

SARA ADRIANA SALINAS LAURA

ISOMIX E VIRGINIAMICINA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

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

Orientador: Rogério de Paula Lana

**VICOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S165i Salinas Laura, Sara Adriana, 1997-
2021 Isomix e virginiamicina sobre a fermentação ruminal in
vitro / Sara Adriana Salinas Laura. – Viçosa, MG, 2021.
37 f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Rogério de Paula Lana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 29-35.

1. Rúmen - Fermentação. 2. Ácidos graxos voláteis.
3. Digestibilidade in vitro. 4. Pastagens. 5. Virginiamicina.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.085

SARA ADRIANA SALINAS LAURA

ISOMIX E VIRGINIAMICINA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

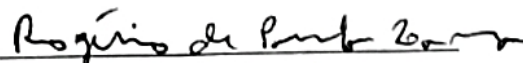
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de fevereiro de 2021

Assentimento:



Sara Adriana Salinas Laura
Autora



Rogério de Paula Lana
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela virtude da vida e por permitir mais essa conquista em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia pela contribuição para minha formação profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

À Empresa Nutricattle e Suprikem, pelo suporte financeiro concedido à pesquisa, e à FACEV, por administrar o projeto por meio do convênio 264.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

LAURA, Sara Adriana Salinas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Isomix e virginiamicina sobre a fermentação ruminal *in vitro***. Orientador: Rogério de Paula Lana.

O uso de aditivos permite melhorar a eficiência alimentar dos bovinos, pelas mudanças na população microbiana. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes doses e a interação de dois aditivos sobre a digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro, bem como sobre parâmetros de fermentação ruminal, utilizando líquido ruminal de vacas fistuladas. Foram realizadas incubações *in vitro* de uma dieta com a relação 70:30 (volumoso:concentrado), por 48 h, utilizando-se o método Tilley & Terry, sendo utilizado como volumoso *Brachiaria decumbens* e como concentrado fubá de milho, farelo de soja e ureia. Foram avaliadas a digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS), digestibilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) e parâmetros de fermentação ruminal, como pH do meio e concentrações de amônia (NH₃), proteína solúvel (PS), proteína microbiana (PM) e ácidos graxos voláteis (AGV). Foram utilizadas seis doses de cada aditivo, sendo eles: Isomix (produto comercial contendo ácidos graxos de cadeia ramificada) (0,0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8% na matéria seca da dieta) e virginiamicina (0,0; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40 e 0,80% de virginiamicina-10% na matéria seca da dieta). Foram encontrados efeitos significativos ($P < 0,05$) nas variáveis: pH, NH₃, PS, PM, AGV, DIVMS e DIVFDN, à medida que a concentração de virginiamicina aumentou. O pH, NH₃ e PS aumentaram, enquanto que as digestibilidades, PM e AGV diminuíram com o aumento do nível de virginiamicina ($P < 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) da adição do Isomix nestas variáveis, mas o Isomix aumentou ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato de forma linear. Houve efeito significativo da interação entre os aditivos ($P < 0,05$) sobre as variáveis acetato, propionato, butirato, isovalerato e relação acetato:propionato. Os resultados indicaram que estes aditivos, nas doses avaliadas não mostraram efeitos positivos na digestibilidade *in vitro*. Entretanto, efeito benéfico do Isomix foi observado no aumento de propionato e redução da relação acetato:propionato, que pode melhorar o balanço energético e o desempenho animal. Pela falta de estudos, em nossas condições (clima tropical, e sendo a principal produção sob pastagens) com a suplementação de AGV de cadeias ramificadas (AGVCR), recomenda-se o desenvolvimento de novas pesquisas, principalmente com dietas contendo baixos níveis de proteína e com fornecimento de ureia.

Palavras-chave: Ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada. Digestibilidade *in vitro*. Pastagens tropicais. Virginiamicina.

ABSTRACT

LAURA, Sara Adriana Salinas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. **Isomix and virginiamycin on ruminal fermentation *in vitro***. Adviser: Rogério de Paula Lana.

The use of additives improves the feed efficiency of cattle, due to changes in the microbial population. The objective of this study was to analyze the effects of different doses and the interaction of two additives on the digestibility of dry matter and neutral detergent fiber, as well as on ruminal fermentation parameters, using rumen liquid from fistulated cows. *In vitro* incubations of a diet with the ratio 70:30 (roughage:concentrate) were performed for 48 h, using the Tilley & Terry method, being used as roughage *Brachiaria decumbens* and like concentrate corn meal, solvent soy and urea. In vitro dry matter digestibility (IVDMD), in vitro digestibility of neutral detergent fiber (IVNDFD) and rumen fermentation parameters were evaluated, such as pH of the medium and concentrations of ammonia, soluble protein (SP), microbial protein (MP) and volatile fatty acids (VFA). Six doses of each additive were used, namely: Isomix (commercial product containing branched chain fatty acids) (0.0; 0.3; 0.6; 1.2; 2.4 and 4.8% in the dry matter of the diet) and virginiamycin (0.0; 0.05; 0.10; 0.20; 0.40 and 0.80% of virginiamycin-10% in the dry matter of the diet). Significant effects ($P < 0.05$) were found in the following variables: pH, NH_3 , SP, MP, VFA, IVDMD and IVNDFD as the concentration of virginiamycin increased. The pH, NH_3 and SP increased, while the digestibilities, MP and VFA decreased with an increase in the level of virginiamycin ($P < 0.05$). No significant difference ($P > 0.05$) was found for the addition of Isomix in these variables, but Isomix increased ($P < 0.05$) the concentration of isobutyrate in a linear manner. There was a significant effect of the interaction between the additives ($P < 0.05$) on the variables, acetate, propionate, butyrate, isovalerate and acetate:propionate ratio. The results indicated that these additives at the doses evaluated did not show positive effects on in vitro digestibility. However, a beneficial effect was observed in Isomix by increasing propionate and reducing acetate: propionate, which can improve energy balance and animal performance. Due to the lack of studies on our conditions (tropical climate, and being the main production under grazing) with the supplementation of branched chain VFA (BCVFA), it is recommended to develop further research, especially on diets containing low levels of protein and with supply of urea.

Keywords: Branched-chain volatile fatty acids. *In vitro* digestibility. Tropical pastures. Virginiamycin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Produção de animais em pasto	9
2.2. Uso de aditivos	10
2.3. Ácidos graxos de cadeias ramificadas	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
APÊNDICE	36

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem o maior rebanho bovino do mundo em sistemas de produção predominantemente sob pastagens e, em boa parte, por forrageiras tropicais. Altas proporções de carboidratos estruturais, encontrados em forragens, limitam a ingestão voluntária e a digestão de alimentos por ruminantes porque reduzem as taxas de fermentação (FENG, 2004). A busca de nova tecnologia para incrementar o desempenho animal tem sido considerada como uma alternativa para a redução de custos na nutrição de ruminantes (VAL NETO, 2018).

Os processos de fermentação ruminal têm importante função na nutrição dos ruminantes, uma vez que esta é uma característica simbiótica distinta entre o hospedeiro e a microflora ruminal, que permite ao animal ruminante várias vantagens nos processos digestivos e metabólicos em relação aos não ruminantes. Os produtos da fermentação ruminal, como os ácidos orgânicos voláteis e a proteína microbiana, são as principais fontes de energia e nutrientes para os ruminantes (GOMES, 2016). A possibilidade de controlar alguns dos processos metabólicos no rúmen, com o objetivo de alcançar mais a utilização eficiente de nutrientes, tem sido um conceito atraente para nutricionistas e microbiologistas do rúmen (DILORENZO, 2011). Os objetivos gerais da manipulação da fermentação ruminal podem ser resumidos da seguinte forma (NAGARAJA et al., 1997): melhorar os processos benéficos, e minimizar, alterar ou eliminar processos ineficientes ou processos prejudiciais ao hospedeiro.

Nesse contexto, busca-se a melhoria na eficiência de utilização das dietas pelos ruminantes, para que os alimentos sejam transformados de maneira mais eficiente e econômica em produtos que venham atender às demandas da população humana. Assim, manipular o processo de fermentação ruminal é uma maneira particular de alterar o metabolismo normal dos ruminantes, visando o aperfeiçoamento do desempenho dos animais. Desta forma, os aditivos alimentares são importantes, pois podem causar inúmeros benefícios ao sistema de produção, como ganho de peso, melhora na conversão alimentar, diminuição do risco de acidose e melhora na resposta imunológica, o que resulta em ganhos para o sistema de produção (MCGUFFEY et al., 2001; CALLAWAY et al., 2003; SANTOS et al., 2019).

A definição de aditivo para produtos destinados à alimentação animal, de acordo com a Normativa 15/2009 do MAPA, é qualquer substância adicionada intencionalmente ao alimento, que não é utilizada normalmente como ingrediente, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não altere seu valor nutritivo.

A virginiamicina (VM) é um antibiótico polipeptídico cíclico, produto da fermentação de várias espécies de *Streptomyces* sp., sendo a principal delas a *Streptomyces virginiae*,

constituído por dois componentes principais, a virginiamicina fator M1 e a virginiamicina fator S1, que são sinérgicos e têm atividade microbiana. Este antibiótico não ionóforo atua por meio de ligação com os ribossomos, inibindo a síntese e crescimento de células bacterianas gram-positivas e síntese de proteína no interior da célula bacteriana (ROGERS et al., 1995).

Os ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR, i.e., isobutírico, isovalérico, valérico e 2-metilbutírico) são considerados essenciais para o crescimento de microrganismos celulolíticos, que são necessários para degradar os componentes fibrosos das dietas (WILSON, 2008). As bactérias fibrolíticas podem ser as mais beneficiadas com a adição de AGVCR na dieta, enquanto outros micróbios podem se beneficiar com o aumento da degradação da fibra (por exemplo, maior exposição ao substrato ou uso de oligossacarídeos). AGVCR ruminal originam-se, principalmente, de proteína dietética ou reciclagem de proteína bacteriana por desaminação oxidativa ruminal e descarboxilação de valina, leucina e isoleucina (TEDESCHI et al., 2000).

Pesquisas anteriores têm mostrado resultados variáveis da suplementação dos AGVCR sobre a digestibilidade aparente da matéria seca e crescimento microbiano e melhora das funções microbianas e atividades enzimáticas no rúmen, mas existe pouca informação das suplementações destes em nossas condições. Assim, também ainda não é concreto o conhecimento dos efeitos da virginiamicina nas dietas com alto volumoso. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes níveis de virginamicina e Isomix (produto contendo ácidos graxos de cadeia ramificada) sobre os microrganismos ruminais, mediante a técnica *in vitro*, tendo sido avaliadas a digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro da dieta e, também, possíveis modificações sobre alguns parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção de animais em pasto

Aproximadamente 70% do gado no mundo encontra-se nas regiões de clima tropical e subtropical (COOKE et al., 2020) que dependem da conversão de fibras para produção de produtos para humanos (TEDESCHI et al., 2012). As gramíneas forrageiras tropicais apresentam, normalmente, baixos teores de proteína bruta (PB), os quais invariavelmente estão associados a elevados teores de fibra, lignificação de seus tecidos à medida que se tornam mais maduras (COSTA et al., 2015). A Associação Brasileira de Cexportadoras de Gado (ABIEC, 2019) estima que 88% do rebanho (gado de carne ou leite) estão sendo produzidos em 162,2

milhões de hectares de pastagens no Brasil. Quando este sistema de produção é bem feito, ele pode ter uma alta produção de proteína de alta qualidade (SILVA et al., 2016), mas, normalmente, esta produção de proteína e energia das pastagens não consegue atingir os níveis nutricionais adequados para os animais.

Para uma alta produção animal em pastagens, três condições básicas devem ser consideradas: 1) deve ser produzida uma grande quantidade de forragem de bom valor nutritivo (alto conteúdo proteico e digestível); 2) uma grande proporção dessa forragem deve ser colhida pelos próprios animais (consumo); e 3) a eficiência de conversão dos animais deve ser elevada. Assim, a produção animal em pasto é o resultado da eficiência de produção de forragem, consumo de forragem pelos animais e conversão da forragem em produto animal (PAULINO et al., 2004). A composição do forragem é influenciada pela estação de produção, sendo que na estação da chuva o conteúdo proteico maior e, na estação da seca, há um incremento da produção de FDN e diminuição da produção de matéria seca (SOUZA et al., 2015).

2.2. Uso de aditivos

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (MAPA, 2004), um aditivo na alimentação animal deve ter influência positiva na característica do produto, sendo que este deve ser utilizado na quantidade necessária a obtenção do efeito desejado, respeitada a concentração máxima que vier a ser fixada, para que possa responder com máxima eficiência, demonstrando todo o potencial genético do animal.

As categorias de aditivos ou promotores de crescimento possuem diversos mecanismos de ação, trazendo como principais benefícios, a melhora da qualidade dos alimentos, incremento da conversão alimentar e aumento das taxas produtivas para a pecuária de corte e leite (GOULART, 2010). Promove ainda outros benefícios, tais como: aumento da capacidade digestiva; aproveitamento dos alimentos ingeridos; melhora da retenção de energia fermentada no rúmen; melhora da saúde da flora ruminal e intestinal; e diminuição dos distúrbios metabólicos, como acidose e timpanismo (AZEVEDO, 2012). Apesar da imensa quantidade de aditivos existentes, possíveis de serem utilizados na alimentação animal, alguns ainda carecem de liberação como anabolizantes e hormônios. São de uso permitido no Brasil: ionóforos, antibióticos não ionóforos, tampões, enzimas fibrolíticas, leveduras, lipídios, própolis e outros (SOARES, 2019).

Os aditivos para rações podem ser divididos em cinco grupos: a) Aditivos tecnológicos, que influenciam os aspectos tecnológicos da ração para melhorar suas características de manipulação ou higiene; b) Aditivos sensoriais que melhoram a palatabilidade de uma dieta ao

estimular o apetite, geralmente pelo efeito que esses produtos têm sobre o sabor ou a cor da dieta; c) Aditivos nutricionais que são nutrientes específicos requeridos pelo animal para um crescimento ideal; d) Aditivos zootécnicos, que melhoram o estado nutricional do animal, não por fornecer nutrientes específicos, mas por permitir uma utilização mais eficiente dos nutrientes presentes na dieta; e e) Coccidiostáticos e histomonostáticos, usados para controlar a saúde intestinal das aves por meio de efeitos diretos no organismo parasita em questão (SALEM, 2013).

O uso de aditivos antimicrobianos ainda é uma questão que gera polêmica e vem agregada de inúmeros preconceitos, por se tratar do uso de substâncias ainda pouco estudadas, todavia com benefícios comprovados. Sendo assim, países da Europa proibiram em 2006 o uso dos antibióticos pela possibilidade de deixar resíduos nos produtos de origem animal, podendo ocasionar resistência cruzada (Directiva 1831/2003/CEE).

Dos antibióticos não ionóforos, os mais trabalhados em campo são a virginiamicina e flavomicina. O efeito é semelhante ao dos ionóforos, mas o mecanismo de ação é diferente, realizando seleção da população bacteriana ruminal. Representam um grupo diferente de substâncias químicas, com amplo espectro antibacteriano, peso molecular e habilidade de ser absorvido pelo intestino (SANTOS et al., 2015). O uso de antibióticos não ionóforos, como promotores de crescimento para bovinos, é pouco explorado no Brasil. No entanto, a virginiamicina tem apresentado efeitos positivos sobre o ganho de peso e a eficiência alimentar tanto para monogástricos como para ruminantes (ROGERS et al., 1995; NUNEZ, 2008; STEWART et al., 2010).

A virginiamicina, antibiótico não ionóforo, é utilizada como promotor de crescimento há mais de 30 anos, onde começou a ser manipulada como aditivo após a percepção de que tratamentos com antibióticos semelhantes à virginiamicina causavam ganho de peso e eficiência alimentar em aves (NAGARAJA & TAYLOR, 1987). A virginiamicina é composta de dois peptolídeos chamados fator M ($C_{28}H_{35}N_3O_7$) e fator S ($C_{43}H_{49}N_7O_{10}$), que possuem efeito sinérgico ao serem combinados à razão de 4:1, respectivamente de M:S para atuar contra as bactérias, (PAGE, 2003).

Bactérias gram-positivas tem estrutura formado, apenas por uma parede celular. Já as gram-negativas, possuem uma parede celular e uma membrana externa. Por este motivo as gram-positivas são mais inibidas que as negativas (RUSSELL & STROBEL, 1989). Uma vez no ambiente ruminal, a virginiamicina penetra a parede celular das bactérias gram-positivas e se liga a uma subunidade ribossomal 50S, fazendo com que ocorra a inibição da síntese proteica bacteriana. Ao se ligar à subunidade 50S ela inibe a ligação entre os peptídeos, impossibilitando

a formação da cadeia peptídica e, assim, não permitindo a transcrição da fita de RNA (COCITO et al., 1979).

A virginiamicina é promissora para uso como promotora de crescimento para animais em pastejo e confinados. A eficiência é comprovada devido à maior digestibilidade da fibra, estimulando a produção de propiônico, inibindo a produção de metano e controlando a concentração de lactato e o pH ruminal (AZEVEDO, 2012). A virginiamicina tem potencial de reduzir a desaminação de aminoácidos no rúmen, e evitar grandes perdas de nitrogênio e, assim, aumentar a absorção de aminoácidos livres no intestino delgado para uso do animal, e influenciar o teor de proteína do leite (MENDES, 2018).

Há pouca literatura referindo-se ao desempenho de bovinos em pastagens consumindo virginiamicina. Alguns resultados mostram incremento de ganho de peso na doses de 3,8 mg de virginiamicina/100 kg de PV, sendo oferecido *Panicum maximum* no período chuvoso (FERREIRA et al., 2011). Em trabalho com dietas de alto concentrado usando a combinação da virginiamicina com o ionóforo salinomicina para bovinos da raça Nelore encontraram redução do consumo de matéria seca em comparação aos animais que não receberam virginiamicina além de proporcionar maior eficiência de utilização da energia metabolizável. Os autores atribuem essa melhoria a possível alteração do padrão de fermentação ruminal promovida pela virginiamicina (NUÑEZ et al., 2013). Hedde et al. (1983) e Nagaraja et al. (1987) por meio dos seus resultados em experimentos *in vitro* encontraram aumento de ácido propiônico no tratamento com virginiamicina, o qual justifica a redução no consumo em consequência da limitação energética, onde os animais alcançaram o seu potencial de ganho de peso.

2.3 Ácidos graxos de cadeias ramificadas

Os ácidos graxos de cadeias ramificadas (AGCR) são misturas de isobutirato, isovalerato, valerato e 2-metilbutirato, e são necessários para crescimento dos microrganismos ruminais (CUMMINS & PAPAS, 1985). Embora os estudos com AGCR *in vivo* sejam limitados, sua principal fonte no fluido ruminal provém dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) valina, leucina e isoleucina, respetivamente, ou seja, o fornecimento de AACR estimula a produção de AGCR no rúmen e consequentemente a produção de leite.

Entre as espécies microbianas que requerem amônia e AGCR estão algumas das bactérias importantes que digerem a celulose (DIJKSTRA, 1993). Além disso, AGCR são importantes para a eficiência de crescimento do ecossistema microbiano. Por exemplo as cepas de *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens* precisam de AGCR, enquanto *Fibrobacter*

succinogenes precisa de qualquer AGCR de cadeia linear de 5 a 8 carbonos, como o valerato (BALDWIN & ALLISON, 1983).

O uso destes nas dietas de gado de leite pode ser promissor, devido aos animais precisarem de alta concentração de fibra na dieta para manter uma boa saúde ruminal, sendo que melhora da degradabilidade da fibra pode ser alcançada pelo incremento da eficiência do crescimento das bactérias fibrolíticas. As bactérias fibrolíticas são as mais beneficiadas com a adição de AGCR na dieta, enquanto outros microrganismos podem se beneficiar com o aumento da degradação da fibra (por exemplo, maior exposição ao substrato ou uso de oligossacarídeos). Estudos têm mostrado efeitos positivos com esta suplementação, tendo como resultados incremento da produção de leite, conteúdo de gordura e proteína no leite (PAPAS et al., 1984; LIU et al., 2018; WANG et al., 2019).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal e no Laboratório de Microbiologia do Rúmen do Departamento de Zootecnia, e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-Minas Gerais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da UFV (CEUAP-UFV; protocolo 032/2020).

Foram utilizadas duas fêmeas da raça Holandesa, com 550 kg de peso vivo médio, fistuladas no rúmen, sendo as vacas submetidas às mesmas condições, adaptadas à mesma dieta por 15 dias antes das coletas de líquido de rúmen e com oferecimento de água *ad libitum*. A dieta foi de silagem de milho como volumoso, e concentrado contendo fubá de milho e farelo de soja, sendo fornecida duas vezes ao dia, após as ordenhas da manhã e da tarde. As vacas foram mantidas em baias individuais com piso de cimento, dispostas com bebedouro e comedouro para volumoso e concentrado.

No experimento, foram avaliados os efeitos da inclusão de diferentes níveis de virginiamicina e de um produto comercial (Isomix) sobre a fermentação ruminal *in vitro*, numa dieta à base de pasto de *Brachiaria decumbens*, e relação volumoso:concentrado de 70:30. Os parâmetros de fermentação avaliados foram pH, ácidos graxos voláteis (AGV) totais e ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, isovalérico e valérico, em mM e em percentual; relação acético:propiônico; nitrogênio amoniacal (em mM ou mmol/L e mg de N-NH₃/100 mL); proteína solúvel e proteína microbiana (mg/L). A forragem foi colhida no final da estação chuvosa, por simulação manual de pastejo, em piquete da fazenda Boa Vista, distrito de

Cachoeira de Santa Cruz, Viçosa-MG, pertencente ao Departamento de Zootecnia da UFV. A ração consistiu de capim braquiária, fubá de milho, farelo de soja e ureia (Tabela 1).

Tabela 1. Ração avaliada

Ingrediente	%
Capim <i>Brachiaria decumbens</i> (ASA – amostra seca ao ar)	70,0
Fubá de milho	19,3
Farelo de soja	9,7
Ureia	1,0
Total	100

Foram preparados 75 g de ração e, em seguida, homogeneizada e processada em moinho tipo Willey, com peneira de porosidade de 1 mm para também poder realizar análises bromatológicas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise bromatológica da ração

Composição	%
Proteína	16,7
Fibra em detergente neutro (FDN)	66,7
Fibra em detergente ácido (FDA)	32,4
Lignina	5,21
Extrato etéreo	2,29
Cinzas	6,03

Os tratamentos foram manejados num fatorial 6x6, sendo seis níveis de Isomix (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 mg de Isomix ou nas concentrações de 0,0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8%) e seis níveis de virginiamicina (0,0; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg de virginiamicina 10% ou nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8%) em 500 mg de matéria seca de ração (ou 550 mg de amostra seca ao ar), mais dois controles adicionais e com três repetições.

No preparo dos seis tratamentos contendo Isomix, primeiramente foi pesado 0,873 g de Isomix para 9,13 g de ração, sendo que esta mistura teve 24 mg de Isomix para cada 275 mg de amostra seca ao ar da mesma (24 mg). Em seguida, foram feitas diluições a seco, tirando 5 g deste frasco e adicionando 5 g da ração (12 mg) e, assim, sucessivamente, foram obtidas as misturas com as concentrações de 6,0; 3,0 e 1,5 mg de Isomix. O frasco controle (0 mg) correspondeu à ração pura.

No preparo dos seis tratamentos contendo virginiamicina, primeiramente foi pesado 0,145 g de virginiamicina (10%) para 9,86 g da ração (amostra seca ao ar), sendo que esta mistura teve 4 mg de virginiamicina para cada 275 mg de amostra seca ao ar da mesma (4 mg). Em seguida, foram feitas diluições a seco, tirando 5 g deste frasco e adicionando 5 g da ração (2 mg) e, assim, sucessivamente, foram obtidas as misturas com as concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25 mg de virginiamicina. O frasco controle (0 mg) correspondeu à ração pura.

Para a fermentação *in vitro*, foi usada 0,275 g de amostra contendo ou não Isomix para 0,275 g de amostra contendo ou não virginiamicina (penúltimo parágrafo), em função das diferentes combinações de tratamentos (6 x 6), totalizando 0,550 g de amostra seca ao ar. Foram, adicionados 10 mL de líquido de rúmen e 40 mL de tampão de McDougall (1949) em frasco de penicilina de 100 mL (relação 1:4 inóculo e solução tampão), segundo Ede (2016), realizando o processo de fermentação a 39 °C, em ambiente anaeróbico, por período de 48 horas. O método considerado padrão para estudos de digestibilidade *in vitro* é o proposto por Tilley e Terry (1963), o qual foi utilizado no experimento.

No dia anterior à incubação de cada bateria, foi preparada a solução tampão de McDougall (1949), em uma sala climatizada a 39 °C para a estabilização da temperatura. Antes de iniciar cada repetição, foi retirada a digesta ruminal (líquido e sólidos) de diferentes pontos da interface líquido-sólido do ambiente ruminal, sendo acondicionada em recipientes térmicos adequados para a manutenção da temperatura de 39 °C (garrafas térmicas pré-aquecidas). Posteriormente, a digesta foi acondicionada no liquidificador, na sala climatizada a 39 °C, sendo homogeneizada por 30 segundos. O material homogeneizado foi filtrado em três camadas de gaze em frascos Erlenmeyer de 2 L (Castro, 2018).

O espaço livre dos frascos foi imediatamente saturado com CO₂, sendo fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos foram mantidos sob agitação numa mesa agitadora orbital (40 rpm) em sala climatizada (39 °C). Procedeu-se a retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas, com auxílio de agulhas. Após 48 horas de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidos à mensuração do pH com potenciômetro digital, sendo o conteúdo transferido para cadinhos filtrantes (porosidade grossa), com auxílio de água destilada (temperatura superior a 90 °C). Em seguida, os cadinhos foram secos (105 °C/24 horas) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da matéria seca.

Para a avaliação da digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), os cadinhos contendo o resíduo de incubação foram introduzidos no interior de coletores universais autoclaváveis (120 mL), adicionando-se 80 mL de solução de detergente neutro,

produzida segundo Mertens (2002) com a omissão de sulfito de sódio, e 250 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X). Os coletores com os cadinhos acondicionados no interior foram fechados com as respectivas tampas e autoclavados (105 °C/1 h) segundo método descrito por Detmann et al. (2012; INCT-CA F-002/1). Após retirados da autoclave, os cadinhos foram novamente lavados com água destilada quente e, ao fim, com 30 mL de acetona, sendo secos (105 °C/24 h) e pesados para obtenção do resíduo de FDN.

Depois da medição do pH, uma vez aberto os frascos, foi coletado líquido dos frascos em tubos eppendorfs em triplicata por amostra. Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras do líquido ruminal (1,5 mL) foram coletadas e centrifugadas (10000 x g, 10 min) para remoção das células, e o sobrenadante livre de células foi processado conforme descrito por Siegfried et al. (1984). As amostras foram separadas em coluna Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm, mantida a 45 °C, utilizando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101, mantido a 45 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5,0 mM, com fluxo de 0,7 mL/min. A curva de calibração foi feita utilizando os seguintes ácidos orgânicos como padrões externos: ácido propiônico (60 mM), ácido acético (60 mM), ácido butírico (20 mM), ácido valérico (20 mM), ácido isovalérico (5 mM) e ácido isobutírico (10 mM). Os padrões externos foram analisados nas concentrações descritas acima e nas diluições 1:2, 1:4, 1:16 e 1:32. Ácido crotônico (12,5 mM) foi utilizado como padrão interno nas amostras e curva de calibração. A concentração de ácidos orgânicos foi normalizada pelo fator de resposta e expressa como fração do total de ácidos grasos voláteis (AGV) produzidos (mol/100 mol).

A concentração de amônia nas amostras de líquido ruminal foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney & Marbach (1962). A absorbância foi medida a 630 nm, em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) e cloreto de amônio (NH₄Cl) foi utilizado como padrão.

A concentração de proteína solúvel foi determinada no sobrenadante livre de células, após centrifugação das amostras (Eppendorf 5417C, Hamburg, Germany) por 10 min (10.600 x g). A quantificação de proteína foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

A concentração de proteína microbiana foi determinada após a centrifugação de 1 mL de amostra por 10 min (10.600 x g), em centrifuga de microtubos (Eppendorf 5417C, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* digerido com NaOH (0,2 N) por 5 min a

100 °C. A concentração de proteína microbiana foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

Nas análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico do SAS – Statistical Analysis System (2001), adotando-se 0,05 como nível de probabilidade para o erro tipo I. A análise foi feita utilizando o PROC GLM ANOVA. Os tratamentos foram em esquema fatorial 6x6, compostos pelas combinações das concentrações de Isomix e virginiamicina, mais dois controles adicionais, e três repetições, tendo sido avaliados os efeitos dos tratamentos e suas interações. A diferença entre médias de tratamentos foi analisada utilizando LS-Means Tuckey, adotando-se o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito de virginiamicina sobre o pH, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (Tabela 3). Não houve efeito do Isomix e suas interações com virginiamicina sobre estas variáveis ($P>0,05$).

Tabela 3. Valores P de algumas variáveis analisadas

Fonte de variação	pH	DIVMS (%)	DIVFDN (%)
%V	0,0040	<0,0001	<0,0001
%I	0,6919	0,8488	0,5967
%V*%I	0,9994	0,9983	0,9911

DIVMS - digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

DIVFDN - digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

Em estudo de Yang (2002), com inclusão de ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR), não foi verificado efeito sobre o pH, assim como no presente estudo. Os valores finais de pH das incubações entre diferentes forragens e a adição de AGVCR variaram entre 6,64 e 6,86, estando dentro da faixa para uma ótima digestão das fibras no rúmen (MACKIE & WHITE, 1990). Em outro estudo recente, com adição de AGVCR (1 mM na concentração final de cada AGVCR) na incubação por 24 horas, Roman (2019) também não verificou nenhum efeito no pH comparado com o tratamento controle.

A falta do efeito do Isomix, que contém AGVCR, sobre as digestibilidades da matéria seca e da fibra em detergente neutro foi diferente. Ao resultado em estudos anteriores nos quais foram encontrados efeitos na digestibilidade, como no estudo de Liu et al. (2019). Estes autores observaram que a inclusão de AGVCR (5g AGVCR/kg de MS) para bezerros desmamados,

recebendo uma dieta com 50% silagem de milho, mostrou impacto positivo na digestibilidade dos nutrientes. Liu et al. (2018) também observaram que o incremento da concentração ruminal de AGV e na digestibilidade total dos nutrientes do trato foi devido à adição de AGVCR (uma mistura de isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato em 1: 1: 1 em dietas de bezerros de 10 meses de idade. Ling et al. (2013) avaliaram a inclusão de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) numa dieta de trigo nas concentrações de 0, 2, 4, 7 e 10 mmol/L, sendo observado efeito linear crescente nos AGVCR com a suplementação dos AACR e os autores observaram que a concentração mais baixa, de 2 mmol/L de AACR, permite ter uma melhor eficiência na fermentação ruminal e melhor digestibilidade da matéria seca e de fibra.

Outros estudos *in vitro* mostraram que AGVCR incrementam a degradação da parede celular pelas bactérias ruminais (Gorosito et al., 1985) e que a fermentação ruminal e a digestão da fibra pelos microrganismos celulolíticos são estimuladas, uma vez que a suplementação de AGVCR melhora a atividade das enzimas carboximetilcelulosa, xilanase e b-glucosidase (WANG et al., 2018).

As bactérias ruminais degradam as fibra utilizam, principalmente, amônia como fonte de N para o crescimento (BRYANT, 1973). Portanto, aumentar a disponibilidade de amônia para os microrganismos pode melhorar a digestão da fibra no rúmen (VAN SOEST, 1982).

Por outro lado, McCollum et al. (1987) não encontraram efeito da adição de um produto composto de AGVCR (combinação de isobutirato, isovalerato e valerato), sendo oferecidos 30 g/dia, nem na concentração ruminal de AGV, nem na digestão de fibras em novilhos alimentados com pasto de baixa qualidade. Da mesma forma, Suryapatama & Suhartati (2009) não encontraram nenhum efeito na digestibilidade dos nutrientes, sendo que os autores sugerem que a quantidade suplementada de 0,05 mM de AGVCR não foi suficiente para influenciar o crescimento das bactérias ruminais.

A variação nos efeitos da suplementação pode estar relacionada com a composição alimentar das dietas dos estudos, pois os resultados mostram que é maior a efetividade em dietas à base de gramíneas que numa dieta à base de leguminosas, devido ao maior conteúdo de proteína bruta (PB) das leguminosas. A literatura demonstrou que a resposta da fermentação ruminal e degradação da fibra seria limitada pela suplementação de AGVCR (na dose de 2 mM) em dieta com alto teor de proteína bruta e rápida taxa de degradação da fibra em detergente neutro (Yang, 2002) ou com baixo teor de carboidratos fermentáveis (LIU et al., 2019). Como no estudo de Ling (2013), que nas doses maiores que 2 mL de AACR, houve declínio na digestibilidade dos nutrientes, a degradação da fibra dietética não pode ser melhorada quando os AACR exógenos adicionados excedem o requisito ideal. Ao contrário, podem ocorrer efeitos

negativos por diminuir a degradação da fibra. Por outro lado, Van Soest (1982) indicou que volumosos contendo quantidades maiores de proteína bruta (PB) geralmente têm maior digestibilidade.

O pH do meio aumentou no presente estudo, pelo uso da virginiamicina (Tabela 4), estando de acordo com Faria (2016), o qual relata que virginiamicina possui potencial para aumentar o pH ruminal de animais recebendo diferentes dietas, com variações na proporção volumoso:concentrado. Também outros estudos mostraram que a suplementação de virginiamicina em dietas com 65% de concentrado, proporcionou aumento de pH ruminal de novilhos, o que pode ser explicado pelo aumento na população de bactérias que utilizam o ácido láctico e redução das bactérias produtoras de ácido láctico (GUO et al., 2010). Da mesma forma, Gomes (2016) ao avaliar diferentes antimicrobianos, verificou que o pH após uso da virginiamicina foi o mais elevado, mostrando ter tendência de estabilidade do pH.

A adição de virginiamicina proporcionou redução crescente da DIVMS e DIVFDN (Tabela 4). Os resultados foram similares aos de Faria (2016), ao avaliar a digestibilidade do capim Marandu com 33,5 mg/100 kg peso corporal de virginiamicina em vacas Nelore, nos meses de abril e maio, o que pode estar relacionado com o maior conteúdo de proteína bruta (PB) da pastagem, diminuindo a degradação dessa proteína e o suprimento de nutrientes às bactérias celulolíticas. Ademais, Thorniley et al. (1996), ao avaliarem diferentes concentrações de virginiamicina em ovelhas alimentadas com palha de trigo, verificaram que, nas concentrações de 80 e 160 mg de virginiamicina/dia (as mais altas no estudo), foi observada a diminuição da digestibilidade, a qual foi associada com a diminuição do consumo de matéria seca.

Quanto à DIVFDN, o comportamento foi similar ao de Oliveira (2015), que avaliaram a suplementação de virginiamicina (150 mg/kg de MS) na dieta de vaca leiteiras em pastejo, e encontraram diminuição da digestibilidade da fibra, que pode estar relacionada à tendência de redução da amônia com o uso da virginiamicina ou pelo efeito tóxico da virginiamicina sobre a microbiota ruminal celulolítica. Porém, no estudo de Campos (2018), com suplementação de 22,5 mg/kg de MS de concentrado para vacas mestiças com dieta à base de cana de açúcar, houve tendência a aumentar a digestibilidade da MS e da FDN, mostrando um melhor ambiente ruminal e melhor uso da fibra.

Tabela 4. Valores (médias $\pm$ erro-padrão) de pH e digestibilidades *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro em função dos níveis de virginiamicina

Virginiamicina (%)	pH	DIVMS (%)	DIVFDN (%)
0,0	6,87 $\pm$ 0,02 B	65,58 $\pm$ 1,05 A	66,98 $\pm$ 1,10 A
0,05	6,85 $\pm$ 0,02 B	63,42 $\pm$ 1,11 AB	64,32 $\pm$ 1,15 A
0,1	6,87 $\pm$ 0,02 B	59,77 $\pm$ 1,11 B	59,51 $\pm$ 1,15 B
0,2	6,90 $\pm$ 0,02 AB	53,96 $\pm$ 1,11 C	52,57 $\pm$ 1,15 C
0,4	6,89 $\pm$ 0,02 AB	50,85 $\pm$ 1,11 CD	47,18 $\pm$ 1,15 D
0,8	6,95 $\pm$ 0,02 A	47,14 $\pm$ 1,11 D	39,40 $\pm$ 1,15 E

DIVMS - digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN - digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; ^{A,B,C,D,E} médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As variáveis de DIVFDN e DIVMS desmostraram ter uma correlação alta positiva (0.89) entre elas com um P value < 0.05.

Outra variável que também foi analisada e tem importância é a concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen, pois este pode comprometer a atividade dos microrganismos ruminais, em especial daqueles que degradam carboidratos fibrosos, que são dependentes, do nível de nitrogênio amoniacal no rúmen. O uso de aditivos seletores da microbiota ruminal tem o objetivo de promover níveis de nitrogênio amoniacal adequados ao crescimento microbiano (FERREIRA et al., 2019). Portanto, manter uma adequada concentração de nitrogênio amoniacal no rumen é importante e indispensável para o crescimento bacteriano, sendo que as bactérias ruminais utilizam este como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana, mas a fermentação ruminal da proteína produz mais N-NH₃ ruminal que os microrganismos podem utilizar (PRESTON, 1986). Tem sido considerado que a concentração de N-NH₃ no rumen pode chegar a influenciar a degradação da fibra, sendo que valores mínimos acima de 4 mg/dL podem maximizar esta degradação (SATTER & SLYTER, 1974; HOOVER, 1986). Em nossos resultados, os valores de N-NH₃ (mg/dL = mM*1,4) encontram-se menores que o nível adequado para melhorar a degradação da fibra nos quatro menores níveis de virginiamicina (Tabela 6). Ferreira (2015) não encontrou diferença entre os tratamentos, sendo 3,961, 3,876 e 4,147 mg no controle e com 108 e 216 mg de virginiamicina/animal/dia, respectivamente. O mesmo comportamento foi encontrado no estudo de Salinas-Chavira (2009), no qual foram oferecidos 16 e 22,5 mg/kg de virginiamicina numa dieta à base de flocos de milho para animais de terminação, sendo que a suplementação da virginiamicina não afetou a quantidade de N-NH₃ nem a eficiência microbiana líquida (g

de N microbiano por kg de MO fermentada), mostrando resultados nos quais os efeitos de virginiamicina nos parâmetros ruminais eram bem pequenos. Virginiamicina aumentou o pH, associado a aumento da concentração de proteína solúvel e amônia. Ao contrário, em resultados obtidos por Moreira (2018), a aplicação de virginiamicina produziu redução da concentração de amônia, sendo que o autor sustenta este comportamento devido ao efeito da virginiamicina de inibir a proteólise e a desaminação de aminoácidos, podendo reduzir o acúmulo de amônia no rúmen, potencializando o incremento da retenção de proteína dietética no hospedeiro.

No caso de Costa (2016), Monção (2017) e Neto et al. (2018), os resultados foram iguais aos nossos resultados (Tabelas 5 e 6), em que a presença da virginiamicina aumentou a disponibilidade de N-NH₃, podendo-se inferir que a virginiamicina teve baixa atuação no controle de crescimento das bactérias fermentadoras de aminoácidos e sobre a deaminação proteica (*Clostridium aminophilum* e a *Clostridium stickandii*, que são bactérias gram-positivas). Por outro lado, nesse estudo também foi observado que um fator que também tem que ser considerado como influenciador na concentração de N-NH₃ no rúmen é o conteúdo de proteína bruta presente na forragem e nos suplementos oferecidos ao animal (DE OLIVEIRA et al., 2015). Tal é o caso de Monção (2017), que demonstrou que animais suplementados com fonte de proteína externa, com suplemento proteico no verão e suplemento proteico energético na seca apresentam maiores concentrações de nitrogênio amoniacal. Já no estudo de Costa (2016), o tratamento com virginiamicina teve maior conteúdo de proteína da fração A. A fração A da forragem é a fonte de nitrogênio não proteico que é rapidamente convertido em amônia pelos microrganismos ruminais (ORSKOV & MCDONALD, 1979). A proteína é mais rapidamente degradada, devido a maiores frações prontamente solúveis, que são rapidamente degradadas no ambiente ruminal, incrementando a concentração de NH₃ (FERREIRA et al., 2015). Outro motivo deste comportamento é que virginiamicina pode incrementar a população de protozoários, sendo que, no estudo de Costa (2018), foi observado aumento de *Entodinium*, o qual pode produzir de 70 a 75% de lises de bactérias.

A proteína microbiana pode suprir até 100% dos aminoácidos requeridos pelo animal, dependendo da qualidade e/ou quantidade de proteína não degradável no rúmen (NRC, 1996), sendo que sua limitação pode afetar o desempenho animal. Em nosso estudo, esta não foi afetada pela adição de virginiamicina (Tabela 5), embora a proteína solúvel foi incrementando com o incremento da concentração de virginiamicina, como no estudo de Moreira (2018), no qual a adição de virginiamicina não afetou a concentração de proteína microbiana, mas foi observada diminuição da atividade específica de deaminação com a adição de 10 µmol.L⁻¹,

embora na adição de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, encontrou-se inibição da concentração de amônia. No estudo de Manção (2017), o uso de nitrogênio e carboidratos, via suplemento proteico energético, possibilitou melhor adequação de proteína e energia no rúmen e, conseqüentemente, incrementou a síntese de proteína de origem microbiana. Souza et al. (2010) sugerem considerar que a ausência de carboidratos solúveis, como os açúcares do pasto ou carboidratos insolúveis como o amido, parece ter sido limitante da síntese microbiana. Também foi relacionado e levado em consideração que o maior consumo de matéria seca justificou o maior aporte de proteína microbiana.

A virginiamicina ocasionou diminuição dos AGV totais (Tabelas 5 e 6), enquanto que Costa (2018) e Coe et al. (1999) não encontraram nenhum efeito na concentração de AGV totais, no consumo e na digestibilidade. Os autores atribuíram a influência moderada da virginiamicina na fermentação ruminal por uma baixa presença de *Lactobacillus* sp e *S. bovis* em comparação com o tratamento controle. Outros fatores, como a relação entre as concentrações ruminais de AGV é o fluxo destes do rúmen, que precisam ser considerados ao interpretar as proporções de AGV (Clayton et al., 1999). Por outro lado, no estudo de Montano et al. (2015), a concentração de AGV foi mais baixa que o controle, sendo que a aplicação de virginiamicina não influenciou na proporção molar dos AGV, sendo que, neste caso, foi feita relação com a diminuição do consumo de matéria orgânica.

AGVCR e N-NH_3 são obtidos pela degradação de proteína da dieta e estes também são utilizados para crescimento bacteriano e sínteses de proteína microbiana (CUMMINS & PAPAS, 1985), embora em nossos resultados (Tabela 5) não foi encontrado nenhum efeito da suplementação de AGVCR via Isomix sobre as concentrações de N-NH_3 , proteína microbiana, proteína solúvel e AGV totais. Estes resultados foram similares aos encontrados por Broesder et al. (1987), que reportaram que pH ruminal, concentração de AGV totais, acético e propiônico, síntese de proteína microbiana e digestibilidade não foram afetados por suplementação com 20, 40 e 60 g de AGVCR, por animal por dia em dieta à base de feno. Outros estudos também sustentam que dietas altas em volumoso não mostram efeitos sobre a concentração de N-NH_3 (BROESDER, 1987; MCCOLLUM et al., 1987). Por outro lado, estudos têm mostrado diminuição da atividade da protease ruminal com a suplementação de AGVCR (LIU et al., 2014; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Liu et al. (2018) mostraram incremento da síntese de proteína microbiana, o qual está relacionado com o resultado da diminuição de N-NH_3 ruminal enquanto incrementava a suplementação de AGVCR.

No presente estudo, os AGV totais não tiveram efeito da incorporação de AGVCR, ao contrário do resultado obtido por Zhang et al. (2013), ao suplementar AACR separados, tendo

encontrado, nos três casos, que a concentração de AGV totais foi incrementada. Eles também obtiveram aumento do pH final, enquanto que no nosso caso, o pH não sofreu efeito de adição de AGVCRs via Isomix. No estudo de Wang et al. (2018), o incremento dos AGV é justificado pelo incremento de bactérias celulolíticas e da atividade enzimática, em que a suplementação de AGVCR produz incremento do consumo de matéria seca, o qual oferece mais substrato da fermentação microbiana e, assim, incrementa a concentração de AGV. Eles encontraram incremento da concentração dos AGV totais e comportamento linear decrescente do propionato, associado a aumento na proporção molar do acetato e na proporção de acetato propionato. Os autores sugeriram, assim, que a fermentação ruminal foi afetada, com uma maior produção de ácido acético, similar aos resultados de outros estudos (Liu et al., 2008; 2009; 2018). Por outro lado, a concentração de valerato não variou neste estudo, semelhante ao resultado obtido por Wang (2018). No caso do isobutirato, houve crescimento linear à medida que a concentração de AGVCR foi aumentada, concordando com os resultados de Liu et al. (2009), o qual foi justificado pela suplementação exógena de AGVCR, neste caso do produto Isomix.

Neste estudo, nos parâmetros acetato, propionato, butirato, isovalerato e a relação acetato:propionato (Tabela 5 e Tabelas 8-12), foi encontrada interação entre os dois aditivos. A dosagem *in vivo* reproduziu o melhor resultado *in vitro* (g de Isomix/g de MS da dieta), como pode ser visto nos AGV (aumento de propionato) e redução da relação acetato:propionato. *In vitro*, foram usados níveis acima e abaixo da recomendação *in vivo* (28 g de Isomix/kg de CMS). Pode ser que no Isomix tenha adição de ionóforos, como momensina, que atuam reduzindo a relação acetato:propionato (LANA & RUSSELL, 1997). Os resultados obtidos por Liu et al. (2020) mostram que o incremento de AGV totais sugere que a fermentação ruminal e o uso dos nutrientes melhoraram com a suplementação de AGVCR, sendo obtido incremento do acetato à medida que a digestibilidade da FDN e FDA aumentava. A produção de propionato não teve nenhum efeito, o qual significou que a suplementação de AGVCR não afetou o crescimento das bactérias produtoras de propionato. Além disso, estudos anteriores demonstraram que bactérias amilolíticas e amilase não foram alteradas (Liu et al., 2014; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2015), mas AGV totais e a relação acetato:propionato aumentaram com a suplementação de AGVCR.

No caso do uso da virginiamicina no estudo de Monção (2017), o uso incrementou a síntese de ácido propiônico no rúmen dos animais que receberam suplemento proteico energético na estação de outono, denotando que esse aditivo melhora a composição dos produtos da fermentação ruminal por meio da seleção de bactérias Gram-positivas. No estudo de Costa (2016), a virginiamicina incrementou a proporção de propionato e diminuiu acetato e

butirato, coincidindo com o resultado de Wolin (1960), o qual significa que é a via mais eficiente da fermentação de carboidratos no rúmen. Neste mesmo estudo de Costa (2016), foi mostrado que em 33,3% dos estudos houve incremento de propionato e em 66,7% dos estudos não houve mudança ou houve redução de propionato pelo uso de virginiamicina. Assim, permite inferir que a virginiamicina não muda muito a proporção de AGV (COSTA, 2016). Ao contrário dos resultados que são obtidos geralmente, no estudo de Castagnino (2018) as dietas com virginiamicina só apresentaram uma diminuição do ácido valérico. De acordo com Neto (2018), a virginiamicina produz incremento de bactérias produtoras de butirato, como *Butirivibrio*, o que pode explicar a melhora na eficiência dos animais, uma vez que o butirato é a principal fonte de energia para células epiteliais, e o incremento da produção deste componente pode produzir incremento da absorção dos nutrientes. Nos resultados de Moreira (2018), mostrou aumento de pH; além disso, mostrou diminuição de AGV e da relação acetato:propionato, o que pode ter ocorrido devido à habilidade de inibir a produção de ácidos orgânicos associados ao uso de aminoácidos e fontes de energia, como isobutírico, valérico e isovalérico. Mostrou, ainda, incremento de propionato, assim como nossos dados para maior concentração de virginiamicina (Tabela 9).

5. CONCLUSÃO

Este estudo indica a possibilidade de uso de aditivos antimicrobianos e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada para modificar o ambiente ruminal e obter melhores resultados na produção de bovinos.

Com o incremento da concentração da virginiamicina na dieta, foram houve aumento do pH, amônia (NH₃), degradabilidade da proteína (PB) e proteína solúvel (PS), e diminuição nas digestibilidade *in vitro* e dos ácidos graxos voláteis (AGV). A adição do Isomix não afetou estas variáveis, mas aumentou o isobutirato. Houve efeito significativo da interação dos aditivos nas variáveis acetato, propionato, butirato, isovalerato e relação acetato:propionato.

Os aditivos nas doses avaliadas, não mostraram efeitos positivos na digestibilidade *in vitro*. Entretanto, foi observado efeito benéfico do Isomix no aumento de propionato e redução da relação acetato:propionato, que pode melhorar o balanço energético e o desempenho animal. Pela falta de estudos, em nossas condições, com a suplementação de AGVCR, recomenda-se o desenvolvimento de novas pesquisas, principalmente em dietas contendo baixos níveis de proteína e com fornecimento de ureia.

Tabela 5. Valores P de algumas variáveis relacionadas à fermentação

FV	NH ₃ (mM)	PS (mg/L)	PM ¹ (mg/L)	Degr PB (%)	AGV total (mM)	Acetato (%)	Propionato (%)	Butirato (%)	Isobutirato (%)	Isovalerato (%)	Valerato ² (%)	Relação A:P
%V	<0,0001	0,0003	0,9705	0,0356	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1488	<0,0001	0,2919	<0,0001
%I	0,6385	0,9891	0,9856	0,9887	0,6319	<0,0001	0,0002	0,1827	<0,0001	<0,0001	0,2130	0,0001
V*I	0,9663	0,9483	0,9995	0,9999	0,5213	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,8476	0,0008	0,1538	<0,0001

FV - fonte de variação; V - virginiamicina; I - isomix; PS - proteína solúvel; PM - proteína microbiana; Degr. PB - degradabilidade da proteína bruta; AGV - ácidos graxos voláteis; A:P - acetato:propionato. ¹Média ± EP = 288 ± 64,3 mg/L; ²Média ± EP = 0,46 ± 0,17%.

Tabela 6. Teste de médias das variáveis significativas, sem interação, para virginiamicina

%V	NH ₃ (mM)	PS (mg/L)	Degr PB (%)	AGV total (mM)
0,0	2,24±0.74 C	166,64±43.43 B	34,47±1.82 B	82,23±16.19 BDE
0,05	2,61±0.74 BC	189,57±43.43 BD	38,25±1.82 A	82,12±16.19 BDE
0,1	2,34±0.73 BC	200,20±43.43 ABC	37,72±1.82 A	72,63±16.19 ACE
0,2	2,77±0.73 BC	198,62±43.43 ABC	40,14±1.82 A	68,06±16.19 AC
0,4	3,01±0.74 AB	233,70±43.43 AC	42,43±1.82 A	62,29±16.19 AC
0,8	3,45±0.74 A	213,33±43.43 ACD	44,46±1.82 A	61,98±16.19 A

V - virginiamicina; PS - proteína solúvel; Degr. PB - degradabilidade da proteína bruta; AGV - ácidos graxos voláteis; ^{A,B,C,D,E}médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Teste de médias das variáveis significativas, sem interação, para Isomix

%I	Isobutirato%
0,0	0,35±0.48 C
0,3	0,42±0.48 C
0,6	0,52±0.48 C
1,2	0,64±0.48 C
2,4	0,99±0.48 B
4,8	1,40±0.48 A

I - isomix; ^{a-c} médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Análise de interações para percentagem de acetato

I / V	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0,0	61,95 Aab	55,91 Abc	54,48 ABc	63,05 Aa	62,41 Aab	52,01 Ac
0,3	66,60 ABabc	56,08 Aabc	53,21 ABbc	59,27 Aab	62,33 Aa	50,02 Abc
0,6	62,40 Aa	53,14 Ab	58,06 ABab	62,21 Aa	60,84 Aa	41,84 Cc
1,2	43,95 Cd	49,91 Acd	55,32 ABbc	62,64 Aa	61,25 Aab	48,49 ABCcd
2,4	53,86 Bb	52,12 Abc	52,51 Bbc	64,01 Aa	61,49 Aa	45,74 ABCc
4,8	54,8 Bb	54,52 Ab	59,74 Aab	62,79 Aa	60,03 Aab	44,89 BCc

I-isomix; V-virginiamicina; ^{A,B,C, a,b,c,d} médias com letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Análise de interações para percentagem de propionato

I / V	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0,0	27,30 Bbc	34,66 Aab	34,82 ABab	25,83 Ac	26,66 Abc	37,36 Ba
0,3	34,38 Babc	32,21 Abc	36,91 ABab	30,11 Abc	28,34 Ac	41,45 Ba
0,6	27,82 Bb	35,16 Ab	31,54 ABb	27,52 Ab	27,40 Ab	54,00 Aa
1,2	47,02 Aa	39,06 Aab	33,34 ABbc	26,91 Ac	28,76 Ac	37,96 Bb
2,4	33,91 Bab	36,33 Aa	38,45 Aa	25,29 Ac	26,84 Abc	40,25 Ba
4,8	32,46 Bb	31,72 Ab	28,30 Bb	25,39 Ab	24,58 Ab	43,01 Ba

I-isomix; V-virginiamicina; ^{A,B,a,b,c}médias com letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10. Análise de interações para percentagem de butirato

I / V	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0,0	8,89 Aab	7,63 Ab	8,67 Aab	10,20 Aa	10,09 Aab	8,02 Aab
0,3	8,53 Aa	8,59 Aa	8,29 Aa	9,29 Aa	8,85 Aa	7,90 Aa
0,6	8,40 Aa	8,21 Aa	9,38 Aa	9,65 Aa	10,25 Aa	3,73 Ab
1,2	6,78 Ab	7,56 Aab	8,30 Aab	9,53 Aa	8,72 Aab	8,07 Aab
2,4	8,21 Aa	7,54 Aa	9,43 Aa	8,64 Aa	9,52 Aa	7,38 Aa
4,8	8,23 Aa	8,04 Aa	8,23 Aa	8,14 Aa	9,52 Aa	7,32 Ba

I-isomix; V-virginiamicina; ^{A,B,a,b}médias com letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11. Análise de interações para percentagem de isovalerato

I / V	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0,0	0,71 Ba	0,81 Ba	1,41 Aa	0,15 Ba	0,31 Ba	2,28 BCa
0,3	0,36 Ba	1,90 ABa	1,14 Aa	0,35 ABa	0,12 Ba	0,07 Da
0,6	0,59 Ba	2,06 ABa	0,50 Aa	0,29 ABa	0,33 Ba	0,30 CDa
1,2	1,78 ABb	2,07 ABb	2,38 Ab	0,34 ABb	0,50 Bb	4,66 Aa
2,4	2,43 ABb	2,71 ABb	1,51 Ab	0,75 ABb	0,74 Bb	5,60 Aa
4,8	3,90 Aa	3,84 Aa	1,63 Ab	2,43 Aab	4,02 Aa	3,99 ABa

I-isomix; V-virginiamicina; ^{A,B,C,D,a,b}médias com letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 12. Análise de interações para relação acetato:propionato

I / V	0,0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0,0	2,27 Aa	1,62 Ab	1,58 ABb	2,45 Aa	2,35 Aa	1,43 Ab
0,3	1,69 ABab	1,75 Aab	1,44 Bb	2,06 Aa	2,20 Aa	1,23 ABb
0,6	2,25 Aa	1,51 Ab	1,85 Aab	2,27 Aa	2,23 Aa	0,79 Bc
1,2	0,94 Cc	1,28 Abc	1,66 ABb	2,34 Aa	2,14 Aa	1,30 ABbc
2,4	1,60 Bbc	1,44 Ac	1,40 Bc	2,55 Aa	2,29 Aa	1,14 ABc
4,8	1,71 ABb	1,72 Ab	2,13 Aab	2,48 Aa	2,47 Aa	1,05 ABc

I-isomix; V-virginiamicina; ^{A,B,C,a,b,c}médias com letras iguais na mesma coluna (maiúsculas) ou mesma linha (minúsculas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). Beef Report - Perfil da pecuária no Brasil. São Paulo, 2019.

AZEVEDO, L.C.; SILVA, A.P.V. Uso de virginiamicina em nutrição de ruminantes. Faculdade Associadas de Uberaba, 2012

BALDWIN, R. L.; ALLISON M. J. Rumen metabolism. **Journal of Animal Science**, v.57, p.461-477, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72(1-2), p. 248-254, 1976.

BROESDER, J. T.; BARTON, R. K.; AL, G. E. T. Microbial Protein Synthesis in Beef Heifers. 1987.

BRYANT, M. P. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Fed. Proc. 32:1809–1813. 1973

CALLAWAY, T. R., EDRINGTON, T. S., RYCHLIK, J. L., GENOVESE, K. J., POOLE, T. L., JUNG, Y. S., NISBET, D. J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.4, n.2, p.43-51. 2003

CAMPOS, T. Suplementação de vacas leiteiras com Virginiamicina em dietas a base de cana de açúcar. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2018

CASTRO, B. **Efeito da ensilagem de grãos de milho e sorgo reconstituídos sobre os locais digestão e estimação da digestibilidade in vivo através de procedimentos de incubação ruminal in situ e in vitro em bovinos nelores**. 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

CHANEY, A. L., & MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, v.8, n.2, p.130-132, 1962

CLAYTON, E. H. et al. Effects of Feeding Virginiamycin and Sodium Bicarbonate to Grazing Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1545–1554, 1999.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 43, p. 145-192, 1979.

COE, M. L. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2259–2268, 1999.

COOKE, R.F.; DAIGLE, C.L.; MORIEL, P.; SMITH, S.B.; TEDESCHI, L.O.; VENDRAMINI, J.M.B. Cattle adapted to tropical and subtropical environments: Social, nutritional, and carcass quality considerations. **Journal of Animal Science**. v.98, n.2, 2020.

COSTA, J. P. R. et al. Does virginiamycin supplementation affect the metabolism and performance of Nellore bulls grazing under low and high gain rates? **Animal Science Journal**, v. 89, n. 10, p. 1432–1441, 2018.

COSTA, J.P.R. **Virginiamycin via mineral supplementation and sward height in growing nelore young bulls**. 2016. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2016.

COSTA, N. et al. Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v. 64R, p. 31-41, 2015.

CUMMINS, K. A.; PAPAS, A. H. Effect of Isocarbon-4 and Isocarbon-5 Volatile Fatty Acids on Microbial Protein Synthesis and Dry Matter Digestibility In Vitro1. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 10, p. 2588–2595, 1985.

DIJKSTRA, B.; BOER, H.; BRUCHEM, J.; MARIANNE, B. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, v.12. 1992

DE OLIVEIRA, I. S. et al. Salinomycin and virginiamycin for lactating cows supplemented on pasture. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 285–290, 2015.

DETMANN, E.; SOUZA, M.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.; CABRAL, L.; PINA, L.; LADEIRA, M.; AZEVEDO, J. Métodos para análise de alimentos. Suprema: Visconde do Rio Branco, p,204, 2012.

DIOLORENZO, N. **Manipulation of the Rumen Microbial Environment to Improve Performance of Beef Cattle**. North Florida Research and Education Center, University of Florida. 2011

EDE, T. S **Avaliação de métodos in vitro e modelos matemáticos para mensuração da digestibilidade da matéria seca e da fibra em alimentos para bovinos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

FARIA, I. **Desempenho de novilhas Nelore a pasto e cinética da fermentação ruminal da Urochloa brizantha cv. Marandu utilizando virginiamicina e/ou monensina sódica**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2016.

FENG Y.L. Ruminant nutrition. Beijing, China: Science Press; 2004

FERREIRA, S. F. et al. Parâmetros ruminais e desempenho de bovinos de corte sob pastejo no período chuvoso com uso de virginiamicina e salinomicina na dieta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Belém. *Anais...* Belém: 48. ed., 2011.

FERREIRA, S. F. et al. Desempenho e metabolismo ruminal em bovinos de corte em sistema de pastejo no período seco do ano recebendo virginiamicina na dieta. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 2067–2078, 2015.

FERREIRA, S. F. et al. Use of virginiamycin and salinomycin in the diet of beef cattle reared under grazing during the rainy season: Performance and ruminal metabolism. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–10, 2019.

GOMES, M. **Influência de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano in vitro**. Departamento em Microbiologia Agrícola. Viçosa-Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa. 2016.

GOULART, R.C.D. Avaliação de antimicrobianos como promotores de crescimento via mistura mineral para bovinos de corte em pastejo. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

GUO, T.; WANG, J.; LIU, K.; WANG, J., LI, D.; LUAN, S.; HUAO, X. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using time PCR in steers. **Journal of animal Science**, v.55, n.7, p. 276-285, 2010.

HEDDE, R.D.; SHOR, L.; QUACH, R. Virginiamycin activity and safety in ruminants. **Veterinary Pharmacology and Toxicology**, p.768-770, 1983.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of dairy science**, v. 69, n. 10, p. 2755–2766, 1986.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **Journal of animal Science**. 75:224-229, 1997.

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.

LENG R.A. Factors affecting the utilization of ‘poor-quality’ forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**. v. 3, p. 277-303, 1990

LING, H.; CHEN, Y.; LI, X.; & XIA, Y. Effects of Branched-chain Amino Acids on In vitro Ruminal Fermentation of Wheat Straw. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 523-528, 2013.

LIU, Q.; WANG, C.; HUANG, Y.; DONG, K.; YANG, W.; ZHANG, S.; & WANG, H. Effects of isovalerate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 6, 2009.

LIU, Y., DU, H., WU, Z., WANG, C., LIU, Q., GUO, G., ZHANG, S. Branched-chain volatile fatty acids and folic acid accelerated the growth of Holstein dairy calves by stimulating nutrient digestion and rumen metabolism. **Cambridge Core**, v. 4, n.6, p. 1176-1183, 2019.

LIU, Q.; WANG, C.; PEI, C.; LI, H.; WANG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; HE, J.; WANG, H.; YANG, W.; BAI, Y.; SHI, Z.; LIU, X. Effects of isovalerate supplementation on microbial status

and rumen enzyme profile in steers fed on corn stover based diet. **Livestock Science**, v. 161, p. 60–68, 2014.

LIU, Q.; WANG, C.; LIU, Q.; GUO, G.; HUO, W.; ZHANG, Y.; PEI, C.; ZHANG, S. Effects of branched-chain volatile fatty acids on lactation performance and mRNA expression of genes related to fatty acid synthesis in mammary gland of dairy cows. **Animal**, v. 12, n. 10, p. 2071–2079, 2018.

LIU, Q.; WABG, C.; LIU, Q.; GUO, G.; HUO, W.; ZHANG, Y.; PEI, C.; ZHANG, S.. Effects of branched-chain volatile fatty acids and fibrolytic enzyme on rumen development in pre- and post-weaned Holstein dairy calves. **Animal Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 512–519, 2019.

MACKIE, R., & WHITE, B. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. **Journal of Dairy Science**, v.73, n. 10, p. 2971 - 2995, 1990.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Disponível em < <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E194-E203, 2001.

MCCOLLUM, F. T.; KIM, Y. K.; OWENS, F. N. Influence of supplemental four- and five-carbon volatile fatty acids on forage intake and utilization by steers. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 6, p. 1674–1679, 1987.

MENDES, P. **Efeito da suplementação de virginiamicina na produção e composição do leite em vacas de alta produção**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2018.

MERTENS, D. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal AOAC International**, v.85, n.6, p.1217-1240, 2002.

MONÇÃO, F. P. **Suplementação e uso da virginiamicina como moduladores do desempenho de bovinos nelore na recria e seus efeitos na terminação em confinamento**. Tese de Doutorado. Universidade estadual paulista Julio de Mesquita Filho. 2017.

MONTANO, M. F. et al. Effects of monensin and virginiamycin supplementation in finishing diets with distiller dried grains plus solubles on growth performance and digestive function of steers. **Journal of Applied Animal Research**, v. 43, n. 4, p. 417–425, 2015.

MOREIRA, S. M. et al. Distinct Effects of Bovicin HC5 and Virginiamycin on in vitro Ruminant Fermentation and Microbial Community Composition. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 8, p. 156, 2018.

NAGARAJA, T.G. et al. Manipulation of ruminal fermentation BT - The Rumen Microbial Ecosystem. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). . Dordrecht: Springer Netherlands, p. 523–632, 1997.

NAGARAJA, T.G.; TAYLOR, M.B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n.7, p.1620-1625, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 1996.

NETO, J. A. A. et al. Determining the optimal dose of virginiamycin for ruminal parameters and performance of Nellore cattle on pasture. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1749–1758, 2018.

NUÑEZ, A.J.C.; CAETANO, M.; BERNDT, A. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nellore steers fed high concentrate diets. **Agriculture Science**, v.70, p.229-236, 2013.

ORSKOV, E. R. & I. MCDONALD. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.

PAGE, S.W. Mode of action. In: Page, S. W. (Ed.). The role of enteric antibiotics in livestock production. Canberra: Avcare, p.1-2, 2-14, 2003.

PAPAS, A. M.; AMES, S. R.; COOK, R. M.; SNIFFEN, C. J.; POLAN, C. E.; CHASE, L. Production responses of dairy cows fed diets supplemented with ammonium salts of iso c-4 and c-5 acids. **Journal Dairy Science**, v.67, p.276-293, 1984

PAULINO, M. F.; FIGUEIREDO, D. M.; MORAES, E. H. B. K. et al. Suplementação de Bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. In: Simpósio de Produção de Gado de Corte, 4., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004. p.93-144.

PRESTON, T. R. Analytical methods for characterizing. In: FAO Corporate Document Repository. Feed resources for ruminants. Better utilization of crop residues and by products in animal feeding: research guidelines. 2. A practical manual for research workers. Rome: FAO, p.106, 1986.

ROGERS, J.A; BRANINE, M.E; MILLER, C.R; WRAY, M.I; BARTLE, S.J; PRESTON, R.L; GILL, D.R; PRITCHARD, R.H.; STILBORN, R.P.; BECHTOL, D.T. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v.73, p.9-12, 1995.

ROMAN, Y. **Assessing Dietary Conditions Influencing the Requirements by Rumen Bacteria for Branched Chain Volatile Fatty Acids**. These of doctorate. Animal Science. The Ohio State University. 2019

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G.; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of animal Science**, v.70, p.551-3561, 1992.

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

SALINAS-CHAVIRA, J.; LENIN, J.; PONCE, U.; SANCHEZ, N.; TORRENTERA, N.; ZINN, R.A. Lenin. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 12, p. 4101–4108, 2009.

SALEM, A.F.Z.M. **Nutritional strategies of animal feed additives**. [s.l.: s.n.]

SANTOS, M.; GUIMARAES, S.; SILVA, O.; NASCIMENTO, A. **Aditivos alimentares na nutrição de ruminantes**. Revista eletrônica Nutritime, v.12, n.4, p.4162-4174, 2015.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production in vitro. **The British journal of nutrition**, v. 32, n. 2, p. 199-208, set. 1974.

SIEGFRIED, R., RUCKEMANN, H., & STUMPF, G. Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**. v. 37(3-4), p. 298-304, 1984.

SILVA, R.O.; BARIONI, L.G; HALL, J.A.J.; FOLEGATTI MATSUURA, M.; ZANETT ALBERTIN, T.; FERNANDES, F.A.; MORAN, D. Increasing beef production could lower greenhouse gas emissions in Brazil if decoupled from deforestation. **Nature Climate Change**, v.6, p.493-497, 2016

SOARES, T. **Utilização de volumoso extrusado contendo diferentes aditivos na alimentação de ovinos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. 2019.

SOUZA, M. A. et al. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fibre in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical animal health and production**, v. 42, n. 6, p. 1299–1310, 2010.

SOUZA, R.C.; REIS, R.B.; LOPEZ, F.C.F. Efeito da adição de teores crescentes de ureia na cana-deaçúcar em dietas de vacas em lactação sobre a produção e composição do leite e viabilidade econômica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (ABMVZ), v.67, n.2, p.564-572, 2015

SURYAPRATAMA, W.; SUHARTATI, F. M. Effect of supplementation of branched chain fatty acid on colony of ruminal bacteria and cell of protozoa. **Journal of Animal Production**, v. 11, p.129–134, 2009.

TAMMINGA, C.A.; DALE, J.M.; GOODMAN, L. et al. Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: A study in three rat strains. **Psychopharmacology**, v.102, p.474-478, 1990.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1648–1658, 2000.

TEDESCHI, L. O.; OWENS, F. N.; POPPI, D. P.; CARSTENS, G. E.; BOIN, C. Grain processing interactions with cattle breed (*Bos indicus* and *Bos taurus*). 7th Int. Congr. Beef Cattle. Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz” (FEALQ), Piracicaba, SP, Brazil, p. 1–21, 2012.

THORNILEY, G. R.; BOYCE, M. D.; ROWE, J. B. Changes in feed intake and digestibility in sheep given virginiamycin. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 4, p. 539–544, 1996.

TILLEY, J.; TERRY, R. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v.18, n.2, p.104-111, 1963.

VAL NETO, E. R.; LANA, R. P.; VAL, H. N.;LEAO, M. I.; MANCIO, A. B. Evaluation of performance of lactating dairy. **Journal of Animal Science**, vol. 88, E-Supplement 2, 2010.

VAN SOEST, P. J. Fecal composition, mathematics of digestion balances and markers. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Inc Corvallis, Oregon, c.4, p. 39–57, 1982

WANG, C. et al. Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 123–131, 2015.

WANG, C. et al. Effects of rumen-protected folic acid and branched-chain volatile fatty acids supplementation on lactation performance, ruminal fermentation, nutrient digestion and blood metabolites in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, 2018.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. Ann. N. Y. **Academic Science**, v. 1125, p. 289-297, 2008.

WOLIN, M. J. A Theoretical Rumen Fermentation Balance. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 10, p. 1452–1459, 1960.

YANG, C. Response of Forage Fiber Degradation by Ruminal Microorganisms to Branched-Chain Volatile Fatty Acids, Amino Acids, and Dipeptides. **American Dairy Science Association**, v. 85, p. 1183-1190, 2002.

ZHANG, H. L. et al. Effects of Branched-chain Amino Acids on In vitro Ruminal Fermentation of Wheat Straw. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 523–528, 2013.

ZHANG, Y. L. et al. Effects of supplementation of Simmental steers with 2-methylbutyrate on rumen microflora , enzyme activities and methane production. **Animal Feed Science and Technology**. v. 199, p. 84–92, 2015.

APÊNDICE

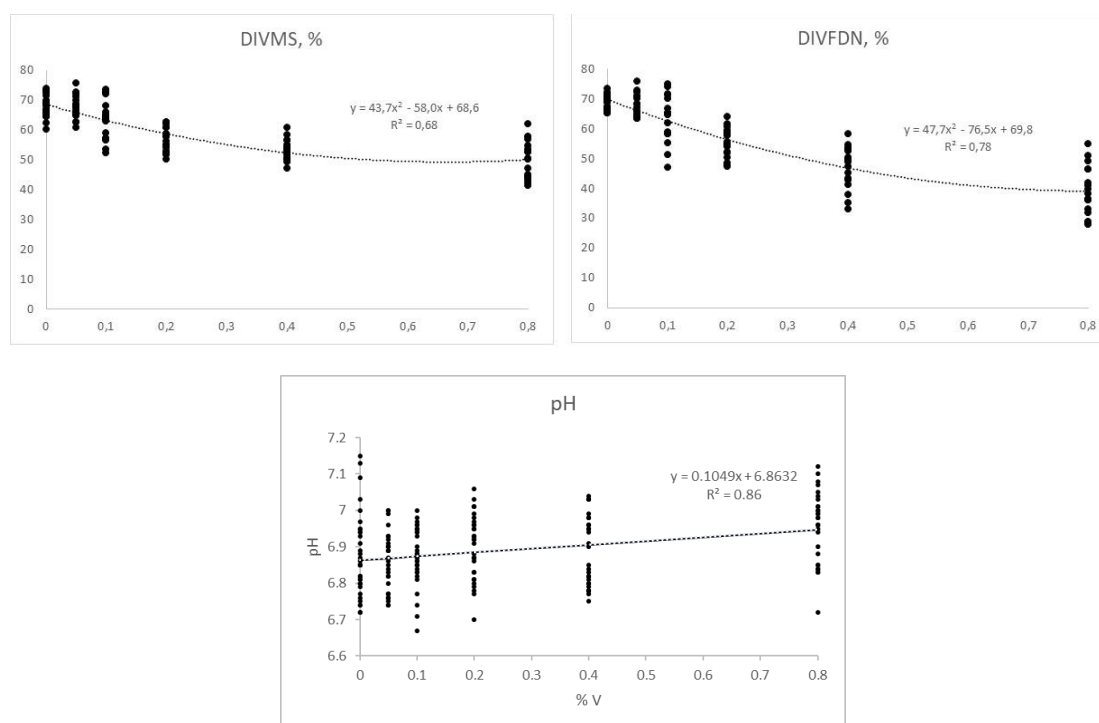


Figura 1. DIVMS, DIVFDN e pH in vitro em função de níveis de virginiamicina 10% (% da MS da dieta).

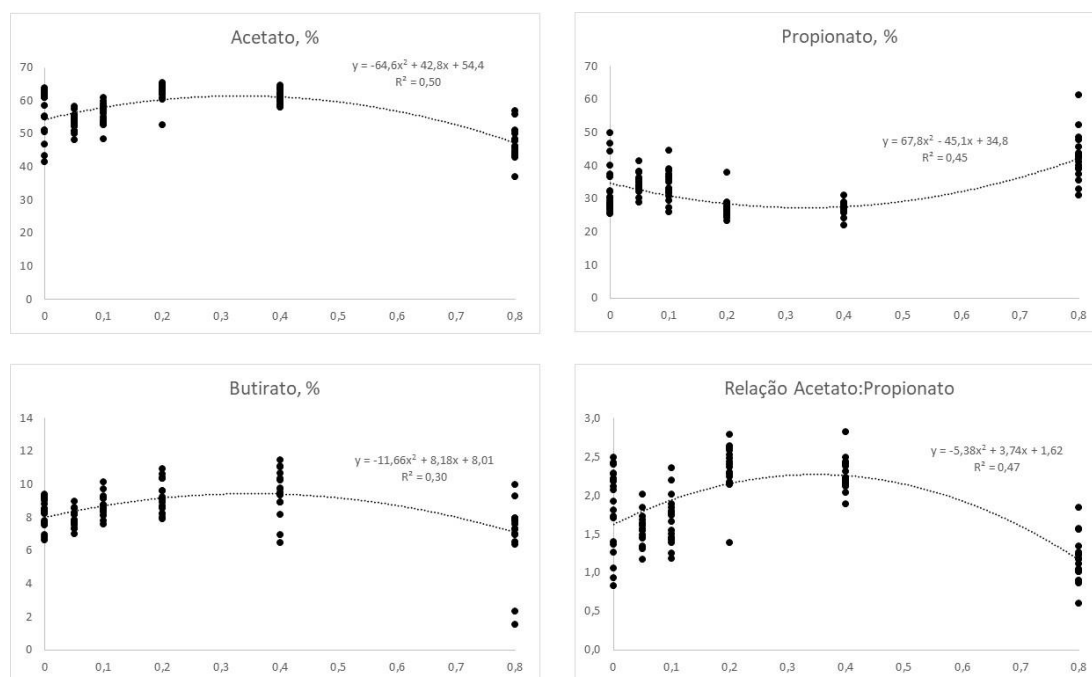


Figura 2. Parâmetros de fermentação in vitro em função de níveis de virginiamicina 10% (% da MS da dieta).

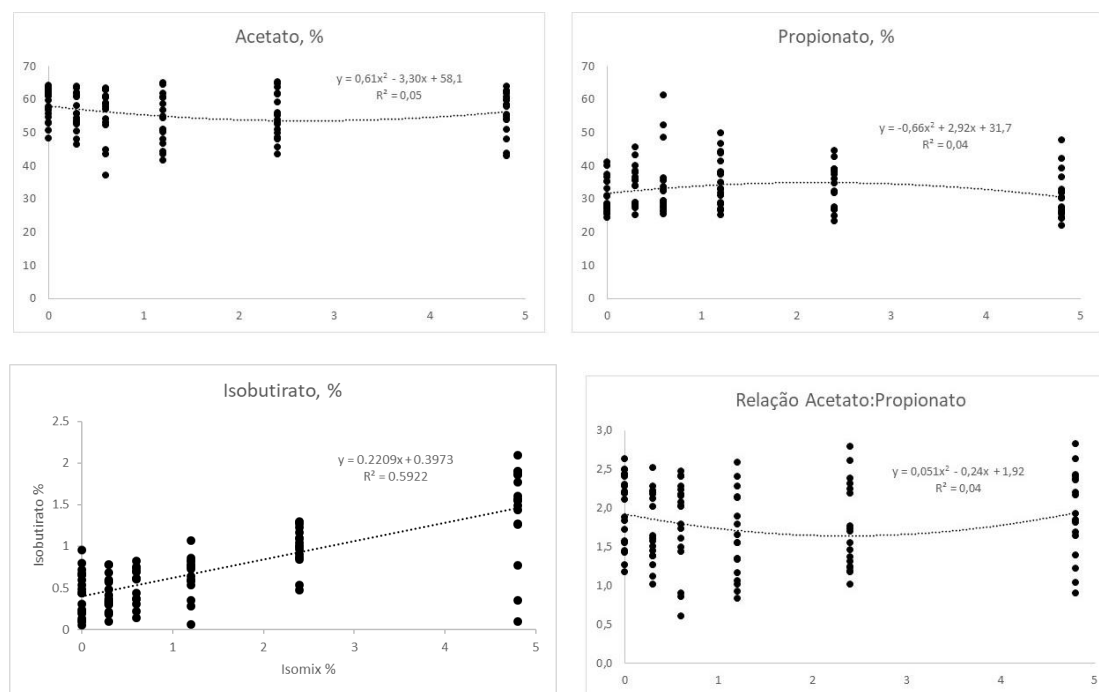


Figura 3. Parâmetros de fermentação in vitro em função de níveis de Isomix (% da MS da dieta).

Tabela 1. Correlação entre algumas das variáveis analisadas

	DIVMS	pH	DIVFDN
DIVMS	1.00000	-0.51584 <.0001	0.89460 <.0001
pH	-0.51584 <.0001	1.00000	-0.39720 <.0001
DIVFDN	0.89460 <.0001	-0.39720 <.0001	1.00000