

WEBEL MACHADO LEOPOLDINO

EFEITO DA MONENSINA, LASALOCIDA, PRÓPOLIS, ACIDEZ E LIPÍDIOS
SOBRE A PERDA DE POTÁSSIO E FERMENTAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
BACTÉRIAS DO RUMÉN

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L587e
2004

Leopoldino, Webel Machado, 1971-

Efeito da monensina, lasalocida, própolis, acidez e lipídios sobre a perda de potássio e fermentação de populações de bactérias do rúmen / Webel Machado Leopoldino.
– Viçosa : UFV, 2004
xvii, 54f. : il. ; 29cm

Orientador: Rogério de Paula Lana

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Fermentação no rúmen. 2. Bactérias - Crescimento - Efeito de aditivos. 3. Antibióticos na nutrição animal. 4. Ionóforos - Efeito na fermentação do rúmen. 5. Lipídios na nutrição animal. 6. Gases - Efeito da fermentação do rúmen. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.2085

WEBEL MACHADO LEOPOLDINO

EFEITO DA MONENSINA, LASALOCIDA, PRÓPOLIS, ACIDEZ E LIPÍDIOS
SOBRE A PERDA DE POTÁSSIO E FERMENTAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
BACTÉRIAS DO RUMÉN

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de abril de 2004.

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Dr. Pedro Braga Arcuri

Prof^ª. Maria Ignez Leão

Prof. Rogério de Paula Lana
(Orientador)

À Deus,
por ter guiado meus passos nesta jornada.
Aos meus pais, João e Lucélia,
Aos meus avôs Fortuanto e Paulo (in memorian),
Às minhas avós Maria, Francisca (in memorian) e Senhorinha(in memorian),
Aos meus irmãos, Garibaldi, Andréia e Graciela,
Por tudo que têm feito
para o sucesso de minha vida profissional,
pelos incentivos recebidos, pelos valores e confiança.
Dedico.

Deus nos dá várias trilhas à escolha, cabe-nos percorrer aquela que for mais correta aos olhos do coração. No entanto, só chegaremos ao fim se tivermos fé, coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força nos momentos mais difíceis e permitido alcançar mais este objetivo.

À Oraide, pelo constante incentivo, carinho, amor e compreensão nos momentos ausentes.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial aos Departamentos de Zootecnia e de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso e formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e ajuda financeira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento da pesquisa.

À distribuidora de produtos Dow Corning do Brasil, SOLEMAR de Belo Horizonte, por fornecer os óleos de silicone para os experimentos, sem os quais seria impossível a realização dos trabalhos.

Ao Professor Rogério de Paula Lana, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pelas sugestões, pela paciência e disposição durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges, pelo aconselhamento, pelos ensinamentos e pelas sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Hilário, pelo aconselhamento, pelos ensinamentos e pelas sugestões durante a realização dos experimentos.

Ao Dr. Pedro Braga Arcuri, pela atenção, aconselhamentos e sua contribuição na execução dos trabalhos na EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora - MG.

À EMBRAPA Gado de Leite, pelos animais, laboratórios e auxílio cedidos para realização de parte dos trabalhos da tese.

Aos professores Maria Ignez Leão, Augusto César Queiroz, Luiz F. T. Albino e Sebastião de Campos Valadares Filho, pelo apoio nos momentos de dificuldades.

Aos professores Flávia Maria Lopes Passos, Maria Catarina M. Kasuya, Marcos Rogério Totola, Jorge Luiz C. Coelho, Rita Fátia M. Oliveira, Juarez Lopes Donzele, Antônio Bento Mâncio, Mário Fonseca Paulino e Marcelo T. Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas e pela oportunidade de aprender.

Aos integrantes do Laboratório de Nutrição Animal e funcionários do Departamento de Zootecnia, Monteiro, Fernando, Joécio, Jorge, Nataniel e Marcelo que me auxiliaram na condução e análises dos experimentos.

À Coordenação da Pós-Graduação, em especial à Celeste, pelo auxílio nos tramites do curso.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela colaboração e pelos serviços prestados, em especial a Laura, Maria Aparecida, Nilcéia, Danilo, Paulo e “Esquilo”.

Aos colegas da Microbiologia e da Zootecnia, pelas idéias compartilhadas e pelos estudos dedicados ao longo do curso.

Aos amigos, Kaleizu, Renè, Jaime, Eduardo, Fernando, Eustáquio, Joeli, Herivelton, Róger, Marco, Tânia, Aécio, Liliane, Alex, André, Maria Teresa, João, Rosinéia, Daniela, Juliana, Rafael, Ivan, Ana Regina, Marco Aurélio, Maíra, Acyr, Poliana Mary e Renius, pelo auxílio, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e pelas constantes palavras de incentivo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, para minha formação e crescimento profissional.

BIOGRAFIA

WEBEL MACHADO LEOPOLDINO, filho de João Leopoldino e de Lucélia O. Machado Leopoldino, nasceu em Paulo de Faria, São Paulo, em 10 de agosto de 1971.

Em julho de 1995, obteve o título de Médico Veterinário na Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia-MG. Realizou estágio curricular na cooperativa de laticínios CALU de Uberlândia-MG. Trabalhou como autônomo até junho de 1996.

De julho de 1996 a janeiro de 1998, desenvolveu experimentos como bolsista de Aperfeiçoamento em Atividade de Pesquisa pelo CNPq, realizando estudos na área de Bovinocultura de Leite, na Universidade Federal de Uberlândia.

Em abril de 2000, concluiu o curso de Mestrado em Zootecnia na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, realizando estudos na área de pastagens consorciadas, obtendo o título de *Magister Scientiae*.

Em agosto de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, realizando estudos na área de microbiologia de rúmen. Obteve o título de *Doctor Scientiae* em abril de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
Efeito do pH <i>in vitro</i> na resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular, e efeito do pH e ionóforos na produção de amônia e proteína microbiana	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
Resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular por ação de monensina, lasalocida e própolis <i>in vitro</i> sob dois valores de pH	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	36

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
Resistência à perda do potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas lactantes submetidas a dietas com óleo de soja e, ou, monensina e produção de gases <i>in vitro</i> com monensina, lasalocida ou própolis.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CONCLUSÕES GERAIS.....	53

LISTA DE TABELAS

Efeito do pH *in vitro* na resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular, e efeito do pH e ionóforos na produção de amônia e proteína microbiana

Tabela 1- Concentração de potássio intracelular (mmol/L) em populações de bactérias do rúmen incubadas em diferentes meios de cultura e dois valores de pH, e tratadas com cinco níveis de monensina a 39°C por 10 minutos..... 22

Resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular por ação de monensina, lasalocida e própolis *in vitro* sob dois valores de pH

Tabela 1- Efeitos da lasalocida e monensina na perda de potássio intracelular das populações de bactérias do rúmen de animais submetidos à alimentação a base de volumoso ou de concentrado, incubadas por 10 minutos a 39°C em dois valores de pH..... 35

Resistência à perda do potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas lactantes submetidas a dietas com óleo de soja e, ou, monensina e produção de gases *in vitro* com monensina, lasalocida ou própolis

Tabela 1- Constantes de resistência (K_d e K_{max}) de populações de bactérias do rúmen de vacas lactantes submetidas a dietas com ou sem monensina ou óleo de soja, incubadas com níveis crescentes de lasalocida ou monensina por 10 minutos a 39°C..... 47

Tabela 2- Médias de volume acumulado de gases (ml/100 mg de MS) das dietas incubadas com ou sem lasalocida, monensina ou própolis a 39°C durante 120 horas..... 50

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1- Estrutura representativa da molécula de monensina.....	2
Figura 2- Estrutura representativa da molécula de lasalocida.....	3
Figura 3- Esquema mostrando o mecanismo de ação da monensina em bactéria ruminal Gram-positiva.....	4

Efeito do pH *in vitro* na resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular, e efeito do pH e ionóforos na produção de amônia e proteína microbiana

Figura 1- Relação entre a recíproca da perda de potássio intracelular e a recíproca da concentração de monensina em populações de bactérias do rúmen em meios com pH 5,5 e 7,0.....	23
Figura 2- Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em diferentes meios (LR – líquido de rúmen; Mc – McDougall). (B) Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em dois valores de pH.....	23
Figura 3- Produção média de amônia (mM) após 24 horas de incubação <i>in vitro</i> de populações de bactérias do rúmen sob dois valores de pH com ou sem ionóforos (monensina e lasalocida).....	25
Figura 4- Proteína microbiana (mg/mL) média após 24 horas de incubação <i>in vitro</i> de populações de bactérias do rúmen sob dois pH com ou sem ionóforos (monensina e lasalocida).....	26

Resistência de populações de bactérias do rúmen à perda do potássio intracelular por ação de monensina, lasalocida e própolis *in vitro* sob dois valores de pH

Figura 1- Relação entre a concentração de ionóforos (monensina e lasalocida em M) e a concentração de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas em meio artificial por 10 minutos a 39°C (A). Relação entre a concentração de própolis (mg/mL) e a concentração de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas em meio artificial por 10 minutos a 39°C (B).....	34
--	----

Resistência à perda do potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas lactantes submetidas a dietas com óleo de soja e, ou, monensina e produção de gases *in vitro* com monensina, lasalocida ou própolis

Figura 1- Perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas com ou sem monensina e com ou sem óleo de soja, incubadas em meio artificial contendo níveis crescentes de monensina (A) ou lasalocida (B) por 10 minutos a 39°C..... 46

Figura 2- Produção cumulativa de gases das dietas (A – controle; B – 4% de óleo) incubadas na ausência (C – controle) e na presença de antibióticos (M - monensina, L - lasalocida e P – própolis) a 39°C durante 120 horas..... 50

RESUMO

LEOPOLDINO, Webel Machado, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004.

Efeito da monensina, lasalocida, própolis, acidez e lipídios sobre a perda de potássio e fermentação de populações de bactérias do rúmen. Orientador: Rogério de Paula Lana. Conselheiros: Hilário Cuquetto Mantovani e Arnaldo Chaer Borges.

Foram realizados cinco estudos para avaliar o efeito de antibióticos ionóforos (monensina e lasalocida), própolis e óleo de soja sobre a perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen e verificar a ação destes em pH 5,5 e 7,0, simulando dietas a base de grãos ou de forragens, sobre a produção de amônia, de proteína bacteriana e de gases total. Nos dois primeiros estudos, líquido ruminal de bovinos sob pastagem foi usado na incubação *in vitro* em diferentes meios artificiais com valores de pH 5,5 e 7,0, para se avaliar a ação de níveis crescentes de monensina na resistência à perda de potássio intracelular de bactérias mistas ruminais e verificar o efeito de monensina e lasalocida na produção de amônia e de proteína microbiana em pH 5,5 e 7,0. O meio utilizado para determinar a perda de potássio interfere nos valores absolutos de potássio. A concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio foi de 2,77 μM em pH 5,5 e 0,056 μM em pH 7,0, mostrando que as bactérias incubadas em meios com pH 5,5 foram mais resistentes à monensina que aquelas incubadas em meios com pH 7,0. Os ionóforos e a acidez do meio reduziram a produção de amônia, sem haver interação sobre os mesmos. Não houve diferença entre os ionóforos onde, independente do pH do meio, os mesmos inibiram a produção de amônia em 56%. A acidez, por sua vez, inibiu a produção de amônia em

50,5%, independente dos ionóforos. No entanto, o efeito dos ionóforos e acidez foram aditivos, onde a inibição máxima ocorreu pelo uso de ionóforos em baixo valor de pH (75,2%). A produção de proteína microbiana foi menor quando a lasalocida estava presente no meio de cultura com baixo valor de pH. No terceiro estudo dois bois castrados mantidos em pastagem foram utilizados como doadores de líquido ruminal, sendo a população de bactérias do rúmen utilizada para avaliar a ação de níveis crescentes de monensina, lasalocida e própolis na resistência à perda de potássio intracelular em dois valores de pH. O pH do meio utilizado na incubação de 10 minutos não interferiu na perda de potássio intracelular quando se utilizou lasalocida, mas a perda máxima de potássio intracelular (K_{max}) foi maior em bactérias de animal consumindo dieta rica em volumoso que em concentrado (54,8 vs 32,5%). Já nas incubações com monensina houve interação entre o pH do meio e a procedência das bactérias ruminais. Em meio com pH 7,0, houve necessidade de apenas 0,072 μ M de monensina para causar metade da perda máxima de potássio intracelular (K_d) em bactérias de animal consumindo dieta rica em volumoso comparado a 0,425 μ M em dieta rica em concentrado. Em meios com pH 5,5 não houve diferença na concentração de monensina (0,147 vs 0,130 μ M) para causar metade da perda máxima de potássio. Estes resultados mostram ser as bactérias de animais recebendo dietas ricas em volumoso mais sensíveis aos ionóforos. A própolis não interferiu no conteúdo de potássio celular, indicando modo de ação sobre as bactérias diferente dos ionóforos. Nos dois últimos estudos com vacas lactantes como unidades experimentais e doadoras de líquido ruminal, as populações de bactérias foram utilizadas para avaliar a ação de níveis crescentes de lasalocida e monensina na resistência à perda de potássio intracelular, e para produção de gases *in vitro*. O K_{max} da lasalocida foi menor para as populações de bactérias obtidas do líquido de rúmen das vacas submetidas a dietas com monensina, óleo de soja e monensina mais óleo de soja (19,4 a 25,4%) quando comparado com aquele (30,1%) das vacas submetidas a dietas sem ionóforo e óleo de soja. O mesmo ocorreu para o K_{max} da monensina, onde o menor foi de 6,5% para monensina mais óleo e o maior de 29,5% para o controle. Necessita-se de alta concentração de monensina (2,3 μ M), porém baixa de lasalocida (0,218 μ M) para causar a metade da perda máxima de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas com monensina. Não há resistência cruzada entre os dois ionóforos testados *in vitro*. As amostras incubadas com própolis produziram menor

volume de gases (12,9 mL/100 g de MS), porém monensina e lasalocida também reduziram a mesma. Isto representa menor perda de energia para animais submetidos a dietas com propolis, monensina ou lasalocida.

PALAVRAS CHAVE: amônia, ionóforos, óleo de soja, pH, potássio intracelular, produção de gases, rúmen

ABSTRACT

LEOPOLDINO, Webel Machado, D.S., Universidade Federal de Viçosa, april of 2004.
Monensin, lasalocid, propolis, acidification and lipid effect on the potassium depletion and fermentation of ruminal bacteria population. Adviser: Rogério de Paula Lana. Committee members: Hilário Cuquetto Mantovani and Arnaldo Chaer Borges.

Five experiments were performed to evaluate antibiotics (monensin and lasalocid), bee propolis and soybean oil effect on potassium depletion in ruminal bacteria population. In addition, it was verify the action of theses additives in pH 5.5 and 7.0, representing, high grains or roughage diets by measuring ammonia, bacterial protein and gas production. Were carried out two studies, in which the fluid from steers fed pasture was used in incubations with different artificial media in pH 5.5 and 7.0, in order to evaluate the action of increasing levels of monensin in the resistance to intracellular potassium losses by mixed ruminal bacteria and verify the effect of monensin and lasalocid on ammonia and microbial protein production at pH 5.5 and 7.0. The media culture affected the potassium absolute values. The monensin concentration needed to cause half maximal potassium depletion was 2.77 μM in pH 5.5, and 0.056 μM in pH 7.0, showing that bacteria incubated in pH 5.5 were more tolerant to monensin than those incubated in pH 7.0. The ionophores and acidity decreased ammonia production, without interaction between them. In addition, there was no difference between ionophores that, independently of the medium pH, both inhibited ammonia production by 56%. The acidity, on the other hand, inhibited ammonia

production by 50.5%, independently of the ionophores. Therefore, the effect of the ionophores and acidity were additive, the maximum inhibition occurred by the presence of ionophores at low pH value (75.2%). The microbial protein production was lowest when lasalocid was present in the culture media at low pH, causing inhibition of microbial growth. On thirty experiment two steers kept in Coast-cross pasture were used as ruminal fluid donors. The ruminal bacterial population was used to evaluate the action of increasing levels of monensin, lasalocid and bee propolis on the intracellular potassium depletion in two values of pH. The pH values from media used in 10 minutes incubation did not affect potassium depletion when lasalocid was used, but maximum intracellular losses of potassium (K_{max}) were higher in bacteria from animal fed diet rich in forage than concentrate (54.8 vs 32.5%). There was interaction between media pH and origin of ruminal bacteria when monensin was used *in vitro*. In the media with pH 7.0 only 0.072 μM of monensin was needed to cause half maximal potassium depletion (K_d) in bacteria from animal fed diet rich in roughage compared to 0.425 μM in diet rich in concentrate. There wasn't difference in media with pH 5.5 in the monensin concentration (0.147 vs 0.130 μM) to cause half maximal potassium depletion. These results show that bacteria from animal fed diet rich in roughage are more sensitive to ionophores. The bee propolis did not cause potassium depletion in ruminal bacteria population, therefore its mode of action on bacteria is different from the ionophores. On the last two studies were conducted with lactating cows as experimental units and ruminal fluid donors. The ruminal bacteria population were used to evaluate the action of increasing levels of lasalocid and monensin in the resistance of intracellular potassium depletion and gas production with monensin, lasalocid or propolis. Potassium depletion technique showed that K_{max} of lasalocid was lower to ruminal bacteria population obtained from of cows fed diets with monensin, soybean oil and monensin plus soybean oil (19.4 to 25.4%) when compared to the cows fed untreated control diet (30.1%). The same happened for K_{max} of monensin, in which the lowest was 6.5% to monensin plus soybean oil and the greatest was 29.5% to control. High monensin concentration ($K_d = 2.30 \mu\text{M}$) was required, but low lasalocid concentration ($K_d = 0.218 \mu\text{M}$) was necessary to cause half of maximum potassium depletion in ruminal bacteria population from cows fed diet with monensin. This result shows that there was no cross resistance between the evaluated ionophores. *In vitro* gas production showed the lowest volume when diets were incubated with propolis (12,9 mL/100 g of DM), but monensin

and lasalocid also reduced it. This represent lower escape energy for animals fed diets with bee propolis, monensin or lasalocid.

Key Words: ammonia, gas production, ionophores, pH, potassium depletion, rumen, soybean oil

INTRODUÇÃO

A fermentação no rúmen é um processo exergônico que leva à síntese de material celular microbiano. A oxidação dos substratos nesse compartimento com ausência de oxigênio comoceptor de elétrons não é completa e os principais produtos são ácidos graxos voláteis, metano e gás carbônico. O animal hospedeiro é capaz de utilizar os ácidos graxos voláteis e as células microbianas como nutrientes, e o gás metano produzido é perdido na eructação.

O ecossistema do rúmen é dos mais complexos de maneira que, pela manipulação da fermentação que nele ocorre é necessária para se obter melhora na produção de ácido propiônico, redução na metanogênese, na proteólise e desaminação de proteínas dietéticas. Assim, há alguns anos vários trabalhos tentaram estabelecer adequada manipulação desses processos através da composição da dieta, inclusive com aditivos alimentares, a exemplo dos ionóforos poliéter carboxílicos, monensina, lasalocida, salinomina, narasina, dentre outros, que inicialmente utilizados como anticoccidianos em aves (BERGEN & BATES, 1984). Outros aditivos também foram alvos de estudos, tais como leveduras, fungos, antibióticos, outros ionóforos, lipídios insaturados, ácidos orgânicos (fumarato, malato e aspartato; MARTIN, 1998) e mais recentemente a própolis de abelha (STRADIOTTI et al., 2002 a e b).

Os ionóforos são compostos de peso molecular de 200 a 2000 daltons, que formam complexos solúveis em lipídios com cátions polares, dos quais potássio, sódio, cálcio, magnésio e aminas biogênicas são os mais importantes biologicamente. Foi comprovado que ionóforos são capazes de transportar íons através de membranas artificiais finas, incapazes de comportarem canais e, portanto, funcionam como carreadores de cátions (PRESSMAN, 1976).

Ionóforos carboxílicos são ionóforos naturais, com cadeia aberta contendo anéis heterocíclicos oxigenados e carboxil terminal. Embora o grupo carboxil possa ou não estar envolvido na ligação com o cátion, os ionóforos carboxílicos formam complexos com cátions somente na sua forma aniônica desprotonada. Eles são capazes de carrear prótons na sua forma carboxil protonada. Exemplos deste grupo são monensina, lasalocida, nigericina, grisoryxina, dianemicina, lysocelina, salinomicina, X-206, A-204 e A-23187 (PRESSMAN, 1976).

A monensina e a lasalocida são produzidas por fungos *Streptomyces cinnamomensis* e *S. lasaliensis*, respectivamente. Na monensina o grupo carboxil não participa da ligação com o cátion, devido a sua molécula possuir uma cadeia ligada na porção terminal que empurra o carboxil para fora do plano do centro complexante. Ainda, possui seis oxigênios ligantes e nenhum ligado na forma iônica (Figura 1; PRESSMAN, 1976).

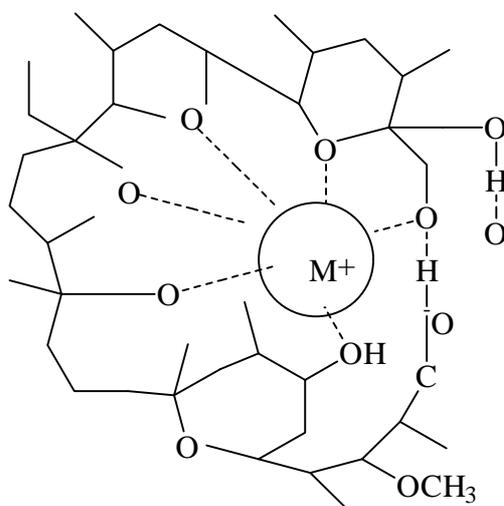


Figura 1 – Estrutura representativa da molécula de monensina

A lasalocida é o menor dos ionóforos carboxílicos, com centro complexante na forma próxima de concha (Figura 2). Os íons ligados ocupam o sistema de oxigênio em vez de se ligarem dentro do mesmo, explicando a ampla faixa de íons capazes de formar complexo com este ionóforo (PRESSMAN, 1976).

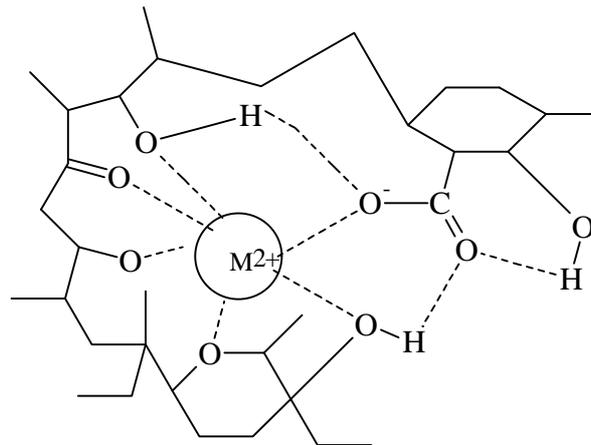


Figura 2 – Estrutura representativa da molécula de lasalocida

O movimento de íons através da monensina recebe a denominação de antiporte próton - sódio, devido à afinidade por sódio ser 10 vezes mais do que pelo potássio (Figura 3; PRESSMAN, 1976). A monensina catalisa o influxo de sódio e efluxo de prótons e as células tentam bombear o excesso de prótons para o seu exterior pela ação da proteína da membrana, a adenosina trifosfatase, esgotando sua reserva de adenosina trifosfato e evitando o crescimento da bactéria (RUSSELL, 1987). O tratamento de *Streptococcus bovis* com monensina resulta em perda imediata de potássio da célula e influxo de prótons (H^+) que se acumulam no interior da célula diminuindo o pH (RUSSELL, 1987; LANA & RUSSELL, 1996).

MEIO EXTERNO

MEIO INTERNO

(Alta $[Na^+]$; baixa $[K^+]$)

(alta $[K^+]$; baixa $[Na^+]$)

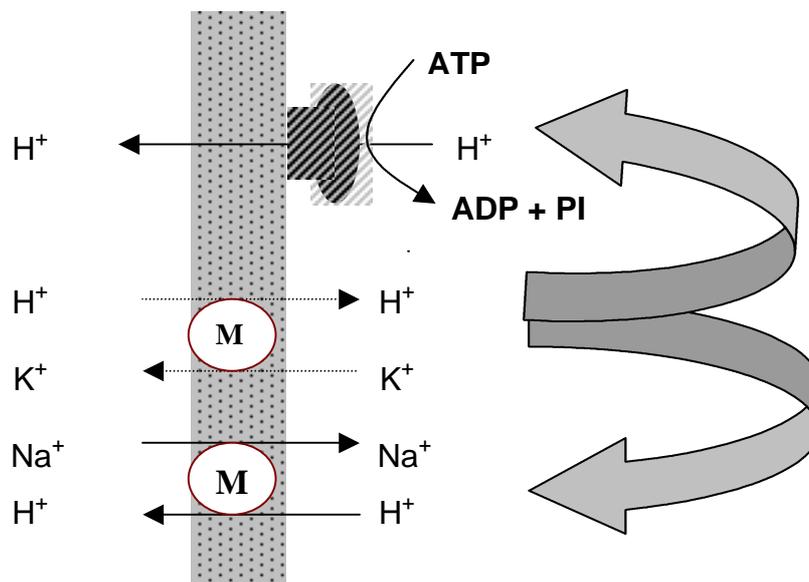


Figura 1 – Esquema mostrando um mecanismo de ação da monensina em bactéria ruminal Gram-positiva, proposto por RUSSELL (1987).

A lasalocida transporta muitos cátions, mono e bivalentes, inclusive prótons, apresenta maior afinidade por potássio em relação a sódio, sendo a afinidade por este último semelhante à por cálcio. De acordo com PRESSMAN (1976) e BERGEN & BATES (1984) a taxa e o grau com os quais o cátion será transportado pela lasalocida depende da constante de afinidade pelo cátion e do gradiente de concentração do íon na membrana. Segundo SCHWINGEL et al. (1989) o principal efeito da lasalocida em *Streptococcus bovis* é provocar fluxo de prótons e efluxo de potássio das células e que esta ação diminui com o aumento da concentração de potássio extracelular.

A maior eficiência de produção em bovinos em crescimento e terminação pelo uso de ionóforos ocorre à melhora na eficiência do metabolismo energético e protéico no rúmen e, ou, no animal e retarda desordens alimentares, especialmente acidose láctica e timpanismo (BERGEN & BATES, 1984). Embora a monensina tenha pouco impacto na média de ganho de peso vivo diário do animal, ela contribui na redução da perda de

energia alimentar via emissão de gás metano (SCHELLING, 1984), diminui a ingestão de alimento e a relação acetato: propionato no fluido do rúmen (RUSSELL, 1996).

Os ionóforos inibem principalmente as bactérias Gram-positivas, uma vez que a resistência está relacionada com a presença de uma membrana externa, de natureza lipopolissacarídica, existente em bactérias Gram-negativas (RUSSELL & STROBEL, 1989).

Os efeitos destes ionóforos são em razão de inibição causada nos *Ruminococcus spp.*, que são Gram-positivos produtores de acetato, e à proliferação das Gram-negativas, tais como *Fibrobacter succinogenes*, produtores de succinato, e *Selenomonas ruminantium*, que converte succinato em propionato (CHEN & WOLIN, 1979; WEIMER, 1998). A seleção contra os formadores de hidrogênio e de formato, como os *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, pode levar à redução na produção de metano no rúmen (CHEN & WOLIN, 1979). Estes ionóforos podem afetar algumas bactérias Gram-negativas quando em altas concentrações (NAGARAJA & TAYLOR, 1987), agir como fungistáticos (baixa concentração) e fungicidas (alta concentração) na população de fungos do rúmen (NAGARAJA et al., 1997) e diminuir o número de protozoários (GARCIA et al., 2000).

O uso de ionóforos diminui a degradação de proteína hidrolisada e dietética (RUSSELL & MARTIN, 1984) por inibir o crescimento de bactérias proteolíticas (HINO, 1986), sendo seu efeito maior na redução da desaminação do que da proteólise. Estes efeitos são mais drásticos em dietas ricas em forragem pois, sob estas condições, a taxa de degradação de proteína é muito maior do que a taxa de fermentação de carboidratos e os níveis de amônia no rúmen geralmente são altos (RUSSELL, 1996).

LANA et al. (1998) demonstraram que redução do pH, *in vitro*, de 6,5 para 5,7, diminui a produção de amônia em bactérias de animais recebendo dietas contendo

apenas forragem, enquanto que em bactérias de animais recebendo 90% de concentrado houve produção similar de amônia nos dois valores de pH.

A redução de amônia produzida por microrganismos do rúmen *in vitro* e *in vivo*, em consequência da administração da monensina, é a provável causa do efeito chamado *protein-sparing* (VAN NEVEL & DEMEYER, 1977), isto é, aumento na proteína disponível para o animal. A atividade específica de produção de amônia por *Peptostreptococcus spp.* e *Clostridium spp.*, *in vivo*, é de 10 a 39 vezes maior do que a obtida com outras bactérias produtoras de amônia e sensíveis à monensina (RUSSELL et al., 1988). Bactérias isoladas do rúmen de vacas leiteiras, caprinos e ovinos a pasto, identificadas como produtoras e hiperprodutoras de amônia no rúmen foram sensíveis a monensina (ESCHENLAUER et al., 2002). Os ionóforos monensina e lasalocida são eficientes como redutores de produção de amônia de cultura de populações de bactérias do rúmen (OLIVEIRA et al., 2002).

A eficiência de síntese de proteína microbiana pode diminuir significativamente em pH menor do que seis. A taxa de crescimento das bactérias e protozoários atinge seus valores mais baixos, em 2 a 3 horas após a alimentação (LAVEZZO, 1986), o que coincide com o abaixamento do pH após a alimentação.

O uso de ionóforos resulta na redução do lactato no rúmen *in vivo* e elevações nos valores do pH, isto em função das diferenças na sensibilidade das bactérias produtoras e utilizadoras de lactato frente a esses aditivos (DENNIS et al., 1981; NAGARAJA et al., 1982). A bactéria *Megasphaera elsdenii*, primariamente uma espécie utilizadora de lactato no rúmen e a *Selenomonas ruminantium* são resistentes à monensina (NAGARAJA & TAYLOR, 1987), enquanto ocorre a inibição da bactéria *Streptococcus bovis*, relacionada com acidose aguda no rúmen (RUSSELL, 1996).

Populações de bactérias do rúmen de animais submetidos a alta proporção de alimentos concentrados na dieta são mais resistentes à monensina do que as de animais que se alimentam de forragens (GOODRICH et al., 1984; LANA & RUSSELL, 2001), fato ao qual se atribui o maior efeito da monensina em animais em pasto do que nos mantidos em confinamento.

As células de *S. bovis* mostraram quantidades significantes de monensina e lasalocida ligadas, pois parece que a quantidade de ionóforo na célula é mais importante que a concentração absoluta no meio, e o pH pode afetar de maneira efetiva a atividade dos ionóforos (CHOW & RUSSELL, 1990). A lasalocida parece ter maior afinidade por membranas de bactérias do que a monensina, quando utilizada em culturas puras. De acordo com a capacidade de ligação em bactérias, protozoários e partículas alimentares, sobraria pouco ionóforo livre no líquido ruminal (CHOW et al., 1994). Assim, a concentração inibitória mínima (MIC) pode não prover um método acurado para medir a inibição do crescimento *in vivo*.

A avaliação da mudança da microbiota do rúmen *in vivo* pode ser realizada por técnica que se baseia na avaliação da redução do nível de potássio intracelular, quando as bactérias são submetidas a níveis crescentes de ionóforos *in vitro* (LANA & RUSSELL, 1996). Esta técnica pode ser usada para determinar a resistência de bactérias aos ionóforos ou para monitorar as modificações das populações microbianas, além de possibilitar a dosagem ótima de ionóforos *in vivo* (LANA, 1997).

Outro aditivo em potencial é a própolis, cuja composição inclui mais de 180 substâncias, sendo a atividade biológica proporcionada, principalmente pelos flavonóides, acompanhados por ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas (BANKOVA et al., 1992), que possuem atividades biológicas. A

atividade máxima antimicrobiana é provavelmente causada pelo sinergismo dos diferentes compostos (MARCUCCI et al., 2001; SANTOS et al., 2002 b).

A própolis é uma resina, usada para fechar a abertura da colméia e eliminar invasores externos. É proveniente de substâncias coletadas de várias plantas e misturadas com secreções e β -glucosidase de abelhas, secretada por elas durante a coleta. A β -glucosidase hidroliza glicosídeos flavonóides em agliconas flavonóides (GREENAWAY et al., 1990; BONHEVI et al., 1994).

O mecanismo de ação da própolis parece ser complexo e portanto, uma simples analogia não pode ser feita ao modo de ação dos antibióticos clássicos (SANTOS et al., 2002 b). PARK et al. (1998) relataram a ação efetiva da própolis sobre inibição no crescimento de bactérias Gram-positivas porém nenhuma ação sobre *Escherichia coli* (Gram-negativa). MARCUCCI et al. (2001) comprovaram a atividade antibacteriana da própolis e suas frações contra bactérias anaeróbias.

As maiores quantidades de flavonóides (pinocembrina, pinobaxina, isosakuranetina, galangina e sakuranetina) extraídas da própolis são obtidas quando se usa solução de etanol de 60 a 80%, faixa de concentração em que causa forte inibição no crescimento microbiano (PARK & IKEGAKI, 1998; KOO et al., 2000).

Em cabras alimentadas com dietas contendo extrato de própolis e óleo de soja, observa-se uma tendência para diminuir a concentração de amônia do rúmen, aumentar a concentração de propionato e reduzir a relação acetato:propionato (CAMARDELLI et al., 2002). A própolis tendeu a ser mais eficiente que a monensina em inibir a atividade específica de produção de amônia e em produzir maior teor de propionato *in vivo* (STRADIOTTI et al., 2002 a). Em estudo *in vitro* com populações de bactérias do rúmen, evidenciou-se que extrato etanólico de própolis (0,3 g/ml de etanol a 70%, seguida de diluição 2:1 em etanol a 70% em água) foi eficiente em reduzir a produção

de gases total e produção final de gases para carboidratos fibrosos e não fibrosos, inclusive suplantando a monensina (STRADIOTTI et al., 2002 b).

Quanto ao uso de lipídios, sabe-se que os ácidos graxos saturados são menos ativos superficialmente e menos tóxicos que os insaturados, sendo as bactérias Gram-positivas mais sensíveis do que as Gram-negativas.

O mecanismo exato desta toxicidade ainda não está elucidado, mas é provável que esteja relacionado a fluidez das membrana citoplasmática, afetando sua permeabilidade. Sabões de cálcio (Ca^{++}) e de magnésio (Mg^{++}) podem ligar à superfície celular e interferir com os sistemas de transporte. Também, o lipídeo recobre o microrganismo com um filme hidrofóbico e impede o seu metabolismo, assim, ao interferir na aderência das bactérias às fibras de celulose impede a sua hidrólise. A substituição da carboxila livre por uma amida ou suplemento de ácidos graxos na forma de sabões insolúveis, reduzem os efeitos inibitórios (JENKINS & PALMQUIST, 1982; JENKINS, 1993).

Em experimento com culturas puras quanto a sensibilidade à ácidos graxos, observou-se que as bactérias *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* e *Anaerovibrio lipolytica* não foram inibidas por ácido oléico, enquanto as *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus* e *Methanobacterium ruminantium* foram inibidas pelo mesmo ácido graxo insaturado (HARFOOT & HAZLEWOOD, 1997).

Estas diferenças na toxidez à célula bacteriana causada pelos ácidos graxos insaturados podem auxiliar a explicar os efeitos gerais *in vivo*. Na microbiota do rúmen, os produtores de propionato e succinato não foram afetados, enquanto os produtores de metano, acetato e fibrolíticos foram inibidos. Estes efeitos *in vivo* podem ser um pouco diferentes dos *in vitro*, porque os ácidos graxos são adsorvidos nas partículas

alimentares e removidos do líquido ruminal. Eles podem servir para proteger as bactérias na fase solúvel, portanto, as fibrolíticas podem ser mais inibidas por este efeito (HARFOOT & HAZLEWOOD, 1997).

A redução de metano é vantajosa, pois representa de 2 a 15% da energia bruta consumida, dependendo do tipo da dieta (IMMIG, 1996). Portanto, a redução na produção de metano permite melhor aproveitamento da energia, além de reduzir a quantidade de metano emitido para o meio ambiente, diminuindo o efeito estufa, os danos causados à camada de ozônio e o calor global (VAN NEVEL & DEMEYER, 1996).

A técnica *in vitro* de produção de gases tem mostrado ser eficiente em avaliar alimentos (MENKE et al., 1979), aditivos, alterações no pH do meio, fatores antinutricionais, além de monitorar melhor as interações nutriente x anti-nutriente e anti-nutriente x anti-nutriente (GETACHEW et al., 1998).

O princípio da técnica *in vitro* é que os gases produzidos são oriundos do metabolismo microbiano, a partir do material incubado. A produção cumulativa de gases está diretamente ligada às espécies bacterianas presentes no meio incubado. Partindo desta constatação, pode-se através da técnica de produção de gases observar o comportamento das populações microbianas do rúmen frente a aditivos utilizados nas rações de ruminantes.

A técnica consiste na incubação do alimento, acrescido de líquido de rúmen e tampão CO₂ – bicarbonato/fosfato, em frascos hermeticamente fechados, nos quais, ao longo do tempo, são realizadas leituras de pressão (por transdutores de pressão) e, ou, volume dos gases produzidos no processo fermentativo. Os gases produzidos são resultado dos produtos gasosos da fermentação (CO₂ e CH₄, produção direta de gases) e

CO₂ liberado do tampão pelos ácidos graxos produzidos (produção de gases indireta; BEUVINK & SPOELSTRA, 1992).

As vantagens da utilização de técnica *in vitro* residem na sua rapidez, na uniformidade físico-química do ambiente de fermentação e na conveniência de não necessitar o uso de muitos animais fistulados (VAN SOEST, 1994). Há ainda a vantagem do fato da não destruição da amostra em cada tempo, o que torna a técnica menos laboriosa, não necessitando de grandes quantidades de amostras, somado ao baixo custo (MALAFAIA, 1997).

Este trabalho teve por objetivos avaliar o efeito de antibióticos ionóforos (monensina e lasalocida), própolis e óleo de soja sobre a perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen e verificar a ação destes em pH 5,5 e 7,0, simulando dietas a base de grãos ou de forragens, sobre a produção de amônia, de proteína bacteriana e de gases total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEVI, G. et al. Determination of phenolic from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.607, p.150-153, 1992.
- 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.
- BEUVINK, J.M.W.; SPOELSTRA, S.F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.305-509, 1992.
- BONHEVI, J.S.; COLE, F.V.; JORDA, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.71, p.529-532, 1994.
- CAMARDELLI, M.M.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T. et al. Efeito de óleo de soja e própolis na ração sobre a fermentação ruminal em caprinos. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ... Recife – PE, 2002**, cd rom.
- 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.

- CHOW, J.M.; RUSSELL, J.B. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1588-1593, 1990.
- CHOW, J.M.; VAN KESSEL, J.A.S.; RUSSELL, J.B. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1630-1635, 1994.
- DENNIS, S.M.; NAGARAJA, T.G.; BARTLEY, E.E. Effect of lasalocid or monensin on lactate-producing or –using bacteria. **Journal of Animal Science**, v.52, n.2, p.418-426, 1981.
- ESCHENLAUER, S.C.P.; McKAIN, N.; WALKER, N.D. et al. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p.4925-4931, 2002.
- GARCIA, C.C.G.; MENDOZA, M.G.D.; GONZÁLEZ, M.S. et al. Effect of a yeast cultura (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p.165-170, 2000.
- GETACHEW, M.; BLÜMMEL, H.P.S.; MAKKAR, K.B. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.261-281, 1998.
- GOODRICH, R.D., GARRETT, J.E., GAST, D.R. et al. Influence of monensina on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1484-1498, 1984.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, v.71, p.107-118, 1990.
- HARFOOT, C.G. & HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The rumen microbial ecosystem**. (HOBSON, P.N. & STEWART, C.S. ed.) Blackie Academic & Professional, Great Britain. 1997, p.467-491.
- HINO, T.; RUSSELL, J.B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. **Journal of Animal Science**, v.64, p.261-270, 1986.
- IMMIG, I. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.57-72, 1996.
- JENKINS, T.C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism – Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. **Journal of Animal Science**, v.55, p.957, 1982.
- KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v.45, p.141-148, 2000.
- LANA, R.P. **Effects of monensin on ruminal bacteria, ruminal fermentation and feedlot performance** (tese Ph.D.). Cornell University, Ithaca, NY, USA. 1997, 87p.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.

- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LAVEZZO, O.E.N.M. **Influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação, em bovinos alimentados com diferentes fontes de proteína**. Piracicaba: ESALQ, 1986, 167p. (Tese de Mestrado)
- MALAFAIA, P.M.A. **Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos de alimentos por técnicas *in situ*, *in vitro* e de produção de gases**. Viçosa: UFV, 1997, 89p. (Tese de Doutorado)
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.105-112, 2001.
- MARTIN, S.A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.3123-3132, 1998.
- MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. et al. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. **Journal of Agricultural Science**, v.93, p.217-222, 1979.
- NAGARAJA, T.G.; AVERY, T.B.; BARTLEY, E.E. et al. Effect of lasalocid, monensin, or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v.54, n.3, p.649-658, 1982.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem**. (HOBSON, P.N. & STEWART, C.S. ed.) Blackie Academic & Professional, Great Britain. 1997. p. 523-632.
- NAGAJARA, T.G.; TAYLOR, M.B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.7, p.1620-1625, 1987.
- OLIVEIRA, J.S.; LANA, R.P.; BORGES, A.C. et al. Efeito da monensina e lasalocida sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ... Recife – PE, 2002**, cd rom. (b)
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.11, p.2230-2232, 1998.
- PARK, Y.K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M. et al. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Reviews Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.
- RUSSELL, J. B., MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1329-1338, 1984.
- RUSSELL, J.B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519-1525, 1987.
- RUSSELL, J.B. Bacteria: mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. Symposium Scientific Update on rumensin, tylan for professional feedlot consultant, August 19, 1996, Amarillo, TX. Elanco Animal Health, Indianapolis. In: **Proceedings...** 1996. p.E1-E19.

- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview: effects of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.1-6, 1989.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J.; CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.872-877, 1988.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; RODRIGUES, P.H. et al. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, v.8, n.8, p.9-15, 2002 a.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M. et al. Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.1-7, 2002 b.
- SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.
- SCHWINGEL, W.R.; BATES, D.B.; DENHAM, S.C. et al. Lasalocid-catalized proton conductance in *Streptococcus bovis* as affected by extracellular potassium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.259-260, 1989.
- STRADIOTTI, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação da própolis e da monensina sobre o consumo de matéria seca e parâmetros de fermentação ruminal em caprinos. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ...** Recife – PE, 2002, cd rom. (a)
- STRADIOTTI, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação de extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ...** Recife – PE, 2002, cd rom. (b)
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, n.3, p.251-257, 1977.
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Control of rumen methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.73-97, 1996.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Cornell University, Ithaca, NY. 1994, 476p.
- WEIMER, P.J. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. **Journal Animal Science**, v.76, p.3114-3122, 1998.

**EFEITO DO pH *IN VITRO* NA RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE
BACTÉRIAS DO RÚMEN À PERDA DO POTÁSSIO INTRACELULAR, E
EFEITO DO pH E IONÓFOROS NA PRODUÇÃO DE AMÔNIA E PROTEÍNA
MICROBIANA**

RESUMO: Foram realizados dois estudos, onde líquido ruminal de bovinos sob pastagem foi usado na incubação *in vitro* em diferentes meios artificiais com valores de pH 5,5 e 7,0, para se avaliar a ação de níveis crescentes de monensina na resistência à perda de potássio intracelular de bactérias mistas ruminais e verificar o efeito de monensina e lasalocida na produção de amônia e de proteína microbiana em pH 5,5 e 7,0. O meio utilizado para determinar a perda de potássio interfere nos valores absolutos de potássio. A concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio foi de 2,77 μM em pH 5,5 e 0,056 μM em pH 7,0, mostrando que as bactérias incubadas em meios com pH 5,5 foram mais resistentes à monensina que aquelas incubadas em meios com pH 7,0. Os ionóforos e a acidez do meio reduziram a produção de amônia, sem haver interação sobre os mesmos. Não houve diferença entre os ionóforos onde, independente do pH do meio, os mesmos inibiram a produção de amônia em 56%. A acidez, por sua vez, inibiu a produção de amônia em 50,5%, independente dos ionóforos. No entanto, o efeito dos ionóforos e acidez foram aditivos, onde a inibição máxima ocorreu pelo uso de ionóforos em baixo valor de pH (75,2%). A produção de proteína microbiana foi menor quando a lasalocida estava presente no meio de cultura com baixo valor de pH.

PALAVRAS CHAVE: bactérias, fermentação, lasalocida, monensina, pH, rúmen

***IN VITRO* EFFECTS OF pH ON RESISTANCE OF RUMINAL BACTERIA TO INTRACELLULAR POTASSIUM DEPLETION, AND EFFECTS OF pH AND IONOPHORES ON AMMONIA AND MICROBIAL PROTEIN PRODUCTION**

ABSTRACT: Were carried out two studies, in which the fluid from steers fed pasture was used in incubations with different artificial media in pH 5.5 and 7.0, in order to evaluate the action of increasing levels of monensin in the resistance to intracellular potassium losses by mixed ruminal bacteria and verify the effect of monensin and lasalocid on ammonia and microbial protein production at pH 5.5 and 7.0. The media culture affected the potassium absolute values. The monensin concentration needed to cause half maximal potassium depletion was 2.77 μM in pH 5.5, and 0.056 μM in pH 7.0, showing that bacteria incubated in pH 5.5 were more tolerant to monensin than those incubated in pH 7.0. The ionophores and acidity decreased ammonia production, without interaction between them. In addition, there was no difference between ionophores that, independently of the medium pH, both inhibited ammonia production by 56%. The acidity, on the other hand, inhibited ammonia production by 50.5%, independently of the ionophores. Therefore, the effect of the ionophores and acidity were additive, the maximum inhibition occurred by the presence of ionophores at low pH value (75.2%). The microbial protein production was lowest when lasalocid was present in the culture media at low pH, causing inhibition of microbial growth.

KEYWORDS: bacteria, fermentation, lasalocid, monensin, pH, rumen

INTRODUÇÃO

Monensina e lasalocida são antibióticos (ionóforos) usados para aumentar a eficiência alimentar de ruminantes (GOODRICH et al., 1984). A eficiência alimentar é considerada o melhor parâmetro para se avaliar o efeito de ionóforos no desempenho animal, mas experimentos utilizando grande número de animais são caros e demorados. Há, portanto, a necessidade de se aperfeiçoar uma técnica *in vitro* que seja eficiente e de baixo custo.

Os ionóforos inibem principalmente as bactérias Gram-positivas, uma vez que a resistência aos ionóforos está relacionada à presença de uma membrana externa, de natureza lipopolissacarídica, existente em bactérias Gram-negativas (RUSSELL & STROBEL, 1988). A monensina é um antiporte que catalisa não apenas trocas de sódio (alta afinidade) e prótons em nível de membrana plasmática, como também permite trocas de prótons e potássio. Já a lasalocida transporta muitos cátions mono e bivalentes (incluindo prótons), e tem maior afinidade por K^+ (PRESSMAN, 1973 e 1976). LANA & RUSSELL (1996) apresentaram uma técnica para avaliação da resistência da população microbiana ruminal *in vivo*, com base na avaliação da diminuição do nível de potássio intracelular quando as bactérias são submetidas a níveis crescentes de ionóforos *in vitro*.

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada através de alterações de pH, fornecimento de ionóforos (antibióticos naturais), entre outros, com intuito de diminuir perdas de energia e proteína por fermentações indesejáveis e os impactos ambientais provenientes da emissão de metano na atmosfera.

O efeito dos ionóforos é mais drástico com dietas à base de forragem, pois sob estas condições, a taxa de degradação de proteína é muito maior que a taxa de

fermentação de carboidratos, tornando os níveis de amônia ruminal mais elevados (RUSSELL, 1996).

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do pH na resistência das populações de bactérias do rúmen à perda de potássio intracelular, bem como no efeito do pH associado aos ionóforos monensina e lasalocida sobre a produção de proteína microbiana e de amônia, utilizando-se técnica de incubação *in vitro* em diferentes meios.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo 1

Foram coletados 500 mL de líquido de rúmen de bovino fistulado duas horas após a alimentação com capim Coast-cross (*Cynodon dactylon*). O líquido foi filtrado em quatro camadas de gaze, transportado sob anaerobiose para o laboratório, colocado em erlenmeyer e mantido a 39°C por 30 minutos, sendo coletada a fase intermediária do mesmo, seguida de centrifugação a 500 \times g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 1.200 \times g por 10 minutos para obtenção do sedimento de populações de bactérias do rúmen, sendo então suspenso em metade do volume inicial com solução salina (0,9%) e usado como inóculo nos diferentes meios de cultura.

Os meios utilizados foram preparados a partir do sobrenadante de líquido ruminal centrifugado a 500 \times g por 15 minutos, autoclavado durante 20 minutos e diluído (1:5) com tampão McDougall (9,8 g de NaHCO₃, 0,57 g de KCl, 0,47 g de NaCl, 0,05 g de CaCl₂.2H₂O, 7 g de NaHPO₄.7H₂O e 0,12 g de MgSO₄.7H₂O; SILVA & QUEIROZ, 2002), tampão McDougall enriquecido por litro com 10 ml de solução padrão de vitaminas (10 mg de piradoxamina 2HCl, 20 mg de riboflavina, 20 mg de tiamina HCl, 20 mg de nicotinamida, 20 mg de CaD – pantotenato, 10 mg de ácido lipóico, 1 mg de ácido p-aminobenzóico, 0,5 mg de ácido fólico, 0,5 mg de biotina, 0,5 mg de cianocobalamina, 10 mg de piridoxal HCl e 10 mg de piridoxina HCl por 100 ml de 0,1 M K₂HPO₄ ou 0,1 M KH₂PO₄ em pH 6,0,) e 5 ml de minerais (500 mg de

Na₄EDTA, 200 mg de FeSO₄ · 7H₂O, 10 mg de ZnSO₄ · 7H₂O, 200 mg de MnCl₂ · 4H₂O, 20 mg de H₃BO₃, 20 mg de CoCl₂ · 6H₂O, 1 mg de CuCl₂ · 2H₂O, 2 mg de NiCl₂ · 6H₂O, 3 mg de NaMoO₄ · 2H₂O por litro de H₂O destilada), e meio Chen (292 mg de K₂HPO₄ · 3H₂O, 240 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg MgSO₄ · 7H₂O, 64 mg de CaCl₂ · 2H₂O, 4000 mg de Na₂CO₃ e 600 mg de cisteína por litro de H₂O destilada; LANA & RUSSELL, 1996), sendo todos novamente autoclavados por 12 minutos.

Incubou-se 7,6 mL de cada um dos três meios em pH 5,5 e 7,0, em duplicata, acrescentando-se 1 mL do inoculo, 1 mL de caseína hidrolisada (tripticase) à 15%, 0,2 mL de etanol à 99% e 0,2 mL de glicose à 1,5%. A incubação foi feita a 39°C sob anaerobiose durante três dias, realizando-se transferência a cada 24 h de 1 mL da cultura inicial para novos tubos nas mesmas condições acima. No terceiro dia foi feito o teste de resistência bacteriana, transferindo-se 1,4 mL do meio incubado para cinco novos tubos, adicionando-se 0,1 mL de solução de etanol (99%) com níveis crescentes de monensina (0; 0,16; 0,31; 1,25 e 5 µM como concentração final), seguindo-se uma incubação de 10 minutos a 39°C em anaerobiose. De acordo com LANA & RUSSELL (1996) coletou-se 1 mL de amostras em tubos de 1,5 mL e centrifugou-se a 10.000 x g por cinco minutos, através de uma camada de 0,3 mL de óleo silicone (mistura 50:50 dos óleos Hysol 550 e 560 - Hysol Co., Olean, NY). Os tubos foram congelados a -20°C, os sedimentos celulares removidos pelo corte da parte inferior dos mesmos e as células digeridas com de HNO₃ 3N em mesmo volume final do meio. O resíduo não digerido foi removido por centrifugação 10.000 x g por cinco minutos e o potássio determinado em espectrofotômetro de chama. A perda do potássio celular foi estimada em relação às amostras incubadas sem monensina.

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 3 x 2 x 5 (3 meios, 2 valores de pH e 5 níveis de monensina), com duas repetições, sendo realizadas análises de variância, incluindo os efeitos principais e de interação (SAS, 1999). Fez-se

análise de regressão da recíproca da perda de potássio intracelular em função da recíproca da concentração de monensina para se determinar a perda máxima de potássio (K_{max}) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio (K_d), segundo LANA & RUSSELL (1996).

Estudo 2

Um bovino fistulado no rúmen, alimentado uma vez ao dia com dieta exclusiva de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, foi utilizado como doador de líquido de rúmen. Após a incubação *in vitro* do líquido, coletado duas horas após alimentação, acrescido de amido (10g/L) a 39°C em anaerobiose por 19 horas, até atingir pH de 5,5. O meio foi resfriado a 5°C e centrifugado a 500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi autoclavado por 20 minutos e armazenado em geladeira. Para obter líquido de rúmen com valor de pH 7,0, o mesmo foi coletado antes da alimentação, resfriado a 5°C e centrifugado a 500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi autoclavado por 20 minutos e armazenado em geladeira.

O inóculo foi obtido de líquido ruminal coletado duas horas após a alimentação, mantido em banho-Maria a 39°C sob anaerobiose, ficando em repouso por 30 minutos para a obtenção do líquido da fase intermediária com as populações de bactérias do rúmen.

Incubaram-se a 39°C, em anaerobiose, 7,8 mL dos meios (pH 5,5 ou 7,0), em duplicata, acrescentando-se 1 mL de inóculo, 1 mL de caseína hidrolisada (tripticase 15%) e 0,2 mL de etanol à 99%, na ausência (controle) ou presença dos ionóforos monensina e lasalocida, durante oito dias. Os ionóforos foram adicionados para atingir 5 µM. A solução alcoólica usada acima foi obtida adicionando-se 0,03465 g de

monensina ou 0,03065 g de lasalocida por 20 mL de etanol (99%), seguida de diluição de 1:9 com etanol.

A cada 24 horas de incubação foi retirado 1,0 mL da cultura para a determinação de amônia (CHANNEY & MARBACH, 1962) e 1,0 mL para análise de proteína microbiana (LOWRY et al., 1951). Em seguida, estes foram centrifugados em tubos de 1,5 mL a 10.000 \times g por 10 minutos e o sobrenadante ou o sedimento celular foram coletados e congelados para posteriores análises. Na obtenção do sedimento celular, foi acrescentado 1 mL de solução salina (0,9% de NaCl) na amostra acima, centrifugando-se a 10.000 \times g por 10 min e retirando-se o sobrenadante. Adicionou-se novamente 1 mL de solução salina, centrifugou-se, retirou-se o sobrenadante e o sedimento celular foi dissolvido em água destilada ao volume inicial de 1 mL.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso para avaliar os efeitos de ionóforos, em dois valores de pH, em duplicata, durante oito dias. Foram realizadas análises de variância, avaliando-se os efeitos dos aditivos, pH e suas interações (SAS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração inicial de potássio intracelular foi maior em meio onde as bactérias foram submetidas ao pH 7,0, ocorreu um decréscimo com abaixamento de pH e aumento do nível de monensina ($P < 0,001$; Tabela 1). O meio contendo líquido ruminal (LR) apresentou valores maiores de potássio, isto provavelmente, em razão do alto teor de potássio, quando comparado com os meios McDougall enriquecido e Chen. O meio para determinar a perda de potássio interferiu nos valores absolutos de potássio, porém sem alterar a ação de níveis crescentes de monensina. A medida que se aumentou a concentração de monensina houve redução da concentração de potássio intracelular das populações bacterianas do rúmen (Tabela 1). O meio pode causar contaminações de

sódio e potássio (RUSSELL, 1987), que podem interferir na ação do ionóforo, pois esta depende do gradiente de concentração do íon na membrana.

Tabela 1 - Concentração de potássio intracelular (mmol/L) em populações de bactérias do rúmen incubadas em diferentes meios de cultura e pH, e tratadas com cinco níveis de monensina a 39°C por 10 minutos¹

Concentração de monensina (µM)	LR + McDougall		McDougall enriquecido		Chen	
	PH 5,5	pH 7,0	PH 5,5	pH 5,5	pH 5,5	pH 5,5
0,00	12,8	35,8	5,7	17,9	6,4	11,5
0,16	12,8	23,0	5,1	10,2	5,1	7,7
0,31	11,5	24,3	5,1	10,2	3,8	8,9
1,25	10,2	20,5	5,1	18,9	3,8	7,7
5,00	8,9	16,6	5,1	7,7	2,5	6,4

¹ Houve efeito de meio de cultura, pH e monensina (P<0,001).
LR = líquido ruminal.

A partir das equações de regressão linear ($y = a + bx$) da recíproca da concentração de monensina versus a recíproca da perda de potássio intracelular para os valores de pH de 5,5 e 7,0 nos diferentes meios, obteve-se as constantes de resistência a monensina, onde a perda máxima de potássio (K_{max}) pode ser obtida pelo inverso do intercepto da ordenada ($1/a$) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima (K_d) pela divisão da inclinação da reta pelo intercepto da ordenada (b/a ; Figura 1).

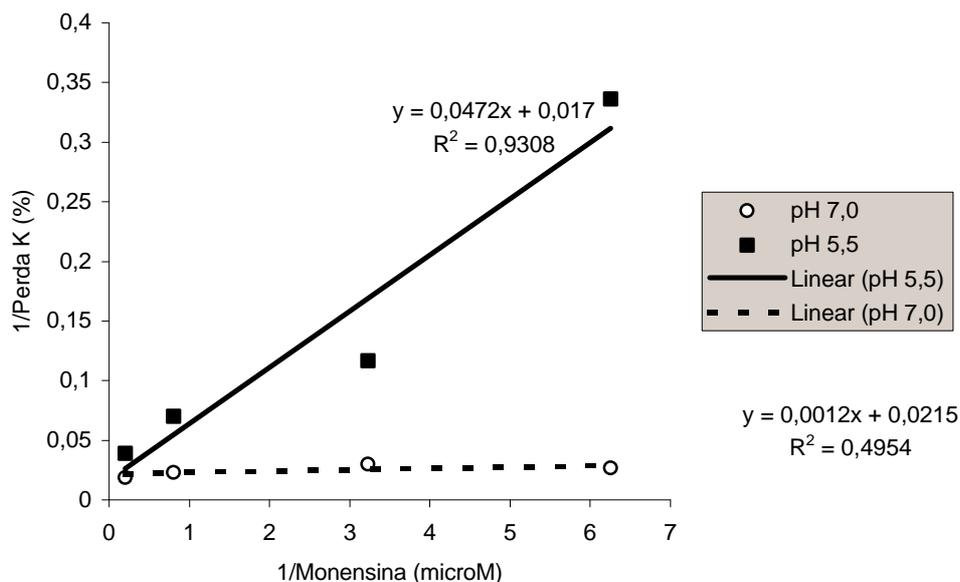


Figura 1 – Relação entre a recíproca da concentração de monensina e a recíproca da perda de potássio intracelular em populações de bactérias do rúmen em meios com valores de pH de 5,5 e 7,0.

Há perda do potássio intracelular pela ação da monensina *in vitro* em dois valores de pH e em meios diferentes, sendo, que as curvas foram obtidas pelas médias das repetições (Figuras 2).

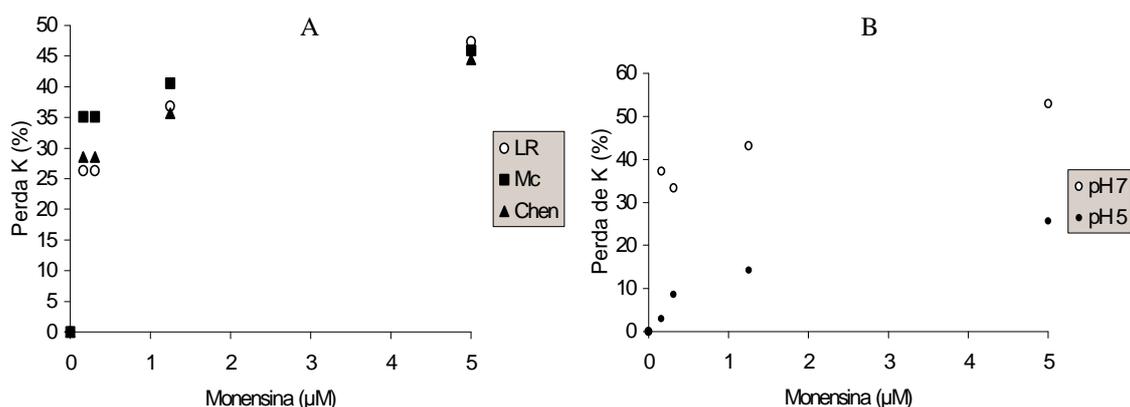


Figura 2 – (A) Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em diferentes meios (LR – líquido de rúmen; Mc – McDougall). (B) Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em dois valores de pH.

O K_{max} obtido foi de 58,8% para o pH 5,5 e 46,5% para o pH 7,0. O efeito de pH foi mais expressivo no K_d , em que o mesmo foi de 2,77 μM no pH 5,5 e 0,056 μM de monensina no pH 7,0. Este efeito demonstra que as bactérias incubadas em meios com pH 5,5 são mais resistentes à monensina que aquelas incubadas em meios com pH 7,0 (Figura 1).

Foi constatado em trabalhos anteriores maior tolerância à perda do potássio intracelular pela ação da monensina *in vitro* em bactérias provenientes de animais recebendo dietas contendo lipídios ou os ionóforos monensina e lasalocida (LANA & RUSSELL, 1996) ou nível elevado de concentrado em relação à volumoso (LANA & RUSSELL, 2001). Estes efeitos foram consistentes com a possível mudança das populações de bactérias do rúmen de Gram-positiva para Gram-negativa e conseqüente mudança nos parâmetros de fermentação ruminal, como a diminuição da relação acetato: propionato no líquido ruminal e da produção de metano.

O pH do meio também pode alterar as populações de bactérias do rúmen quanto a perda de potássio intracelular (Figura 1 e 2). O pH baixo reduz o pH intracelular com conseqüente redução na atividade enzimática, assim diminui ou inibe o crescimento celular de algumas populações de bactérias, enquanto outras mais adaptadas a pH baixo, como é o caso do *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus sp.*, proliferam.

No segundo estudo, os ionóforos monensina e lasalocida e a acidez do meio reduziram a produção de amônia, sem haver interação sobre os mesmos (Figura 3). Não houve diferença entre os ionóforos onde, independente do pH do meio, os mesmos inibiram a produção de amônia em 56%. A acidez, por sua vez, inibiu a produção de amônia em 50,5%, independente dos ionóforos. Portanto, o efeito dos ionóforos e acidez foram aditivos, onde a inibição máxima ocorreu pelo uso de ionóforos em baixo valor de pH (75,2%).

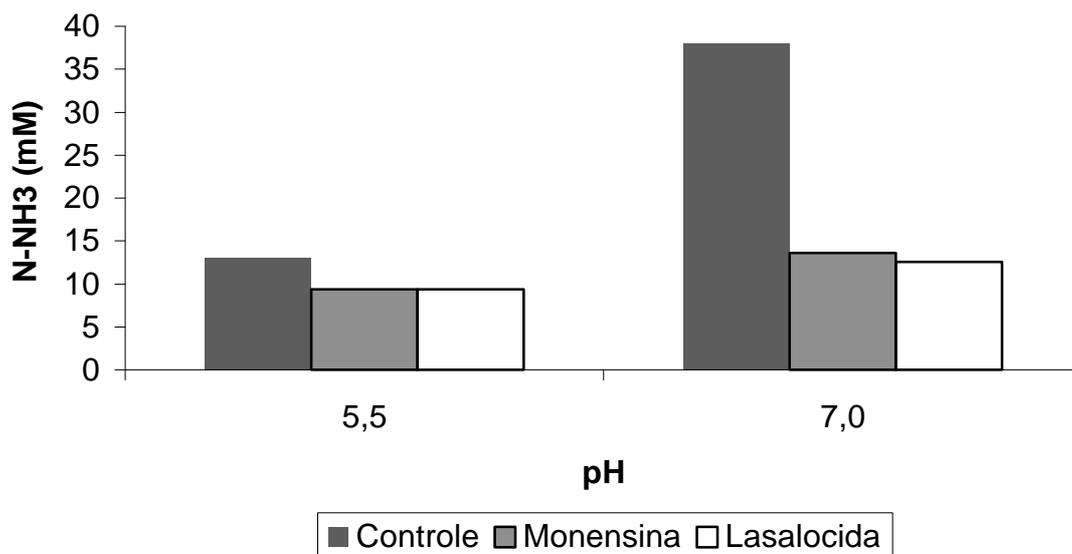


Figura 3 – Produção média de amônia (mM) após 24 horas de incubação *in vitro* de populações de bactérias do rúmen sob dois valores de pH e ionóforos (monensina e lasalocida).

O efeito de ionóforos em reduzir a produção de amônia foi verificado anteriormente, tanto *in vitro* (VAN NEVEL & DEMEYER, 1977) como *in vivo* (DINIUS et al., 1976). A menor produção de amônia (10,6 mM) no pH 5,5 está de acordo com o observado por LANA et al. (1998). O decréscimo da produção de amônia devido à ação dos ionóforos é consequência da redução da degradação da proteína. Este fato é de grande importância para o desempenho animal, pois caracteriza o efeito chamado *protein-sparing*. Isto significa aumento da quantidade da proteína da dieta que escapa da degradação ruminal e se torna disponível para a digestão no abomaso e intestino delgado, e posterior absorção dos aminoácidos pelo intestino delgado (VAN NEVEL & DEMEYER, 1977; RUSSELL, 1996). Esses mesmos efeitos podem ser observados quando ocorre acidificação do meio devido ao fornecimento de carboidratos de alta taxa de fermentação (LANA et al., 1998).

De modo geral, não houve efeito dos ionóforos e acidez sobre a produção de proteína microbiana (990,8 mg/L), exceto quando a lasalocida estava presente no meio

de cultura com baixo valor de pH. Neste caso, ocorreu inibição do crescimento microbiano (Figura 4). Estudos anteriores com culturas de populações de bactérias do rúmen indicaram que a monensina causou decréscimo na quantidade de proteína microbiana, quando a tripticase foi usada como substrato da fermentação (VAN NEVEL & DEMEYER,1977; RUSSELL & MARTIN,1984). LANA e RUSSELL (1996), usando uma nova técnica de determinação da resistência microbiana à perda do potássio intracelular, observaram que a lasalocida foi mais potente inibidor *in vitro* dos microrganismos ruminais que a monensina, estando de acordo com o resultado obtido no segundo estudo.

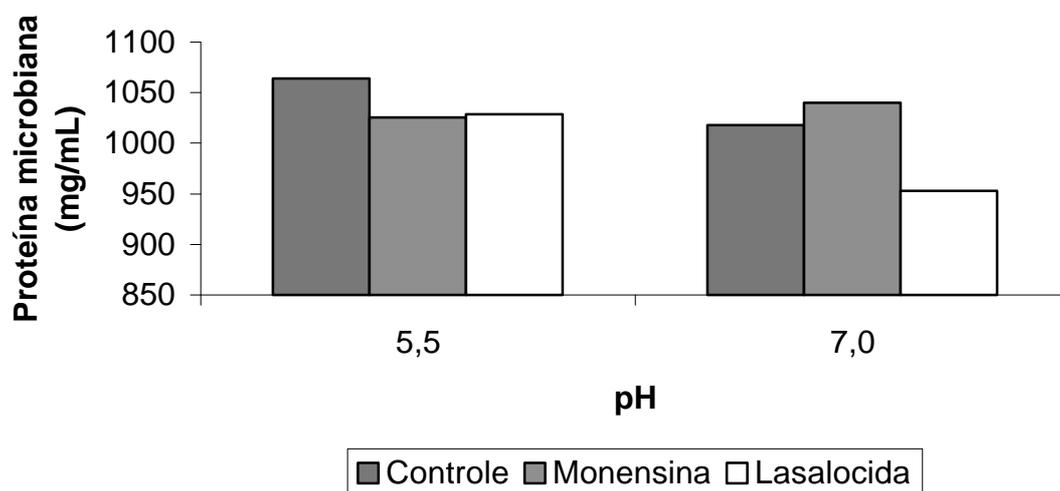


Figura 4 – Proteína microbiana (mg/L) média após 24 horas de incubação *in vitro* de populações de bactérias do rúmen sob dois valores de pH com ou sem ionóforos (monensina e lasalocida).

CONCLUSÕES

O aumento da acidez torna a população microbiana do rúmen mais resistente à perda de potássio intracelular quando testado com monensina.

Os ionóforos e acidez possuem efeito sinérgico na redução da produção de amônia.

A lasalocida inibe o crescimento de populações de bactérias do rúmen em meio de cultura com baixo valor de pH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- DINIUS, D.A.; SIMPSON, M.E.; MARSH, P.B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, v.42, p.229-234, 1976.
- GOODRICH, R.D.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.484-498, 1984.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied Environmental Microbiology** v.62, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- PRESSMAN, B.C. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. **Fed. Proc.** v. 32, p. 1698-1703, 1973.
- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Review Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.
- RUSSELL, J.B. Bacteria: Mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. Symposium Scientific Update on Rumensin/Tylan for the Professional Feedlot Consultant, August 19, 1996, Amarillo, TX., Elanco Animal Health, Indianapolis. In: **Proceedings...**, 1996. p.E1-E19.
- RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1329-1338, 1984.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v.66, p.552-558, 1988.
- SAS, 1999. **User's Guide - Release 6.13**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. **Applied Environmental Microbiology**, v.34, p.251-257, 1977.

RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS DO RÚMEN À PERDA DO POTÁSSIO INTRACELULAR POR AÇÃO DE LASALOCIDA, MONENSINA E PRÓPOLIS *IN VITRO* SOB DOIS VALORES DE pH

RESUMO: Dois bois castrados mantidos em pastagem foram utilizados como doadores de líquido ruminal. Sendo que, a população de bactérias do rúmen foi utilizada para avaliar a ação de níveis crescentes de monensina, lasalocida e própolis na resistência à perda de potássio intracelular em dois valores de pH. O pH do meio utilizado na incubação de 10 minutos não interferiu na perda de potássio intracelular quando se utilizou lasalocida, mas a perda máxima de potássio intracelular (K_{max}) foi maior em bactérias de animal consumindo dieta rica em volumoso que em concentrado (54,8 vs 32,5%). Já nas incubações com monensina houve interação entre o pH do meio e a procedência das bactérias ruminais. Em meio com pH 7,0, houve necessidade de apenas 0,072 μ M de monensina para causar metade da perda máxima de potássio intracelular (K_d) em bactérias de animal consumindo dieta rica em volumoso comparado a 0,425 μ M em dieta rica em concentrado. Em meios com pH 5,5 não houve diferença na concentração de monensina (0,147 vs 0,130 μ M) para causar metade da perda máxima de potássio. Estes resultados mostram ser as bactérias de animais recebendo dietas ricas em volumoso mais sensíveis aos ionóforos. A própolis não interferiu no conteúdo de potássio celular, indicando modo de ação sobre as bactérias diferente dos ionóforos.

PALAVRAS CHAVE: bactérias, lasalocida, monensina, pH, própolis, rúmen.

**RESISTANCE OF RUMINAL BACTERIA TO INTRACELLULAR
POTASSIUM DEPLETION BY LASALOCID, MONENSIN AND PROPOLIS
ACTION UNDER TWO VALUES OF pH *IN VITRO***

ABSTRACT: Two steers kept in Coast-cross pasture were used as ruminal fluid donors. The ruminal bacterial population was used to evaluate the action of increasing levels of monensin, lasalocid and bee propolis on the intracellular potassium depletion in two values of pH. The pH values from media used in 10 minutes incubation did not affect potassium depletion when lasalocid was used, but maximum intracellular losses of potassium (K_{max}) were higher in bacteria from animal fed diet rich in forage than concentrate (54.8 vs 32.5%). There was interaction between media pH and origin of ruminal bacteria when monensin was used *in vitro*. In the media with pH 7.0 only 0.072 μ M of monensin was needed to cause half maximal potassium depletion (K_d) in bacteria from animal fed diet rich in roughage compared to 0.425 μ M in diet rich in concentrate. There wasn't difference in media with pH 5.5 in the monensin concentration (0.147 vs 0.130 μ M) to cause half maximal potassium depletion. These results show that bacteria from animal fed diet rich in roughage are more sensitive to ionophores. The bee propolis did not cause potassium depletion in ruminal bacteria population, therefore its mode of action on bacteria is different from the ionophores.

KEYWORDS: bacteria, lasalocid, monensin, pH, propolis, rumen.

INTRODUÇÃO

Lasalocida e monensina são antibióticos poliéter carboxílicos que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas (GOODRICH et al., 1984) e são rotineiramente utilizados na alimentação de bovinos confinados consumindo grandes quantidades de grãos. Nesta situação, bactérias Gram-positivas apresentam alta produção de gases e de amônia e são causadoras de acidose ruminal, conseqüentemente diminuindo a eficiência produtiva dos animais.

A própolis também tem revelado ser excelente agente antibacteriano, com especificidade sobre bactérias Gram-positivas (PARK & IKEGAKI, 1998) e como substância natural, relativamente atóxica, a torna mais atrativa do que os outros antibióticos utilizados para manipulação das populações de bactérias do rúmen.

O mecanismo de ação da própolis parece ser complexo e portanto, uma simples analogia não pode ser feita ao modo de ação dos antibióticos clássicos (SANTOS et al, 2002). PARK et al. (1998) relataram nenhuma ação sobre *Escherichia coli* (Gram-negativa). MARCUCCI et al. (2001) comprovaram a atividade antibacteriana da própolis e suas frações contra bactérias anaeróbias.

As maiores quantidades de flavonóides (pinocembrina, pinobaskina, isosakuranetina, galangina e sakuranetina) extraídas da própolis são obtidas quando se usa solução de etanol de 60 a 80%, faixa de concentração em que causa forte inibição no crescimento microbiano (PARK & IKEGAKI, 1998; KOO et al., 2000).

A manipulação da fermentação ruminal priorizando o aumento da produção de propionato, a exemplo de aditivos, implicam, conseqüentemente, na diminuição da produção de metano no rúmen, devido à existência no ecossistema ruminal de uma relação inversa entre a produção de metano e a de ácido propiônico. O mecanismo pelo qual se explica essa relação inversa consiste em direcionar hidrogênio e carbono

excedentes na produção de acetato e portanto, disponíveis para metanogênese (NAGARAJA & TAYLOR, 1987; RUSSELL & STROBEL, 1989). Logo, uma das formas de atuação dos aditivos seria inibir a ação das bactérias Gram-positivas produtoras de acetato, porém, não inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas produtoras de succinato e propionato.

Embora o pH do rúmen de bovinos confinados, submetidos a dieta rica em grãos, seja normalmente abaixo de 6,0, as incubações *in vitro* frequentemente são realizadas em pH próximo do neutro (7,0). Devido ao fato dos ionóforos lasalocida e monensina serem carboxílicos, parece ser lógico que o pH do meio afeta a atividade antimicrobiana dos mesmos. Estes ionóforos catalisam não apenas trocas de sódio e prótons em nível de membrana plasmática, como também permite trocas de prótons e potássio (PRESSMAN, 1973 e 1976).

O objetivo deste trabalho foi utilizar técnica anaeróbia *in vitro* para avaliar o efeito de pH sobre a resistência das populações de bactérias do rúmen à perda de potássio intracelular por ação de lasalocida, monensina e própolis.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois bovinos machos castrados, fistulados no rúmen, pesando 609 e 659 kg, mantidos em pastagem de Coast-cross (*Cynodon dactylon*), um recebendo 1kg de farelo de soja e outro 7 kg de milho quebrado por dia. Foram coletados 500 mL de líquido ruminal duas horas após a alimentação, filtrados em quatro camadas de gaze e transportados em garrafas térmicas para o laboratório. Foi medido o pH de cada um dos líquidos de rúmen através de potenciômetro de hidrogênio, onde o líquido do animal recebendo farelo de soja foi de 6,7 e o do animal recebendo milho foi de 5,66. O líquido foi centrifugado duas vezes a $500 \times g$ a $5^{\circ}C$ por 15 minutos. As bactérias foram obtidas

a partir do sobrenadante das centrifugações posteriores, a $10.000 \times g$ a $5^{\circ}C$ por 10 minutos para obtenção do sedimento celular, sendo este suspenso em metade do volume inicial com meio artificial em pH 5,5 e 7,0 e usado nas incubações com diferentes concentrações dos aditivos (lasalocida, monensina e própolis).

O meio artificial utilizado continha 292 mg de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4000 mg de Na_2CO_3 e 600 mg de cisteína (LANA & RUSSELL, 1996), sendo autoclavado por 15 minutos.

Adicionaram-se 1,4 mL de cada meio (pH 5,5 e 7,0) em tubos de ensaio de 10 mL de volume, para o teste de resistência bacteriana á perda de potássio, acrescentado-se 0,1 mL de solução de etanol (99%) com níveis crescentes de lasalocida e monensina (0; 0,16; 0,31; 1,25; e 5 μM como concentração final) e própolis (0; 2,7; 5,4; 6,75; e 10,8 mg/mL como concentração final), seguindo-se uma incubação de 10 minutos a $39^{\circ}C$ em anaerobiose. De acordo com LANA & RUSSELL (1996) foi coletado 1 mL de amostra em tubos de 1,5 mL e centrifugou-se a $10.000 \times g$ por cinco minutos, através de uma camada de 0,3 mL de óleo silicone (mistura 50:50 dos óleos DC 550 e 556 – Dow Corning Co., Midland, Michigan). Os tubos foram congelados a $-20^{\circ}C$ e os sedimentos celulares removidos pelo corte da parte inferior dos mesmos, sendo as células digeridas com ácido nítrico a 3N (HNO_3) em mesmo volume final do meio. O resíduo não digerido foi removido por centrifugação $10.000 \times g$ por cinco minutos e o potássio foi determinado em espectrofotômetro de chama. A perda de potássio intracelular foi estimada em relação às amostras incubadas sem antibiótico.

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 2 x 2 (2 valores de pH e 2 dietas), com quatro repetições, sendo realizadas análises de variância, incluindo os efeitos principais e de interação (SAS, 1999). Fez-se análise de regressão da

recíproca da perda de potássio intracelular em função da recíproca da concentração de monensina para se determinar a perda máxima de potássio (K_{max}) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio (K_d), segundo LANA & RUSSELL (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constata-se que houve perda de potássio intracelular de acordo com a concentração de lasalocida e monensina, no entanto, o mesmo não foi verificado com a própolis. Neste tratamento ocorreu pequeno aumento da concentração de potássio (Figura 1). Ainda, é importante ressaltar que a solução alcoólica de própolis possui alta concentração de potássio (767,3 a 2557,5 $\mu\text{mol/ml}$ para menor e maior concentração de própolis, respectivamente) que pode incorrer em contaminação das amostras preparadas para leitura de potássio intracelular. Este resultado sugere que a própolis, no nível utilizado, não atuou como a monensina e lasalocida, indicando possivelmente, diferente modo de ação sobre as populações de bactérias do rúmen. O modo de ação da própolis é complexo e ainda, desconhecido, mas sua atividade antibacteriana é atribuída ao sinergismo entre os compostos fenólicos e outras substâncias presentes na resina. A própolis age sobre enzimas que inibem a lipoxigenase, a proteína quinase C, fosfodiesterase AMP cíclico e outro fator que inibe a MAP quinase (MARCUCCI et al., 2001).

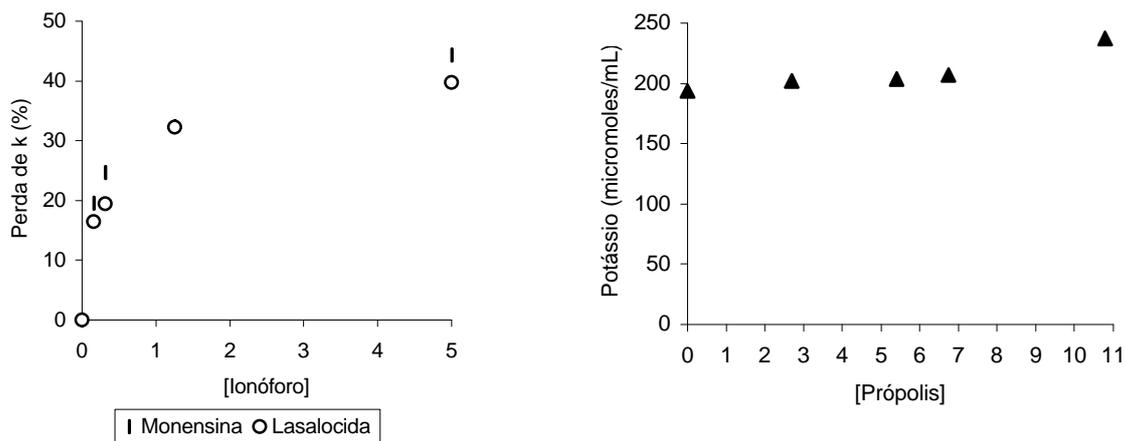


Figura 1 – (A) Relação entre a concentração dos ionóforos (monensina e lasalocida em M) e a perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas em meio artificial por 10 minutos a 39°C. (B) Relação entre a concentração de própolis (mg/mL) e a concentração de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas em meio artificial por 10 minutos a 39°C. Cada ponto é a média de 16 observações.

As constantes de resistência para lasalocida e monensina foram obtidas através da plotagem da recíproca da concentração de cada ionóforo pela recíproca da respectiva perda de potássio. Assim, a perda máxima de potássio (K_{max}) pode ser obtida pelo inverso do intercepto da ordenada ($1/a$) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima (K_d) pela divisão da inclinação da reta pelo intercepto da ordenada (b/a), onde $y = a + bx$.

O maior K_{max} obtido foi de 66,8% para as bactérias provenientes do animal alimentado com volumoso, e incubadas em meio com pH 5,5 e monensina. Já o menor K_{max} foi de 25,1% para as bactérias obtidas do líquido ruminal do animal alimentado com alto teor de concentrado e incubadas em meio com pH 5,5 e monensina (Tabela 1). Houve interação ($P < 0,01$) entre o pH do meio e a proveniência das bactérias ruminais, se de animal alimentado com volumoso ou concentrado. Isto é confirmado pelo K_d de somente 0,072 μM de monensina necessário para sensibilizar as bactérias provenientes do animal alimentado com volumoso (pH 6,7) e incubadas em meio com pH 7,0,

quando comparado com o K_d de 0,425 μM de monensina para sensibilizar as bactérias provenientes de animal alimentado com alto teor de concentrado (pH 5,66) e incubadas em meio com pH 7,0, diferença esta que não ocorreu quando o pH do meio era 5,5 (0,147 vs 0,130 μM de monensina).

Tabela 1 – Efeitos da lasalocida e monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias rúmen de animais submetidos a alimentação à base de volumoso ou de concentrado, incubadas por 10 minutos a 39°C em dois valores de pH

Bactérias do rúmen/ pH do meio <i>in vitro</i>	Lasalocida		Monensina	
	K_d (μM)	K_{max} (%)	K_d (μM)	K_{max} (%)
Volumoso (6,7) ¹ / 5,5	0,437	62,9	0,147	66,8
Concentrado (5,66) ¹ / 5,5	0,218	34,0	0,130	25,1
Volumoso (6,7) ¹ / 7,0	0,398	46,6	0,072	31,3
Concentrado (5,66) ¹ / 7,0	0,371	31,1	0,425	54,3
pH do meio * dieta	-	-	-	P<0,01

¹Valor do pH do líquido ruminal após a coleta.

^{a,b}Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05), comparações feitas entre cada constante do mesmo ionóforo.

A lasalocida também causou perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen, cujo maior K_{max} foi de 62,9% e o menor de 31,1% (Tabela 1). O pH do meio utilizado na incubação de 10 minutos não interferiu na perda de potássio quando se utilizou lasalocida, mas mostrou K_{max} significativo (P<0,01) com a procedência das bactérias incubadas, se de líquido ruminal de animal submetido a dieta rica em volumoso ou em concentrado. Quanto ao K_d não houve variações significativas (0,218 a 0,437 μM), no entanto foi necessário maior concentração de lasalocida para causar metade da perda máxima de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen do que monensina (Tabela 1).

Foi constatado em trabalhos anteriores maior tolerância à perda do potássio intracelular pela ação da monensina *in vitro* em bactérias provenientes de animais submetidos a dietas contendo lipídios ou ionóforos monensina e lasalocida (LANA &

RUSSELL, 1996) ou nível elevado de concentrado em relação a volumoso (LANA & RUSSELL, 2001).

CONCLUSÕES

As populações de bactérias do rúmen de animais submetidos a dietas ricas em volumoso são mais sensíveis aos ionóforos monensina e lasalocida. Portanto, o uso destes ionóforos seria mais eficiente se utilizados em animais submetidos a pastagem ou dietas ricas em volumoso.

A própolis não causou perda de potássio intracelular nas populações de bactérias do rúmen, demonstrando não agir como um ionóforo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOODRICH, R.D.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1484-1498, 1984.
- KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v.45, p.141-148, 2000.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.105-112, 2001.
- NAGARAJA, T.G.; TAYLOR, M.B. Susceptibility of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1620, 1987.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v.62, n.11, p.2230-2232, 1998.
- PARK, Y.K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M. et al. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
- PRESSMAN, B.C. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. **Fed. Proc.** v.32, p.1698-1703, 1973.
- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview: effects of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M. et al. Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.1-7, 2002.

SAS, 1999. **User's Guide Release 6.13**. SAS Institute Inc. Cary. NC, USA.

**RESISTÊNCIA À PERDA DO POTÁSSIO INTRACELULAR DE
POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS DO RÚMEN DE VACAS LACTANTES
SUBMETIDAS A DIETAS COM ÓLEO DE SOJA E, OU, MONENSINA, E
PRODUÇÃO DE GASES *IN VITRO* COM MONENSINA, LASALOCIDA OU
PRÓPOLIS**

RESUMO: Dois estudos foram realizados com vacas lactantes utilizadas como unidade experimental e doadoras de líquido ruminal, sendo as populações de bactérias utilizadas para avaliar a ação de níveis crescentes de lasalocida e monensina na resistência à perda de potássio intracelular, e para produção de gases *in vitro*. O K_{max} da lasalocida foi menor para as populações de bactérias obtidas do líquido de rúmen das vacas submetidas a dietas com monensina, óleo de soja e monensina mais óleo de soja (19,4 a 25,4%) quando comparado com aquele (30,1%) das vacas submetidas a dietas sem ionóforo e óleo de soja. O mesmo ocorreu para o K_{max} da monensina, onde o menor foi de 6,5% para monensina mais óleo e o maior de 29,5% para o controle. Necessita-se de alta concentração de monensina ($K_d = 2,3 \mu\text{M}$), porém baixa de lasalocida ($K_d = 0,218 \mu\text{M}$) para causar a metade da perda máxima de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas com monensina. Não há resistência cruzada entre os dois ionóforos testados *in vitro*. As amostras incubadas com própolis produziram menor volume de gases (12,9 mL/100 g de MS), porém monensina e lasalocida também reduziram a mesma. Isto representa uma menor perda de energia para animais submetidos a dietas com própolis, monensina ou lasalocida.

PALAVRAS CHAVE: lasalocida, monensina, óleo de soja, potássio intracelular, produção de gases, própolis

**RESISTANCE TO POTASSIUM DEPLETION BY RUMINAL BACTERIA
FROM DAIRY COWS FED DIETS CONTAINING SOYBEAN OIL AND/OR
MONENSIN AND *IN VITRO* GAS PRODUCTION WITH MONENSIN,
LASALOCID OR PROPOLIS**

ABSTRACT: Two studies were conducted with lactating cows as experimental units and ruminal fluid donors. The ruminal bacteria population were used to evaluate the action of increasing levels of lasalocid and monensin in the resistance of intracellular potassium depletion and gas production with monensin, lasalocid or propolis. Potassium depletion technique showed that K_{max} of lasalocid was lower to ruminal bacteria population obtained from of cows fed diets with monensin, soybean oil and monensin plus soybean oil (19.4 to 25.4%) when compared to the cows fed untreated control diet (30.1%). The same happened for K_{max} of monensin, in which the lowest was 6.5% to monensin plus soybean oil and the greatest was 29.5% to control. High monensin concentration ($K_d = 2.30 \mu\text{M}$) was required, but low lasalocid concentration ($K_d = 0.218 \mu\text{M}$) was necessary to cause half of maximum potassium depletion in ruminal bacteria population from cows fed diet with monensin. This result shows that there was no cross resistance between the evaluated ionophores. *In vitro* gas production showed the lowest volume when diets were incubated with propolis (12,9 mL/100 g of DM), but monensin and lasalocid also reduced it. This represent lower escape of energy for animals fed diets with bee propolis, monensin or lasalocid.

KEYWORDS: gas production, intracellular potassium, lasalocid, monensin, propolis, soybean oil

INTRODUÇÃO

A adição de óleo na dieta de vacas em lactação além de causar redução significativa na porcentagem de gordura do leite, tem mostrado efeito germicida e bacteriostático, principalmente sobre as bactérias Gram-positivas (HENDERSON, 1973). Estes efeitos têm reflexos diretos sobre a fermentação ruminal, causando redução na produção de metano e aumento na de propionato, melhorando, assim, o desempenho animal e reduzindo a poluição ambiental.

Os antibióticos ionóforos, tais como monensina e lasalocida, também inibem principalmente as bactérias Gram-positivas, uma vez que a resistência aos ionóforos está relacionada à presença de uma membrana externa, de natureza lipopolissacarídica, existente em bactérias Gram-negativas (RUSSELL & STROBEL, 1988). A monensina catalisa não apenas trocas de sódio e prótons em nível de membrana plasmática, como também permite trocas de prótons e potássio. A lasalocida também age como um mono ou bivalente antiporte metal-próton, mas possui maior afinidade por potássio (PRESSMAN, 1973 e 1976).

A concentração inibitória mínima (MIC) é freqüentemente utilizada para descrever a potência dos antibióticos, mas este termo não pode ser aplicado para antibióticos lipofílicos como a monensina e lasalocida. O líquido do meio de cultura livre de células tem pouco ionóforo e a dose efetiva do mesmo é altamente dependente da concentração celular (CHOW & RUSSELL, 1990). Trabalhos têm mostrado que a monensina e lasalocida têm habilidade de ligarem-se não especificamente às bactérias resistentes ao ionóforo, bem como às partículas de alimentos (CHOW et al., 1994), logo a concentração do ionóforo livre varia muito o que dificulta a utilização do MIC. Portanto, a perda de potássio celular dependente do ionóforo pode prover um índice sensível e fisiológico da resistência à monensina (LANA & RUSSELL, 1996).

Assim como os ionóforos, os suplementos lipídicos insaturados apresentam efeito tóxico sobre as bactérias Gram-positivas do rúmen (NAGARAJA et al., 1997), alterando a relação acetato:propionato, com produção de propionato às custas de acetato, redução da produção de metano e diminuição da amônia ruminal (JENKINS, 1993; BATEMAN et al., 1998).

A produção de gases (metano e gás carbônico) e sua eliminação para o meio, representa perda de energia do ecossistema ruminal proveniente do alimento digerido. Além disso, estes gases eliminados, por eructação, são responsáveis em parte pelo efeito estufa e destruição da camada de ozônio da atmosfera (CHYNOWETH, 1996).

Portanto, a utilização de substâncias que reduzam esta perda de energia na forma de gases é de grande utilidade na alimentação de ruminantes, assim como pesquisar novas substâncias como a própolis. De acordo com STRADIOTTI et al. (2002) evidenciaram em estudo *in vitro* com populações de bactérias do rúmen, que extrato etanólico de própolis (0,3 g/ml de etanol a 70%, seguida de diluição 2:1 em etanol a 70% em água) foi eficiente em reduzir a produção de gases total e produção final de gases para carboidratos fibrosos e não fibrosos, inclusive suplantando a monensina.

Este trabalho teve como objetivo utilizar técnica *in vitro*, medindo a perda de potássio intracelular por ação de níveis crescentes dos ionóforos monensina e lasalocida em populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas com ou sem monensina e com ou sem óleo de soja. Ainda, objetivou-se avaliar a produção de gases *in vitro* das rações com ou sem óleo de soja incubadas com monensina, lasalocida ou própolis.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo 1

Quatro vacas mestiças (Holandês x Zebu) lactantes, fistuladas no rúmen e estabelecidas nas dependências do campo experimental Coronel Pacheco da EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, foram mantidas num esquema de quadrado latino durante 88 dias. Estes animais receberam dietas numa relação concentrado:volumoso de 46,5:53,5 com 16,6% de proteína bruta, 34,6% de fibra detergente neutro, 21,7% de fibra detergente ácido e 2,8% de extrato etéreo para as dietas sem óleo e de 52,7:47,3 com 17,2% de proteína bruta, 34% de fibra detergente neutro, 21,3% de fibra detergente ácido e 6,1% de extrato etéreo para as com óleo. Os tratamentos foram controle (dieta básica sem óleo e sem monensina), monensina (dieta básica mais 33 ppm de monensina), óleo (dieta básica mais 4% de óleo de soja) e monensina mais óleo (dieta básica mais 33 ppm de monensina e 4% de óleo de soja). Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (7:00 e 15:00), sendo a coleta de líquido ruminal realizada duas horas após a alimentação da manhã.

As vacas foram mantidas em cada dieta durante 22 dias e as coletas realizadas no 19º dia de tratamento. Foram coletados 1.000 mL de líquido ruminal de cada vaca, filtrados em quatro camadas de gaze e transportados em garrafas térmicas pré-aquecidas (39°C) sob anaerobiose para o laboratório da sede EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora - MG. Os líquidos foram centrifugados a 500 x g por 15 minutos e os sobrenadantes foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos para obtenção do sedimento celular (bactérias do rúmen), sendo então suspenso em metade do volume inicial com meio artificial e usado para incubação com diferentes concentrações de lasalocida e monensina.

O meio artificial utilizado continha 292 mg de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4000 mg de Na_2CO_3 e 600 mg de cisteína (LANA & RUSSELL, 1996), sendo autoclavado por 15 minutos.

Adicionaram-se 1,4 mL do meio em tubos de ensaio (10 mL de volume), para o teste de resistência bacteriana a perda de potássio, acrescentado-se 0,1 mL de solução de etanol (99%) com níveis crescentes de lasalocida e monensina (0; 0,16; 0,31; 1,25 e 5 μM como concentração final), seguindo-se de vedação com tampa de borracha e incubação de 10 minutos a 39°C em anaerobiose. Foi coletado 1 mL de amostra em tubos de 1,5 mL e centrifugados a 10.000 $\times g$ por 5 minutos, através de uma camada de 0,3 mL de óleo (mistura 75:25 de óleo de silicone Sigma e aditivo Bardhal®). De acordo com LANA & RUSSELL, 1996, os tubos foram congelados a -20°C e os sedimentos celulares removidos pelo corte da parte inferior dos mesmos, sendo as células digeridas em ácido nítrico a 3N (HNO_3) em mesmo volume final do meio. O resíduo não digerido foi removido por centrifugação 10.000 $\times g$ por 5 minutos e o potássio foi determinado em espectrofotômetro de chama. A perda de potássio intracelular foi estimada em relação às amostras incubadas sem ionóforo.

O experimento foi realizado em quadrado latino balanceado com quatro períodos de 22 dias e duas repetições nas análises de laboratório. Fez-se análise de regressão da recíproca da perda de potássio intracelular em função da recíproca da concentração de monensina para se determinar a perda máxima de potássio (K_{max}) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio (K_d), segundo LANA & RUSSELL (1996). A análise de variância incluindo efeitos principais, interação e comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$),

foram feitas conforme SAMPAIO (1998), por meio do programa ANOVA do Statistical Analysis Systems (SAS, 1999).

Estudo 2

Duas vacas mestiças (Holandês x Zebu) lactantes, fistuladas no rúmen e estabuladas na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, foram utilizadas apenas como doadoras de líquido para medir a produção de gases *in vitro*. Estes animais recebiam dietas numa relação concentrado:volumoso de 45:55 com 16% de proteína bruta, 34% de fibra detergente neutro, 21% de fibra detergente ácido e 2,8% de extrato etéreo. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (7:00 e 15:00), sendo a coleta de líquido ruminal realizada duas horas após a alimentação da manhã.

Eram coletados três litros de líquido ruminal, filtrado em quatro camadas de gaze e acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecidas (39°C) sob anaerobiose para serem transportados ao laboratório. No entanto, este era deixado em repouso por 30 minutos e utilizado como inóculo para produção de gases *in vitro* nas amostras das dietas utilizadas no primeiro estudo, sendo dieta controle (sem óleo de soja e sem monensina) e dieta com óleo (dieta básica mais 4% de óleo de soja). Estas foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 - 60°C por 72h e moídas a 1 mm para posterior incubação.

Foi utilizado o meio artificial tamponante de McDougal, contendo 9,8 g de NaHCO₃, 0,57 g de KCl, 0,47 g de NaCl, 0,05 g de CaCl₂.2H₂O, 7 g de NaHPO₄.7H₂O e 0,12 g de MgSO₄.7H₂O, com pH corrigido para 6,8 utilizando CO₂ (SILVA & QUEIROZ,2002).

Aproximadamente 100 mg de cada ração foram colocadas em frasco de vidro (50 mL), em duplicata, adicionados de 7,8 mL de tampão McDougal, 0,2 mL de antibiótico (monensina ou lasalocida a 5 µM de concentração final em solução de álcool etílico 99% ou própolis a 4 mg/mL de álcool etílico 99%) ou álcool etílico puro (99%) para as amostras controle e 2 mL de inóculo sob saturação de CO₂, para promover anaerobiose no frasco; em seguida o frasco foi vedado com tampa de borracha e lacrado com capas de alumínio. Posteriormente, foram mantidos em sala climatizada a 39°C sobre mesa de agitação orbital automática a 44 rpm durante 144 horas, para obtenção da produção total de gases (PELL & SCHOFIELD, 1993; THEODOROU et al.,1994).

As leituras da pressão e volume de gases foram realizadas por meio de voltímetro, nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 horas após o início da incubação. No momento inicial da incubação todos os frascos foram padronizados para a pressão atmosférica através de punção com agulha. A conversão dos valores observados por intermédio do voltímetro (mvolt), em volume de gases (mL), foi realizada considerando-se que 1 mvolt corresponde a 8,68 mL de gases (PELL & SCHOFIELD, 1993), ajustado para as condições normais de temperatura e pressão dos gases.

Com o somatório do volume de gases para cada tempo de leitura, foram construídas as curvas de produção cumulativa dos gases oriundos da matéria seca das dietas incubadas com ou sem antibiótico (monensina, lasalocida ou própolis).

Os valores do volume acumulado de gases foram submetidos à análise estatística, à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (P<0,05), conforme SAMPAIO (1998), por meio do programa ANOVA do Statistical Analysis Systems (SAS, 1999). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x4, sendo duas dietas (dieta básica e dieta básica + óleo de

soja) e quatro tratamentos (controle, monensina, lasalocida e própolis) , com duas repetições, conforme modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ij}$$

sendo: y_{ij} volume de gases total referente a dieta i e o tratamento j; μ média geral; a_i efeito da dieta i, sendo $i = 1$ e 2 ; b_j efeito do tratamento j, sendo $j = 1, 2, 3, 4$; ab_{ij} efeito da interação da dieta i com o tratamento j; e_{ij} erro aleatório associado a cada observação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias mistas ruminais provenientes do líquido ruminal das vacas alimentadas com diferentes dietas, contendo ou não monensina e/ou óleo de soja, incubadas em meio artificial a 39°C por 10 minutos, mostraram que a perda de potássio foi dependente da concentração de monensina ou lasalocida (Figura 1).

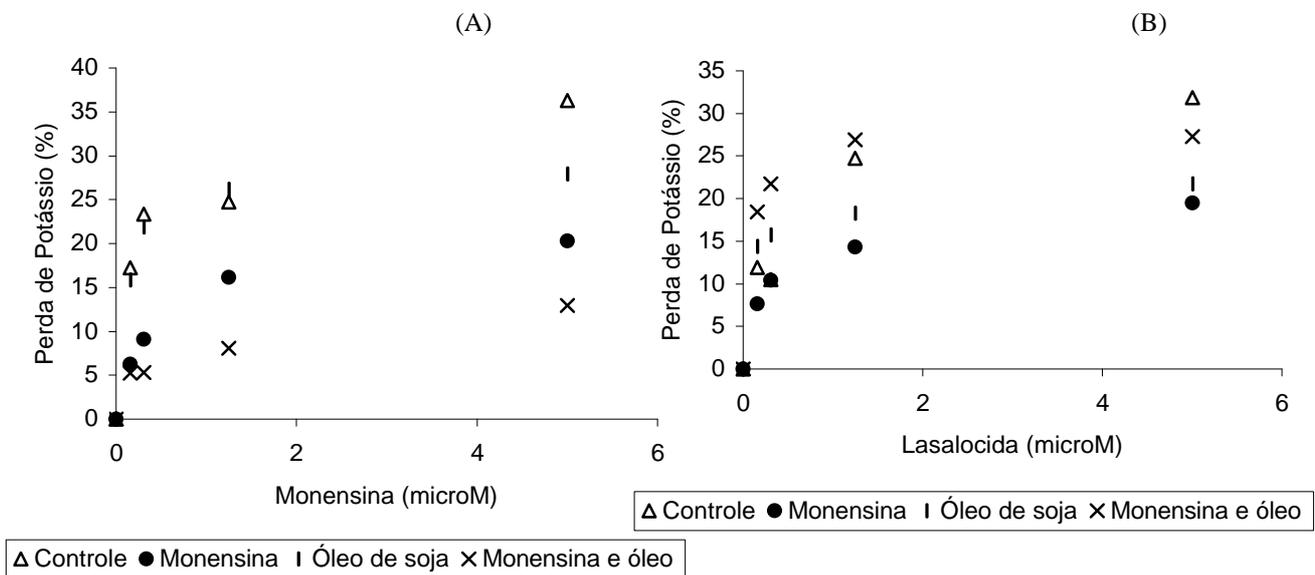


Figura 1 – Perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas com ou sem monensina e com ou sem óleo de soja, incubadas em meio artificial contendo níveis crescentes de monensina (A) ou lasalocida (B) por 10 minutos a 39°C. Cada ponto é a média de oito observações.

A perda máxima de potássio (K_{max}) pode ser obtida pela recíproca do inverso do intercepto da ordenada ($1/a$) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima (K_d) pela divisão da inclinação da reta pelo intercepto da ordenada (b/a). Embora a técnica tenha apresentado alto coeficiente de variação das variáveis analisadas, as populações de bactérias ($K_{max} = 19,9\%$) obtidas do líquido de rúmen das vacas alimentadas com dietas adicionadas de monensina e óleo de soja são mais resistentes a lasalocida *in vitro* quando comparadas com aquelas ($K_{max} = 30,1\%$) de vacas submetidas a dieta controle. O mesmo ocorreu para monensina, onde o menor K_{max} foi de 6,5% e o maior de 29,5% (Tabela 1). Isto confirma que há maior resistência à perda do potássio intracelular pela ação de monensina ou lasalocida *in vitro* em populações de bactérias do rúmen provenientes de animais submetidos a dietas com lipídios e/ou monensina, também evidenciado por LANA & RUSSELL (1996).

Tabela 1 – Constantes de resistência (K_d e K_{max}) de populações de bactérias do rúmen de vacas lactantes submetidas a dietas com ou sem monensina ou óleo de soja, incubadas com níveis crescentes de lasalocida ou monensina por 10 minutos a 39°C

Dietas ^c	Lasalocida		Monensina	
	K_d (μM) ^d	K_{max} (%) ^e	K_d (μM) ^d	K_{max} (%) ^e
Controle	0,225 ^a	30,1 ^a	0,177 ^b	29,5 ^a
Monensina	0,218 ^a	19,4 ^b	2,300 ^a	28,7 ^a
Óleo de soja	0,183 ^a	25,4 ^{ab}	0,095 ^b	35,6 ^a
Monensina e óleo de soja	0,131 ^a	19,9 ^b	0,161 ^b	6,5 ^b
CV (%)	36,3	26,1	33,2	38,3

^{a, b} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

^c Controle (sem ionóforo e sem óleo de soja), Monensina (33 ppm de monensina), Óleo de soja (4% de óleo de soja) e Monensina + óleo de soja (33 ppm de monensina e 4% de óleo de soja).

^d Quantidade de ionóforo necessária para causar a metade da perda máxima de potássio das bactérias ruminais após 10 minutos de incubação.

^e Perda máxima de potássio das bactérias ruminais após 10 minutos de incubação.

Quando as vacas foram submetidas a dietas com de 33 ppm de monensina por dia, a quantidade de monensina ($K_d = 2,3 \mu\text{M}$) *in vitro* para causar metade da perda máxima de potássio intracelular foi 13 vezes maior ($P < 0,05$) que aquela ($0,177 \mu\text{M}$) de vacas submetidas a dietas sem monensina e sem óleo de soja, porém sem alterar a perda

máxima de potássio (K_{max}). Isto significa que as populações de bactérias do rúmen tornaram-se mais resistentes a monensina *in vitro* devido seu uso na dieta das vacas. Já a quantidade de lasalocida para causar a metade da perda máxima de potássio intracelular não foi diferente entre os tratamentos. Entretanto, pode-se inferir que há necessidade de baixa concentração de lasalocida (0,218 μM) para causar a metade da perda máxima em bactérias provenientes de vacas submetidas a dietas com de 33 ppm de monensina por dia, enquanto necessita-se de alta concentração de monensina (2,3 μM ; Tabela 1).

A monensina aumentou a resistência das populações de bactérias do rúmen e não houve resistência cruzada entre os dois ionóforos testados *in vitro*, ou seja, bactérias de vacas submetidas a dietas com monensina são ainda sensíveis à lasalocida. Isto pode ser devido a diferenças no modo de ação (metal/próton antiporte), pois a lasalocida se liga a íons metálicos e prótons, com alta afinidade por K^+ , enquanto a monensina tem maior afinidade por Na^+ (PRESMAN, 1973 e 1976).

Quanto à produção cumulativa de gases *in vitro*, houve interação entre adição de óleo de soja nas dietas das vacas e antibióticos *in vitro* ($P < 0,03$). Observa-se que as amostras tratadas com própolis foram as que produziram menor volume de gases (12,9 mL/100 g de MS), tanto nas dietas sem óleo de soja quanto nas com óleo de soja, seguidas pelas produções de gases das amostras com monensina e lasalocida (Tabela 2).

A própolis foi eficiente em inibir a produção de gases *in vitro* pelas populações de bactérias do rúmen (Tabela 2), assim como mostram resultados de produção de gases para dietas (volumoso + concentrado) incubadas com monensina ou própolis por STRADIOTTI et al. (2002). De acordo com SCHOFIELD et al. (1994), a redução no volume final de gases é provavelmente devido a conservação de carbono no meio. Esta conservação de carbono no rúmen é decorrente da concentração molar de propionato

(três carbonos) no rúmen, em detrimento de uma redução da concentração de acetato (dois carbonos).

As amostras incubadas com própolis reduziram em 41,36% (9,1 mL/100 mg de MS) e 35,17% (7 mL/100 mg de MS) a produção de gases para as dietas sem e com óleo de soja, respectivamente. Isto resulta numa menor eliminação de metano e conseqüentemente, conservação de carbono no meio com redução na perda de energia. Ao considerar que, do total de gases produzido 53% é metano (EZEQUIEL & GASTALDI, 2002), tem-se que a própolis é responsável por diminuir de 18,6 a 21,9% (3,7 a 4,8 mL/100 mg de MS) o metano que seria eliminado para o meio. Em experimento *in vitro* CZERKAWISK e BREKCKERINGE (1973) verificaram uma redução foi de 20 a 30% da produção de metano com propileno glicol. Se cada 01 mL de metano corresponder a 8,25 calorias, há uma economia de até 39,6 cal/mg de MS devido a utilização da própolis nas incubações.

Quando se compara os tratamentos de antibiótico entre as dietas com e sem óleo, observa-se que houve diferença nos tratamentos sem antibiótico e lasalocida, ou seja, houve efeito do óleo de soja na redução de volume de gases no tratamento controle (22,0 vs 19,9 mL/100 mg de MS) e lasalocida (16,4 vs 15,9 mL/100 mg de MS). O óleo de soja foi responsável por reduzir a produção de gases em 9,54% (2,1 mL/ 100 mg de MS), o que equivale a 5% de metano a menos, levando a economia de energia.

Tabela 2 – Médias de volume acumulado de gases (mL/100 mg de MS) das dietas incubadas com ou sem lasalocida, monensina ou própolis a 39°C durante 120 horas

Tratamento ¹	Dieta ²		Média
	Básica ^e	Óleo ^e	
Controle	22,0 ^{Aa}	19,9 ^{Ba}	21,0 ^a
Lasalocida	16,4 ^{Ab}	15,9 ^{Bb}	16,2 ^b
Monensina	14,6 ^{Ac}	14,4 ^{Ac}	14,5 ^c
Própolis	12,9 ^{Ad}	12,9 ^{Ac}	12,9 ^d
CV	2,1	3,2	2,7

² Básica (dieta sem ionóforo e sem óleo de soja) e Óleo (dieta com 4% de óleo de soja).

¹ Controle (sem antibiótico), Lasalocida (5 µM), Monensina (5 µM) e Própolis (40,02 mg/mL).

^{A,B,a,b,c,d} Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na mesma linha e minúsculas na mesma coluna, são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

As curvas de produção cumulativa de gases mostram maior produção nas amostras incubadas sem antibiótico e ação efetiva destes em controlar o crescimento das populações de bactérias do rúmen, tanto na dieta sem quanto na com óleo de soja.

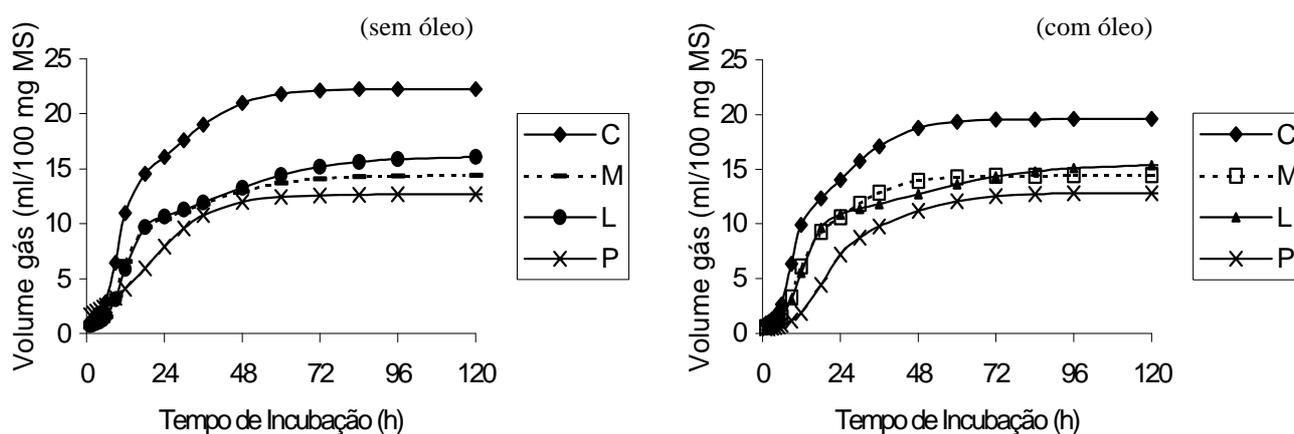


Figura 2 – Produção cumulativa de gases das dietas (A – controle; B – 4% de óleo)

incubadas na ausência (C - controle) e na presença de monensina (M), lasalocida (L) ou própolis (P) a 39°C durante 120 horas.

CONCLUSÕES

As populações de bactérias do rúmen de animais submetidos a dietas contendo lipídios ou monensina, são mais resistentes à perda do potássio intracelular pela ação da

lasalocida *in vitro*. Portanto, deve-se estar atento ao fornecer ionóforo na dieta de animais que já tenham recebido lipídios ou ionóforos na dieta, pois as bactérias são mais resistentes aos mesmos.

A quantidade de monensina é maior do que a de lasalocida para causar metade da perda máxima de potássio em populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a alimentação com monensina, mostrando que bactérias de animais recebendo monensina são ainda sensíveis à lasalocida.

Os antibióticos foram efetivos em reduzir a produção cumulativa de gases, com maior ação da própolis. A própolis leva a redução de metano, o que promove redução na perda de energia para o meio superior a monensina e lasalocida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATEMAN, H.G.; JENKINS, T.C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2451-2458, 1998.
- CHYNOWETH, D.P. Environmental impact of biometanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.3-18, 1996.
- CHOW, J.M.; RUSSELL, J.B. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1588-1593, 1990.
- CHOW, J.M.; VAN KESSEL, J.A.S.; RUSSELL, J.B. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1630-1635, 1994.
- CZERKAWISK, J.W.; BRECKKERINDGE, G. Dissimilation of 1,2-propanediol by rumen microorganisms. **British Journal of Nutrition**, v.29, p.317-330, 1973.
- EZEQUIEL, J.M.B.; GASTALDI, K.A. Proporções de metano, gás carbônico e oxigênio no rúmen de bovinos alimentados com dietas com diferentes relações volumoso:concentrado e fenos de duas qualidades nutricionais. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ... Recife – PE**, 2002, cd rom.
- HENDERSON, C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. **Journal of Agricultural Science**, v.81, p.107-112, 1973.
- JENKINS, T.C. 1993. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism - Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4499-4503, 1996.

- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. Blackie Academic & Professional, 2nd edition, Great Britain. 1997, p.524-632.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- PRESSMAN, B.C. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. **Fed. Proc.** v.32, p.1698-1703, 1973.
- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Reviews Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v.66, p.552-558, 1988.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Med. Vet. Zoot., 1998. 221p.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3^a ed. Editora UFV – Viçosa, 2002. 235p
- SAS, 1999. **User's Guide Release 6.13**. SAS Institute Inc. Cary. NC, USA.
- STRADIOTTI, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação de extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29/07 a 01/08 de 2002, Recife – PE. **Anais ... Recife – PE, 2002**, cd rom.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

O aumento da acidez torna a população microbiana do rúmen mais resistente à perda de potássio intracelular quando testado com monensina.

Os ionóforos e acidez possuem efeito sinérgico na redução da produção de amônia.

A lasalocida inibe o crescimento de populações de bactérias do rúmen em meio de cultura com baixo valor de pH.

As populações de bactérias do rúmen de animais submetidos a dietas ricas em volumoso são mais sensíveis aos ionóforos monensina e lasalocida. Portanto, o uso destes ionóforos seria mais eficiente se utilizados em animais submetidos a pastagem ou dietas ricas em volumoso.

A própolis não causou perda de potássio intracelular nas populações de bactérias do rúmen, demonstrando não agir como um ionóforo.

As populações de bactérias do rúmen de animais submetidos a dietas contendo lipídios ou monensina, são mais resistentes à perda do potássio intracelular pela ação da lasalocida *in vitro*. Portanto, deve-se estar atento ao fornecer ionóforo na dieta de animais que já tenham recebido lipídios ou ionóforos na dieta, pois as bactérias são mais resistentes aos mesmos.

A quantidade de monensina é maior do que a de lasalocida para causar metade da perda máxima de potássio em populações de bactérias do rúmen de vacas submetidas a alimentação com monensina, mostrando que bactérias de animais recebendo monensina são ainda sensíveis à lasalocida.

Os antibióticos foram efetivos em reduzir a produção cumulativa de gases, com maior ação da própolis. A própolis leva a redução de metano, o que promove menor perda de energia para o animal do que a monensina e lasalocida.

De acordo com os resultados *in vitro* da própolis, há necessidade de estudos *in vivo* para avaliar metabolismo energético e protéico do animal.

Os estudos realizados mostram a importância da dieta quando se utiliza aditivos como monensina e lasalocida, alertando as possíveis situações onde a reposta animal possa ser prejudicada. Ainda, salienta-se o potencial da própolis de abelha, na produção animal, podendo não só contribuir para melhor aproveitamento da energia dos alimentos mas também para uma alternativa a outros aditivos, que sejam possíveis causadores de danos a saúde do homem.