção de acetato, butirato, valerato e do isoácidos, mas eles observaram um aumento nas concentrações de propionato, que segundo os autores deve-se a ação dos ácidos orgânicos sobre as bactérias fermentadoras de ácidos láctico, como por exemplo, a *Selenomonas ruminatium*, que utiliza lactato para produzir como produto final propionato.

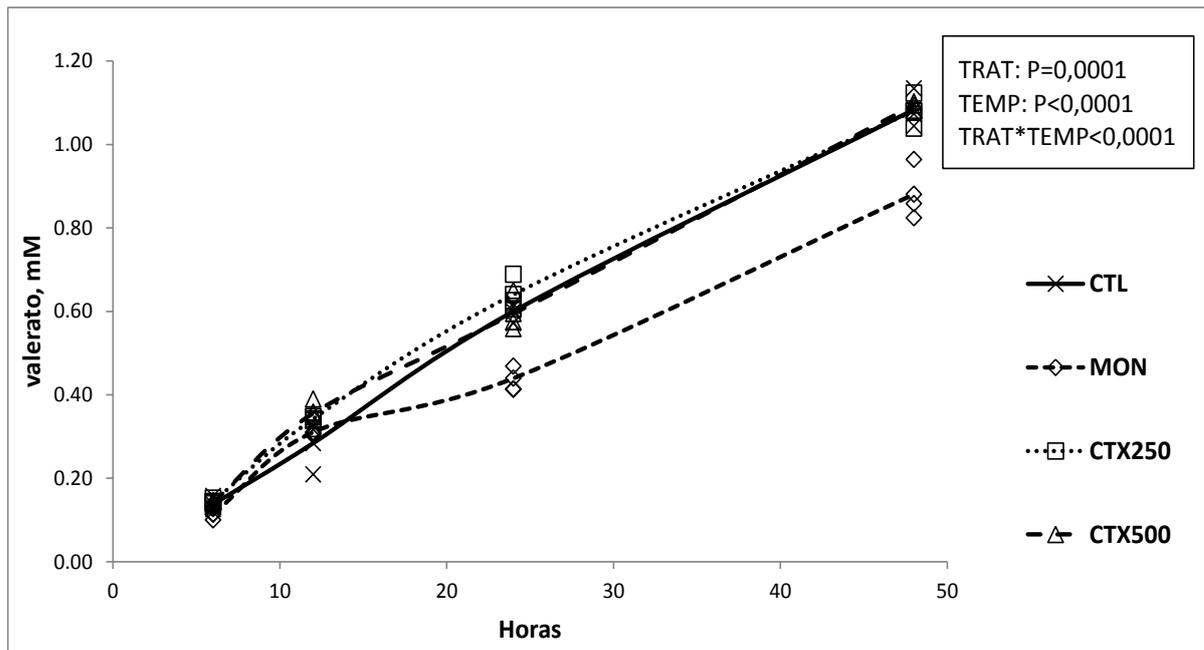


Figura 6 – Concentração de valerato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

Nos ruminantes a maioria do acetato e todo o propionato produzido na fermentação ruminal são transportados para o fígado, mas a maioria do butirato é convertido na parede ruminal em corpos cetônicos denominados de β - hidroxibutirato. As cetonas são importantes fontes de energia para a maioria dos tecidos do corpo. A maior parte do propionato é convertida em glicose no fígado. Além disso, o fígado pode utilizar aminoácidos para a síntese de glicose. Este é um processo muito importante, pois normalmente nenhuma glicose é absorvida pelo trato digestivo e precisa ser produzida no fígado.

Em vacas de leite durante a lactação, a glândula mamária tem grande necessidade (demanda) de glicose, que é utilizada principalmente na formação da lactose. A quantidade total de lactose sintetizada na glândula mamária está intimamente associada com a quantidade de leite produzida por dia. A concentração de lactose no leite é relativamente constante e a água é carregada à lactose até que sua concentração seja cerca de 4.5%. Portanto, a produção de leite de uma vaca é fortemente influenciada pela quantidade de glicose, que é derivada principalmente

do propionato ruminal. Já o β -hidroxibutirato e principalmente o acetato são usados para a formação dos ácidos graxos que ficam aderidos ao glicerol para a síntese de gordura pela glândula mamária, predominando por esta rota metabólica os ácidos graxos de cadeia curta e intermediária, que corresponde a cerca de 50% da gordura do leite, o restante vem dos lipídeos da dieta. (BERCHIELLI, et al., 2006)

Nas Figuras 7 e 8, são apresentados os resultados de produção dos isoácidos (isobutirato e isovalerato), é possível observar que houve, igualmente aos demais ácidos, interação significativa dos tratamentos com os intervalos de tempo analisados. A monensina diminuiu as concentrações dos isoácidos, isobutirato e isovalerato, que são produzidos pela degradação de aminoácidos no líquido de fermentação, principalmente no intervalo entre 6 e 24 horas, tendendo a aumentar a produção de isobutirato após as 24 horas. Não observando alterações nos isoácidos com a adição dos ácidos orgânicos.

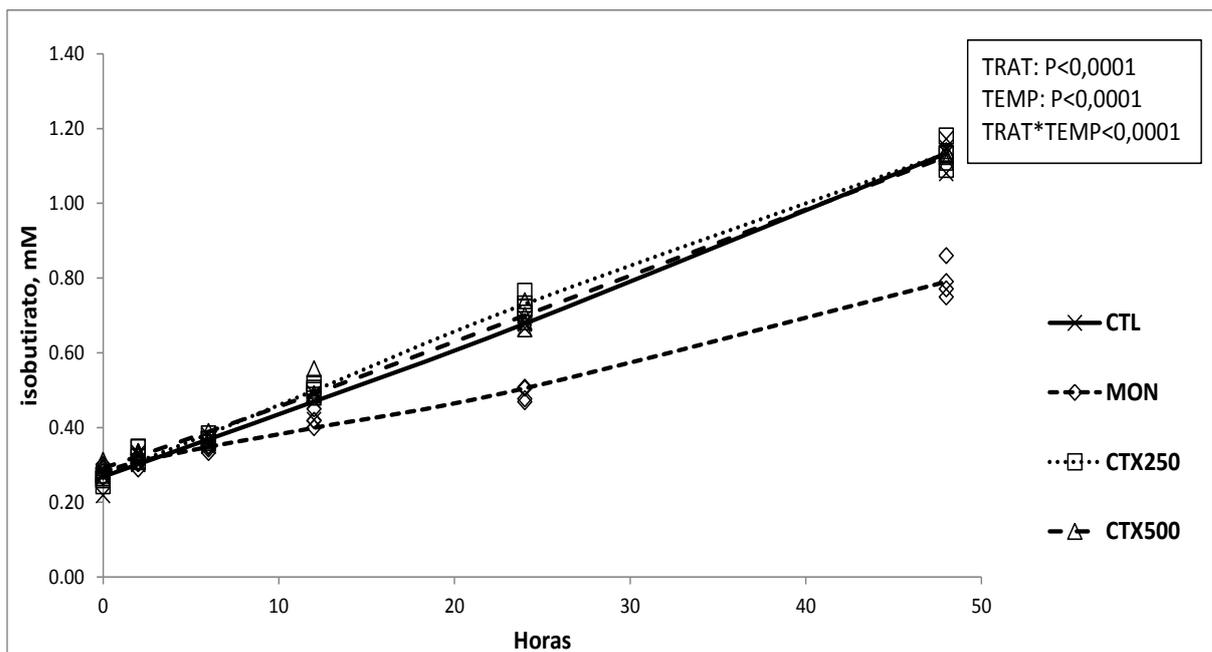


Figura 7 – Concentração de isobutirato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

Os isoácidos (isobutirato e isovalerato) encontrados no rúmen são resultado da oxidação e catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, como a valina e leucina. Em concentrações aumentadas indicam maior deaminação (RUSSELL, 2002). O tratamento com monensina reduziu as concentrações dos isoácidos, demonstrando menor atividade das bactérias proteolíticas pela sua ação, por consequência menor degradação de aminoácidos provenientes da dieta. Por outro lado, os isoácidos também podem ser usados como fatores de crescimento para bactérias celulolíticas (DEHORITY, 2003) assim, a estimulação de bactérias celulolíticas poderia significar maior consumo de isoácidos e, conseqüentemente, menor concentração dos mesmos ao final da incubação com a adição de monensina (ARAUJO et al., 2010)

Apesar de observar-se menor concentração dos isoácidos com a adição da monensina, na Figura 9 percebe-se que a concentração de Nitrogênio amoniacal, que indica degradação protéica não foi alterada com a adição da monensina

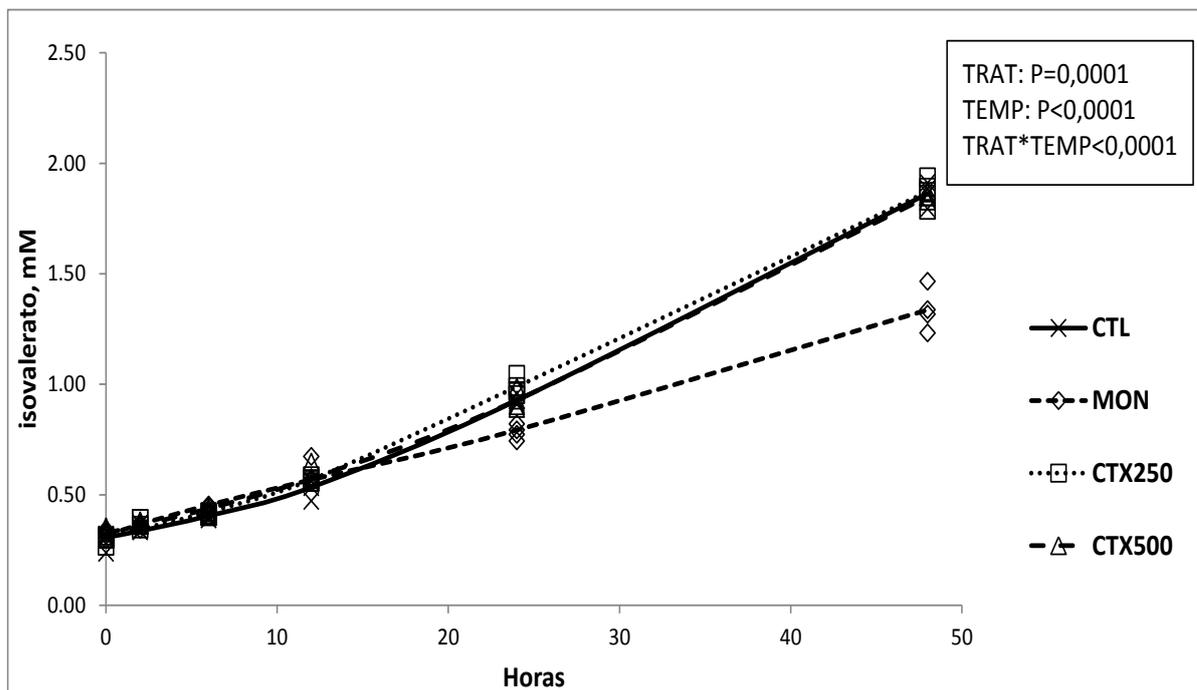


Figura 8 – Concentração de isovalerato observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação

Na Figura 9 pode-se observar que houve interação entre tratamento e tempo, indicando uma diminuição significativa ($P < 0,05$) para os tratamentos com ácidos orgânicos em relação aos demais tratamentos. Como mostrado na Tabela 1, onde houve menor produção de $N-NH_3$ para o tratamento com ácidos orgânicos a 500ppm, a figura abaixo também indica que esse tratamento produziu menores quantidades no decorrer do tempo. Observa-se também, que a curva do tratamento com ácidos orgânicos a 250ppm está muito próxima a de 500ppm, e essas duas curvas parecem apresentar menores produções que controle e o tratamento monensina.

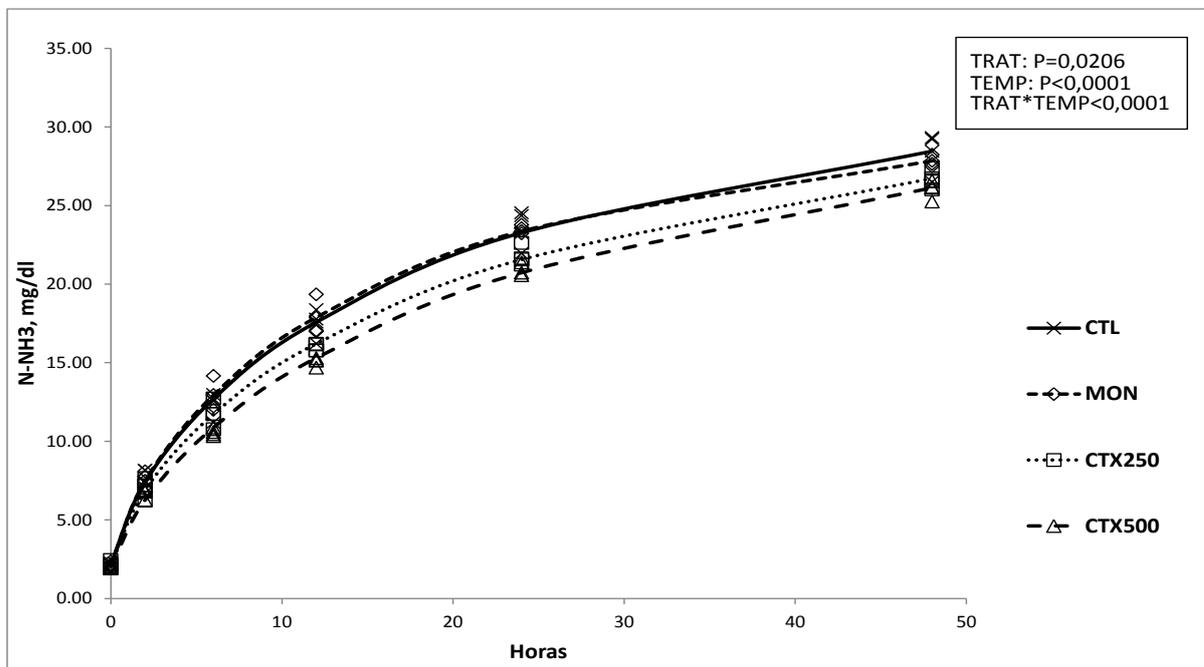


Figura 9 – Concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) observada para os diferentes tratamentos: controle, sem uso de aditivos (CTL), monensina sódica (MON) e aditivo orgânico a 250 e 500 ppm (CTX 250 e CTX500) respectivamente, em 48 horas de fermentação *in vitro* gás, dados acumulados ao longo do tempo. TRAT=efeito do tratamento; TEMP=efeito do tempo de incubação; TRAT*TEMP= efeito da interação entre tratamento e tempo de incubação.

Os resultados das pesquisas são controversos quanto as alterações de nitrogênio amoniacal proporcionados pela monensina. Morsy et al., 2010 comparando os efeitos da monensina com a própolis *in vitro* não observou alterações na produção de amônia em 24 horas de fermentação. Araujo et al., (2010) testando *in vitro* diferentes doses de monensina em dois tipos de dieta, uma

base alto concentrando e outra com feno de tifton, não observou alterações no nitrogênio amoniacal em nenhuma das doses de monensina e nem das dietas testadas. Borges et al., (2008) em trabalho *in vivo* comparando a monensina com a enramicina não observou alterações no nitrogênio amoniacal em coletas ruminais em diferentes intervalos de tempos após a alimentação. Já outros trabalhos observaram redução do nitrogênio amoniacal com uso da monensina. Rodrigues et al. (2004), utilizando diferentes doses de monensina e diferentes proporções concentrado/volumoso, observaram redução nos valores de nitrogênio amoniacal, independentemente dos níveis de monensina ou fibra na dieta. Mwenya et al. (2004) verificaram redução no valor de nitrogênio amoniacal em novilhas alimentadas com monensina.

Segundo Russell e Strobel, (1989) e Mwenya et al., (2004) a monensina diminui a atividade proteolítica obrigando as bactérias a fermentar carboidratos. Conseqüentemente, a concentração de amônia no rúmen pode diminuir, ocasionando redução na degradação de proteína e aminoácidos dos alimentos.

Quanto aos ácidos orgânicos, Callaway e Martin, (1996), usando diferentes níveis dos ácidos orgânicos málico e fumárico, observaram que houve diminuição do nitrogênio amoniacal com doses crescentes de ácido málico, mas não houve alterações com a adição do ácido fumárico. Já os trabalhos *in vitro* de Mohammed et al., (2004) e Sniffen et al., (2006) com ácido málico não observaram alterações na concentração de nitrogênio amoniacal.

6 CONCLUSÕES

Os ácidos orgânicos analisados não alteram a digestibilidade *in vitro* gás, não houve alteração na produção de gás, metano, concentração de ácidos graxos de cadeia curta total, bem como as proporções molares de acetato, propionato, butirato, valerato, isobutirato, isovalerato e pH. Os ácidos orgânicos diminuem a concentração de nitrogênio amoniacal.

A monensina sódica é um aditivo adequado para o uso como controle positivo em experimentos *in vitro* gás quando há a proposta de realizar a comparação ou avaliação de diferentes aditivos. A monensina sódica é capaz de alterar o padrão de fermentação, diminuindo a produção de gás e metano devido a menor taxa de degradação, além disso, alterou a proporção dos AGCC, aumentando a produção de propionato, diminuindo assim a relação acetato/propionato.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por novos aditivos alimentares ainda é um grande desafio para os pesquisadores. O benefício do uso, de muitos, são comprovados, e reputáveis, que é o caso da monensina sódica, mas seu uso vem sofrendo restrições. Por isso surge a necessidade da descoberta de novos aditivos alimentares a serem testados e descobertos. O uso dos ácidos orgânicos como aditivos nutricionais para ruminantes continua sendo promissor, porém, a grande maioria dos estudos realizados na área foi *in vitro* e concentrados em alguns ácidos, como málico e fumárico, com resultados favoráveis, porém bastante variáveis, que talvez não se repitam *in vivo*. Portanto mais estudos são necessários para a utilização de ácidos orgânicos como aditivos nutricionais em ruminantes. Infelizmente no nosso trabalho os resultados não foram satisfatórios com o uso do produto comercial a base de ácidos orgânicos.

Embora a investigação *in vitro* ainda seja necessária para a seleção de novos produtos e na determinação do mecanismo de ação, à uma necessidade urgente de realizar estudos *in vivo* para determinar a dose ótima do componente ativo, o potencial de adaptação da microflora ruminal para ação dos aditivos, o destino desses produtos no animal e a presença de resíduos na carne ou leite, e os efeitos sobre o desempenho animal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A., **Nutricines. Food components in Health and Nutrition.** Nottingham. Nottingham Univ. Press. 1999.

ANNISON, E. F.; ARMSTRONG, D. G. **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant.** England: Oriel Press, p. 422, 1970.

ARAUJO, R. C.; PIRES, A. V.; ABDALLA, A. L.; SANTOS, M. R. P.; MOHAMED, S. A. **Monensina sódica como controle positivo para estudos sobre manipuladores da fermentação ruminal utilizando a técnica de produção de gás in vitro** In: Anais da 46^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá - PR. v. 1. p. 1-3, 2009.

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

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; HINO, T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science.** v. 82, p. 780-787, 1999.

BAKER, S. K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, 50:1293, 1999.

BERCHIELLI, T. T.; CANESIN, R. C.; FIORENTINI, G.; RIBEIRO Jr, C. S. **Uso de fitocompostos e aditivos na modulação da fermentação ruminal.** In: Anais do III Simpósio Internacional - Avanços em Técnicas de Pesquisa na Nutrição de Ruminantes. Pirassununga: FZEA/USP, v. único. p. 87-114, 2011.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP, 2ed., 2006.

BERGEN, W. G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BORGES, L. F. O.; PASSINI, R.; MEYER, P. M.; PIRES, A. V.; RODRIGUES, P.H.M. Efeitos da enramicina e da monensina sódica no consumo de matéria seca, na fermentação ruminal e no comportamento alimentar em bovinos alimentados com dietas com alto nível de concentrado **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 681-688, 2008.

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

BUENO, I. C. S.; VITTI, D. M. S. S.; LOUVANDINI, H. et al. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 41, p. 153-170, 2008.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 761-771, 2006.

CAJA, G.; GONZÁLEZ, E.; FLORES, C. et al. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. **Produc. Anim.**, p. 193-214, 2003.

CALLAWAY, T. R.; MARTIN, S. A., Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. **Journal of Animal Science**. v.74, p.1982-1989, 1996.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.

CALSAMIGLIA, S., L. CASTILLEJOS, and BUSQUET, M. **Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle**. In Recent Advances in Animal Nutrition. Garnsworthy, P. C.; and Wiseman, J. (Eds). Nottingham University Press, Nottingham, p. 129-167. 2006.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARRO, M. D., RANILLA, M. J. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. **British Journal of Nutrition** 89, 279-288, 2003.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J.; TER WIJLEN, H. In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 259-270, 2008.

CASTILLO, C.; BENEDITO, J. L.; MÉNDEZ, J.; PEREIRA, V.; LÓPEZ-ALONSO, M.; MIRANDA, M.; HERNÁNDEZ, J. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v.115, p. 101-116, 2004.

CHEN, M.; WOLIN, M. J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 72-77, 1979.

CHOCT. M. **Effects of Organic Acids, Prebiotics and Enzymes on Control of Necrotic Enteritis and Performance of Broiler Chickens**. University of New England Armidale, 2004.

CHURCH, D. C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Metabolismo de la proteína en lo ruminantes.** Zaragoza: ACRIBIA, p. 255-258, 1993.

COTTON, W. R. and PIELKE, R. A. **Human impacts on weather and climate.** Cambridge University Press, p. 288, 1995.

DAVIES, Z. S.; MASON, D.; BROOKS, A. E.; GRIFFITH, G. W.; MERRY, R. J.; THEODOROU, M. K. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 205–221, 2000.

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology.** Thrumpton: Nottingham University Press, p. 372, 2003.

DI, H. J.; CAMERON, K. C. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, p. 237-256, 2002.

DILORENZO, N., **Effects of feeding polyclonal antibody preparations against rumen starch and lactic-fermenting bacteria on target bacteria populations and steer performance.** Saint Paul, Minnesota, USA: University of Minnesota, Master thesis submitted to the faculty of the graduate school of the University of Minnesota, p. 101, 2004.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. **Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP, v. 1, p. 583, 2006.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J. Relationship between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 57-71, 2004.

GÓMEZ, J. A., TEJIDO, M. L., CARRO M. D. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in rumen-simulation technique fermenters receiving medium- and high-concentrate diets. **British Journal of Nutrition** v. 93, p. 479–484, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C., **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 66, 2003.

GREEN, B. L.; McBRIDE, B. W.; SANDALS, D. et al. The impact of a monensin controlled-release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 333-342, 1999.

HAIMOUD, D.A; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C. et al. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 379-385, 1995.

HEGAZY, M. A. et al. Influence of dietary monensina and lasalocid on age and weight of Barki ram and ewe lambs at puberty. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 37, n. 74, p. 1-15, 1997.

KAMRA, D. N., Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 124-134, 2005.

KHAMPA, S.; WANAPAT, M. Manipulation of Rumen Fermentation with Organic Acids Supplementation in Ruminants Raised in the Tropics. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 6, p. 20-27, 2007

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2 ed. Santa Maria: UFSM. 2009.

KRAUSE, D. O.; HARRISON P. C.; EASTER R. A. Characterization of the nutritional interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick. **Journal of Animal Science**, v. 72(5), p. 1257-1262, 1994.

KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P. H. The in vitro gas production technique: limitations and opportunities. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n. 1, p. 1-7, 2005.

LASSEY, K.R.; ULYATT, M.J. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

LÓPEZ, S.; VALDÉS, C.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE. R. J., Influence of sodium fumarate on rumen fermentation in vitro. **British Journal of Nutrition**. v.81, p. 59-64, 1999.

LOYOLA, V. R.; PAULE, B. J. A. Utilização de aditivos em rações de bovinos: aspectos regulatórios e de segurança alimentar. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 8., 2006, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 373, 2006.

LUCCI, C. S., **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, p. 298, 1997.

MAAS, J. A. et al. The effect of season and monensin sodium on the digestive characteristics of autumn and spring pasture fed to sheep. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 4, p. 1052-1058, 2001.

MAKKAR, H. P. S. Recent advances in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: FAO. **FAO animal production and health 160: assessing quality and safety of animal feeds**. Rome, 2004.

MARINO, C. T. **Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade *in vivo* de bovinos suplementados com três fontes energéticas**. 121p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

MARTIN, S. A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3123-3132, 1998.

MAURICIO, R. M et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

McCARTHY, F. D.; BERGEN, W. G.; HAWKINS, D. R. Protein sparing effect and performance of growing: finishing steers fed monensin. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 49, suppl. 1, p. 79, 1979.

McGUFFEY, R.K. et al. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 194-203, 2001.

MOHAMMED, N., Z. A. LILA, N. AJISAKA, K. HARA, K. MIKUNI, K. HARA, S. KANDA and H. ITABASHI. Inhibition of ruminal microbial methane production by cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 188-195, 2004.

MONTAÑO, M. F.; CHAI, W.; ZINN-WARE, T. E.; ZINN, R. A. Influence of Malic Acid Supplementation on Ruminal pH, Lactic Acid Utilization, and Digestive Function in steers Fed High-Concentrate Finishing Diets. **Journal of Animal Science**. v. 77, p. 780-784, 1999.

MORSY, A. S.; SOLTAN, Y. A.; SALLAM, S. M. A.; ARAÚJO, R. C.; ALENCAR, S. M. ; ABADALLA, A. Efeito do extrato de própolis sobre a fermentação ruminal e produção de metano in vitro. In: **Anais** da 47^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Salvador - BA. v. 1. p. 1-3, 2010.

MURPHY, M. R.; BALDWIN, R. L.; KOONG, L. J. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 55, p. 411, 1982.

MWENYA, B.; SAR, C.; SANTOSO, B. et al. Comparing the effects of β 1-4 galactooligosaccharides and L-Cysteine to monensin on energy and nitrogen utilization in steers fed a very high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 118, n. 1, p. 19-30, 2004.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed., Blackie Academic & Professional, p. 523-632, 1997.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C., Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**. v. 90 (Supl. E):E17-E38, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of beef cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press. p. 242, 1996.

NEWBOLD, C. L.; LASSALAS, B.; JOUANY, J. P. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 230-234, 1995.

O' KELLY, J. C.; SPIERS, W. G. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad libitum or at the rate of 250 g/hour. **Australian Journal of Agricultural Research**, p. 1789 – 1793, 1992.

OENEMA, J. KOSKAMP, G. J. and GALAMA, P. J. Guiding commercial pilot farms to bridge the gap between experimental and commercial dairy farms; the project Cows & Opportunities. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, p. 277-296, 2001.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MEYER, P. M. et al. Effects of monensin level and roughage/concentrate ratio on ruminal fermentation in bovines. **Journal of Animal and Feed Science**, v. 13, p. 195-198, 2004.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, p. 119, 2002.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini review. Effect of ionóforos on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1-6, 1989.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B. A.; GIVENS, D. I. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n. 1, p. 9-30, 2005.

SCHELLING, G. T. et al. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. v. 6.08. 3.ed. Cary, N.C.: SAS Institute Inc, 2004.

SENGER, C. C. D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho**. 2005. 126f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SILVA, J. A.; Soares, L. F.; Costa, E. L., Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão - **Revista Tecnologia de Carnes**. Campinas, SP, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2001.

SIT, V. e M. POULIN-COSTELLO. Catalogue of curves for fitting. Biometrics Information. Handbook nº 4. **Ministry of Forest Research Program**. British Columbia, Canada, p. 1-10, 1994.

SNIFFEN, C. J., BALLARD, C. S., CARTER, M. P., COTANCH, K. W., DANNA, H. M., GRANT A, R. J., MANDEBVU, P., SUEKAWA, M., MARTIN, M. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 127:13–31, 2006.

SOLIVA, C. R.; ZELEKE, A. B.; CLÉMENT, C.; HESS, H. D.; FIEVEZ, V.; KREUZER, M. In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 53-71, 2008.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 185-197, 1994.

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.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WILKINS, J. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. **Applied Microbiology**. Washington, v. 27, n. 1, p. 135–140, 1974.

WOLIN, M. J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 10, p. 1452-1459, 1960.