

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

EFEITO DE ADITIVOS MODIFICADORES DA
FERMENTAÇÃO RUMINAL SOBRE A PRODUÇÃO DE
GASES *IN VITRO*

Aline Reginaldo dos Santos

Campo Grande – MS

2025

2025	EFEITO DE ADITIVOS MODIFICADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL SOBRE A PRODUÇÃO DE GASES <i>IN VITRO</i>	Santos, A. R
------	---	--------------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITO DE ADITIVOS MODIFICADORES DA
FERMENTAÇÃO RUMINAL SOBRE A PRODUÇÃO DE
GASES *IN VITRO***

Effect of additives that modify ruminal fermentation on *in vitro* gas production

Aline Reginaldo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Costa Gomes

Coorientadores: Prof. Dr. Gelson dos Santos Difante

Dra. Marlene de Barros Coelho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Campo Grande – MS

2025



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

ALINE REGINALDO DOS SANTOS

EFEITO DE ADITIVOS MODIFICADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL SOBRE A PRODUÇÃO DE GASES IN VITRO

EFFECTS OF RUMEN FERMENTATION MODIFIERS FEED ADDITIVES ON IN VITRO GAS PRODUCTION

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 30-06-2025

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Rodrigo da Costa Gomes
(EMBRAPA) – Presidente

Dra. Carolina Tobias Marino
(EMBRAPA)

Dra. Marlene de Barros Coelho Caviglioni
(EMBRAPA)

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Marlene de Barros Coelho, Usuário Externo**, em 07/07/2025, às 12:03, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo da Costa Gomes, Usuário Externo**, em 08/07/2025, às 11:15, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Tobias Marino, Usuário Externo**, em 08/07/2025, às 14:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5726006** e o código CRC **152F5D64**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente, a mim mesma, por não ter desistido nos momentos difíceis, e a Deus, por me guiar em cada etapa desta jornada.

À minha mãe, Ivaneide Reginaldo da Rocha, ao meu pai, Aivaldo Vidal dos Santos, à minha irmã, Érika Reginaldo dos Santos, à minha querida avó, Dominicia Ambrósio, e ao meu companheiro, João Paulo Bezerra da Silva Junior, por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional. Amo profundamente cada um de vocês!

Aos meus grandes amigos, Carlos Eduardo Meireles e Maria Caroline de Moura Cavalheiro, pela amizade, incentivo constante e apoio desde sempre. Minha eterna gratidão e amor!

À Dra. Marlene de Barros Coelho, ao Prof. Dr. Gelson dos Santos Difante, ao Dr. Rodrigo da Costa Gomes e à Dra. Carolina Tobias Marino, pela orientação, paciência e oportunidades que me foram concedidas ao longo desses dois anos. Sou imensamente grata pelos aprendizados que levo de cada um de vocês.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial ao corpo docente e aos funcionários, pelo conhecimento compartilhado e suporte durante toda a minha formação. Aos amigos que fiz ao longo do curso, em especial à Anny Caroline Della Vechia de Souza, por toda a parceria e amizade.

À Embrapa Gado de Corte, pela estrutura e suporte técnico que possibilitaram a realização dos experimentos e análises laboratoriais, bem como a todos os funcionários e à bolsista PIBIC Ester de Queiroz Cusinato Alves, pela colaboração essencial ao projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, à Fundect pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo fomento à pesquisa e à formação acadêmica.

Obrigada a todos!

Aline Reginaldo dos Santos. **Efeito de aditivos modificadores da fermentação ruminal sobre a produção de gases *in vitro***. 2025. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

RESUMO

A disponibilidade de diferentes cultivares forrageiras e aditivos alimentares para a produção de bovinos a pasto podem levar à hipótese de possíveis interações no processo de fermentação ruminal que sejam mais ou menos favoráveis para a eficiência produtiva. Além disso, novas classes de aditivos, tais como os nanominerais, tem surgido, demandando sua avaliação com forrageiras tropicais. O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética de fermentação ruminal *in vitro* de gramíneas tropicais submetidas à adição de aditivos como: ionóforos e não ionóforos (Experimento 1), nanopartículas de óxido de zinco e selênio (Experimento 2), e enzimas comerciais (Experimento 3). No Experimento 1, as gramíneas *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Massai foram incubadas com monensina, salinomocina, lasalocida e virginiamicina. No Experimento 2, nanopartículas de óxidos de zinco e selênio foram sintetizadas e comparadas a fontes inorgânicas (sulfato de zinco e selenito de sódio), utilizando *B. brizantha* cv. Marandu como substrato. Após 48 horas de fermentação *in vitro*, foram coletadas amostras de gases do headspace de dois frascos por tratamento aleatoriamente, utilizando seringas e frascos de 20 mL previamente evacuados. No Experimento 3, foram testadas as enzimas comerciais Fibrozyme®, Allzyme SSF®, Allzyme VegPRO® e Potenzya® Grano, também incubadas com *B. brizantha* cv. Marandu. A técnica de fermentação *in vitro* utilizou 0,5 g de forragem, 25 mL de líquido ruminal (de bovinos canulados) e 50 mL de solução tampão, incubados em frascos de 250 mL sob ambiente anaeróbico e temperatura constante de 39 °C por 48 horas. A produção de gases foi monitorada automaticamente pelo sistema Ankom^{RF}. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey (5%). A virginiamicina reduziu significativamente (P=0,0055) (P<0,05) a degradabilidade da matéria seca em 11%, a produção máxima de gases (P=0,0178) em 20%, e a taxa de fermentação ruminal, destacando-se pela redução (P<0,0001) de até 43% na taxa de fermentação da cv. Basilisk. Para a cultivar Marandu, a degradabilidade da matéria seca foi 10% menor (P=0,0124) no tratamento virginiamicina, quando comparado a monensina e a taxa de fermentação foi 40% menor (P<0,0001). Para a cultivar Massai, a taxa de fermentação foi 39% menor (P<0,0001) no tratamento virginiamicina, quando comparado aos demais. Já os aditivos à base de nanominerais e enzimas comerciais não promoveram alterações significativas na cinética de fermentação ruminal *in vitro*. No entanto, na análise de cromatografia gasosa feita com os nanominerais a proporção de CO₂ foi menor (P=0,0513) nos tratamentos com nanopartículas de selênio e de óxido de zinco 400 mg em relação ao sulfato de zinco. Conclui-se que a virginiamicina tem potencial para inibir a fermentação ruminal de gramíneas tropicais, enquanto os demais aditivos não apresentaram efeito significativo nas condições avaliadas.

Palavras-chave: bovinos, enzimas, fermentação ruminal *in vitro*, ionóforos e não-ionóforos, nanoaditivos, promotor de crescimento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Cinética da fermentação ruminal e aumento da eficiência produtiva	11
3.2 Papéis dos aditivos modificadores da fermentação ruminal	12
3.3 Características e tipos de aditivos modificadores da fermentação ruminal	13
3.4 Salinomicina	13
3.5 Monensina	14
3.6 Lasalocida	15
3.7 Virginiamicina.....	16
3.9 Enzimas exógenas sobre a fermentação ruminal	17
3.12 Forrageiras tropicais utilizadas no Brasil	26
3.13 Degradação ruminal de forrageiras tropicais	27
3.14 A técnica da digestibilidade <i>in vitro</i> por produção de gases	29
Referências.....	31
4 ARTIGO:.....	41
Efeito de aditivos modificadores da fermentação ruminal sobre a produção de gases <i>in vitro</i>	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
Introdução	44
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão	53
Conclusão.....	61
Referências.....	63

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência do aumento populacional, onde se estima que em 2030 a população mundial chegará a 8,5 bilhões e em 2050 a 9,7 bilhões de pessoas (United Nation, 2019), há uma preocupação com a demanda crescente por proteína animal. Com o aumento do rebanho ao longo dos anos, a bovinocultura tem recebido muitas críticas por contribuir com o aumento de gases de efeito estufa (GEE), os quais são oriundos da fermentação ruminal e do inadequado manejo dos dejetos (Brunes & Couto, 2017).

A pecuária, com a agricultura, contribui de forma significativa com a emissão de três GEE: metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (N_2O). A produção do CH_4 é resultado de um processo fisiológico natural que acontece no rúmen dos herbívoros ruminantes. Esse processo ocorre em condições anaeróbicas por bactérias metanogênicas presentes no rúmen (Bezerra, 2019). Calcula-se que em torno de 2% a 12% da energia da dieta se perde durante a produção de metano entérico e, em dietas fibrosas de baixa qualidade essa perda pode chegar a 18% (Patra *et al.*, 2017; Berchielli *et al.*, 2011). Isso se deve ao fato de que a degradação da celulose e hemicelulose produz maior concentração de acetato. Entretanto dietas com maiores porções de carboidratos solúveis elevam a produção de propionato, reduzindo acetato e butirato, pois carboidratos de rápida fermentação diminui o pH ruminal, ocasionando a morte de bactérias fibrolíticas e de protozoários (Mota *et al.*, 2010). Segundo Nussio *et al.* (2006) a produção de acetato e butirato gera maior liberação de H_2 no rúmen, o que indica que quanto maior a proporção acetato:butirato maior a produção de CH_4 .

Devido à preocupação mundial com os impactos ambientais, estudos e pesquisas se voltaram para melhorar a eficiência da produção. Um dos desafios é a manipulação da microbiota ruminal para degradar de forma eficiente a biomassa vegetal, proporcionando, assim, uma melhor disponibilidade dos nutrientes para os animais. Muitos trabalhos já foram desenvolvidos com esta finalidade, mas a compreensão da microbiota ruminal ainda se encontra limitada, sendo afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos (Huws *et al.*, 2018). Diante disso, a produção nacional de carne bovina encara o desafio de aumentar a oferta em quantidade e qualidade, de maneira eficiente, produzindo mais em menos tempo, sem deixar de

lado a sustentabilidade ambiental, a sanidade e o bem-estar dos animais (Berchielli *et al.*, 2011).

Mesmo com todo o conhecimento nutricional voltado à produção bovina, pouco ainda se conhece do funcionamento metabólico dos microrganismos presentes no rúmen. Essa falta de conhecimento está diretamente relacionada com a insuficiente disponibilidade de estratégias para lidar com a produção de metano (CH₄) durante o processo de fermentação dos animais ruminantes. Com isso, há uma busca por métodos nutricionais que minimizem a produção de CH₄ e, conseqüentemente, a sua emissão para o meio ambiente.

As emissões de gases de efeito estufa (GEE) podem ser mensuradas por meio de uma simulação do ambiente ruminal pela fermentação *in vitro*, onde se consegue estimar a produção de CH₄ e dióxido de carbono (CO₂), de forma útil e flexível. A mensuração em animais requer equipamentos complexos e de alto custo. Além do que, a simulação permite entender e aprimorar o desempenho dos animais em todos os sistemas de produção (Castelán-Ortega, 2014). Com isso, de forma a melhorar o processo de fermentação ruminal, busca-se o desenvolvimento de novos aditivos a serem incorporados nas dietas bovinas, que possam minimizar, de forma significativa, as emissões de GEE pelos ruminantes, proporcionando, assim, um aumento na eficiência dos sistemas de produção pelo melhor aproveitamento das dietas consumidas.

2 OBJETIVO

Foi levantada a hipótese de que possíveis interações entre cultivares forrageiras e aditivos alimentares poderiam existir, levando a condições mais ou menos favoráveis para a cinética da fermentação ruminal. Além disso, considerando o desenvolvimento de novas classes de aditivos, tais como os nanominerais, hipotetiza-se que nanopartículas (sendo o nanômetro igual a 10⁻⁹ m) de elementos minerais poderiam afetar positivamente a fermentação ruminal. Com isso, o objetivo foi avaliar o efeito de antibióticos ionóforos e não-ionóforos, nanominerais e enzimas comerciais sobre a cinética de fermentação ruminal, avaliada pela técnica da produção de gases *in vitro*, utilizando diferentes cultivares de forrageiras tropicais como substrato.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cinética da fermentação ruminal e aumento da eficiência produtiva

O rúmen é uma câmara fermentativa que fornece aos microrganismos um ambiente anaeróbico, em condições de pH, temperatura, capacidade tampão e nitrogênio disponível em forma de ureia (Sippert, 2019). A população microbiana consiste em bactérias, fungos e protozoários, que por meio da degradação do alimento, transformar os nutrientes em produtos como, ácidos graxos voláteis e aminoácidos, os quais são a principal fonte de energia para os ruminantes (Burt, 2004; Weimer, 2015).

Nesse ecossistema complexo, estima-se que haja em torno de 4.000 espécies de microrganismos, onde a população bacteriana presente no rúmen é da ordem 10^{11} por mL, protozoários de 10^6 por mL e fungos de 10^4 por mL (Russel, 2002). Dentre os fatores que podem afetar a colonização desses grupos no rúmen, a dieta e o animal, exercem um importante efeito de modulação na diversidade e na atividade em determinada situação (Weimer, 2015).

Visando alterar a população microbiana, para minimizar a produção de acetato e aumentar a de propionato, a dieta se torna alvo para conseguir modular a fermentação ruminal. O processo de síntese do acetato libera hidrogênio (H_2) no ambiente ruminal, que ao entrar em contato com as bactérias metanogênicas, o transformam em CH_4 pelo processo de redução de CO_2 . Esse processo gera perda de energia da dieta, podendo variar de 4 a 14%, (Muñoz, 2016).

A composição da dieta e suas características físico-químicas são fatores importantes que determinam os grupos predominantes no ambiente ruminal, em particular esses grupos determinam a relação de acúmulo de proteínas, fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CNF), manipulando a variação de nutrientes fornecidos e conseqüentemente, o ambiente ruminal em relação as características físico-químicas como, pH da pressão osmótica e fluxo da digesta (Allen, 2000; Oliveira *et al.*, 2016).

Dietas com concentrações altas de FDN proporcionam um ambiente favorável para o crescimento de bactérias celulolíticas, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens albus* e fungos com o *Neocalimastix frontalis*. Em outras situações, quando a dieta possui níveis elevados

de concentrado há o favorecimento de bactérias amilolíticas como a *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* e *Streptococcus bovis* e de protozoários ciliados (Russell & Strobel, 1989). Assim, alterações na cinética de fermentação ruminal podem ser dependentes do regime alimentar em questão, aumentando a importância de estudos voltados a bovinocultura realizada a pasto.

O grupo de microrganismo responsável pela degradação da fibra é um dos mais importantes, no entanto eles são responsáveis pela produção de H₂, colaborando com a produção de metano pelas bactérias metanogênicas (Schären, 2017). Nesse sentido, a busca pelo controle da microbiota ruminal, torna-se um desafio para os nutricionistas que buscam por alternativas com o objetivo de diminuir a perda de energia via produção de CH₄, aumentar eficiência dos recursos nutricionais e assim contribuir para ambiente ruminal mais energético (Costa, 2022).

3.2 Papéis dos aditivos modificadores da fermentação ruminal

Ao longo dos anos, a produção nacional de carne bovina tem encarado o desafio de aumentar a oferta de proteína animal em quantidade e qualidade, de maneira eficiente, produzindo mais em menos tempo. Com isso, surgiu a necessidade de buscar alternativas que melhorem a eficiência alimentar dos animais, proporcionando melhor disponibilidade de nutrientes e digestibilidade dos alimentos. Uma alternativa eficiente é o uso de aditivo, um composto, que não fornece nutriente, que atua no estímulo do crescimento, melhorando a eficiência dos animais na utilização dos alimentos ou promovendo benefícios à saúde por meio de algum mecanismo de ação (Church, 1972).

No Brasil, os aditivos mais utilizados são os antibióticos ionóforos. A palavra ionóforo significa “carrear íons”, isso quer dizer que seu modo de ação é sobre o transporte de íons que atua sobre a permeabilidade das células bacterianas, ocasionando um desequilíbrio osmótico no meio interno da célula alvo, essa ação proporciona a inibição ou até mesmo a morte das bactérias. Eles também apresentam características hidrofóbicas, sendo então uma peculiaridade que possibilita a entrada na membrana lipídica, o que favorece o processo de destruição das células bacterianas (Rangel *et al.*, 2008).

Os ionóforos são oriundos da fermentação de variadas espécies de *Streptomyces ssp.*, sendo classificados como antibiótico poliéster. Apresentam efeito

de inibição de crescimento bacteriano, onde atuam sobre a fermentação ruminal, proporcionando melhora na eficiência alimentar dos animais (Rangel *et al.*, 2008).

3.3 Características e tipos de aditivos modificadores da fermentação ruminal

Com o descobrimento de compostos que possibilitam o controle metabólico e, conseqüentemente, aumentam a eficiência alimentar, proporcionando uma maior produção animal, houve a criação de uma nova classe de elementos que receberam o nome de aditivos alimentares. Seguindo a legislação estabelecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n° 13, de 30 de novembro de 2004, que passou por alterações na Instrução Normativa n° 44, de 15 de dezembro de 2015, os aditivos são conceituados como sendo substâncias, produtos formulados ou microrganismos que são incorporados intencionalmente às rações, não sendo um ingrediente, que tenha ou não um valor nutricional, mas que possa melhorar o desempenho animal (MAPA, 2015).

Esses aditivos podem ser classificados em grupos funcionais: equilibradores de microbiota, sendo microrganismos que se multiplicam ou substâncias derivadas que possuem efeito positivo sobre a microbiota do trato gastrointestinal; digestivo, sendo substâncias facilitadoras da digestão de alimentos, agindo diretamente em determinadas matérias primas; e promotores de crescimento, sendo substâncias que possuem um efeito positivo no desempenho animal (MAPA, 2015).

Ao longo dos anos, alguns aditivos ganharam destaque na produção de bovinos de corte, como os antibióticos (ionóforos e não-ionóforos), óleos essenciais, aditivos microbianos (bactérias, leveduras e probióticos), minerais orgânicos e tamponantes. Dentre esses, a classe de aditivo mais utilizado na produção de bovinos é a dos antibióticos, a qual se destaca em discussões voltadas ao seu uso como promotor de crescimento (Santos, 2016).

3.4 Salinomicina

Produzida por meio da fermentação de *Streptomyces albus*, a salinomicina é um antibiótico ionóforo poliéster (Zinn, 1986). Por meio da membrana celular a bomba iônica é o mecanismo que regula o balanço químico entre o meio interno e o externo de uma célula.

Ao se ligar a um cátion de afinidade (Rb^+ , $Na^+ > K^+ > Cs^+ > Sr^{++} > Ca^{++}$, Mg^{++}), a salinomicina transporta-o para dentro da bactéria gram-positiva, utilizando a sua

energia para manter o equilíbrio. No entanto, a bomba iônica não funciona de forma eficiente, pois há uma maior concentração iônica dentro da célula. Todo esse processo, causa um aumento na pressão osmótica, levando ao rompimento celular (Barragry, 1994; Viegas, 2019). Com isso, ocorre uma modificação na população microbiana, inibindo as bactérias gram-positivas, que produzem ácido acético, butírico e láctico, e favorecem as bactérias gram-negativas, que são produtoras de ácido propiônico. Os efeitos da ação desses aditivos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da inclusão de salinomicina na dieta de ruminantes.

Referências*	Tratamento	Dieta	Resultados
Garcia (2014)	Salinomicina (bovinos)	Forragem (<i>Brachiaria decumbens</i>)	↓ Consumo de suplemento ↑ GP
Abal (2016)	Salinomicina (bovinos)	Forragem (<i>Brachiaria decumbens</i>)	↓ Consumo de suplemento; > retorno econômico
Ferreira <i>et al.</i> (2019)	Salinomicina (bovinos)	Forragem (capim-Massai)	↓ Consumo de suplemento ↑ GMD

Fonte: Tabela Adaptada, autoria*
GP-Ganho de peso; GMD-Ganho médio diário.

3.5 Monensina

Conhecida por ser um antibiótico poliéster ionóforo, a monensina é produto da fermentação de *Streptomyces cinnamonensis*. A monensina pode ser tóxica para as bactérias, principalmente as gram-positivas, impedindo a entrada de nutrientes por meio das suas membranas (Berchielli & Bertipaglia, 2010).

A monensina possui forte ação no ambiente ruminal, ela é responsável por desorganizar o transporte de íons, provocando a morte ou fazendo com que o crescimento microbiano seja inibido. Isso ocorre devido à alta afinidade que a monensina tem pelo Na^+/H^+ ao invés de K^+/H^+ , no entanto, a concentração de K^+ é 25 vezes maior que Na^+ . Essa alta concentração de K^+ proporciona um acúmulo de H^+ , isso ocorre porque a maioria das células expulsam os prótons por meio de ATPase, para que o pH intracelular fique mais alcalino, levando a uma diminuição do pH intracelular (Russel, 1997). Essa ação proporciona efeitos benéficos ao desempenho dos animais (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da inclusão de monensina na dieta de ruminantes.

Referências*	Tratamento	Dieta	Resultados
Mourthe <i>et al.</i> (2011)	Monensina (bovinos)	Forragem (<i>Brachiaria decumbens</i>)	↓ Consumo de suplemento ↑ GP
Benetel (2014)	Monensina (<i>in vitro</i>)	Forragem (<i>Brachiaria decumbens</i>)	↓PG ↑ tempo de colonização das amostras
Dallantonia <i>et al.</i> (2023)	Monensina (bovinos)	Forragem (capim-Xaraés)	↑ <i>R. flavofaciens</i> ; pH ↓ <i>F. succinogenes</i> total e <i>S. ruminantium</i> ; N-NH ₃

Fonte: Tabela Adaptada, autoria*

GP-Ganho de peso; PG-Produção de gases; N-NH₃- Nitrogênio amoniacal.

3.6 Lasalocida

A lasalocida é oriunda da fermentação de *Streptomyces lasaliensis* (Pressman, 1976), classificada como sendo um ionóforo poliéster bivalente, possui afinidade com cátions monovalentes (Cs¹⁺, K¹⁺, Na¹⁺, Li¹⁺) e com cátions bivalentes (Ba²⁺, Sr²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺).

Sua ação é sobre a regulação do balanço químico entre o meio interno e externo das bactérias gram-positivas, atuam diretamente na bomba iônica presente na parede celular dessas bactérias. A lasalocida se liga a um cátion de maior afinidade, levando-o para dentro da bactéria. A bactéria, na tentativa de manter a sua osmolaridade, utiliza toda a sua reserva energética. Esse mecanismo de ação proporciona uma queda no crescimento de bactérias gram-positivas e deixa o ambiente ruminal favorável ao crescimento das bactérias gram-negativas (Bergen & Bates, 1984). Sendo assim, a mudança da população bacteriana é o principal mecanismo de ação do ionóforo lasalocida, que resulta em uma maior eficiência alimentar em ruminantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da inclusão de lasalocida na dieta de ruminantes.

Referências*	Tratamento	Dieta	Resultados
Mourthe <i>et al.</i> (2011)	Lasalocida (bovinos)	Forragem (<i>Brachiaria decumbens</i>)	↑ GP, consumo, GMD
Almeida (2016)	Lasalocida (bovinos)	Forrageira (capim-Marandu)	Não houve modificações nos parâmetros analisados (consumo, digestibilidade, N-NH ₃ e AGV)
Sartori (2017)	Lasalocida (bovinos)	Forrageiras (5 espécies de <i>Panicum</i> ssp.)	↑ GP e ECC

Fonte: Tabela Adaptada, autoria*

GP-Ganho de peso; GMD-Ganho médio diário; N-NH₃- Nitrogênio amoniacal; AGV- Ácidos graxos voláteis; ECC-Escore de condição corporal.

3.7 Virginiamicina

A virginiamicina é um antibiótico não ionóforo, sendo produto de fermentação de *Streptomyces virginiae*, o qual possui propriedades antimicrobianas em bactérias gram-positivas responsáveis por produzir ácido láctico (Nagaraja *et al.*, 1987). A virginiamicina é composta por dois peptídeos denominados de fator M (C₂₈H₃₅N₃O₇) e S (C₄₃H₄₉N₇O₁₀), que, em conjunto, possuem efeito sinérgico em uma razão de 4:1 (Fonseca *et al.*, 2014). De forma individual esses fatores têm efeito sobre as bactérias, porém quando combinados, a sua atividade possui uma maior potencialização (Phibro, 2008).

A ação principal da virginiamicina é sobre as bactérias gram-positivas, sendo elas aeróbicas ou anaeróbicas. Ao entrar na parede celular das bactérias gram-positivas, a virginiamicina, em sinergia do efeito M:S se liga de forma irreversível a subunidade dos ribossomos, impedindo a criação de ligações peptídicas no decorrer da síntese proteica bacteriana. Sendo assim, rompendo todos os processos metabólicos no interior da célula, ocasionando a diminuição do crescimento ou a morte da célula bacteriana (Cocito, 1979). Por ter essa capacidade de alterar a população bacteriana que constitui o rúmen, a virginiamicina proporciona estabilidade na fermentação ruminal, apresentando efeitos no aumento de ganho de peso e melhorando a eficiência alimentar (Tabela 4), efeitos baseados na redução da relação acetato:propionato (Santos, 2016).

Tabela 4 - Resultados da inclusão de virginiamicina na dieta de ruminantes.

Referências*	Tratamento	Dieta	Resultados
Costa <i>et al.</i> (2018)	Virginiamicina (bovinos)	Forragem (capim-Marandu)	↑ GMD; PC, ácidos graxos não esterificados plasmáticos; [sérica de Ca]; protozoários totais
Ferreira <i>et al.</i> (2019)	Virginiamicina (bovinos)	Forragem (capim-Massai)	↑ GMD ↓ Consumo de suplemento
Dallantonia <i>et al.</i> (2023)	Monensina (bovinos)	Forragem (capim-Xaraés)	↑[AGVT]; pH; <i>R. flavefaciens</i> ↓N-NH ₃ ; <i>F. succinogenes</i> total e <i>S. ruminantium</i>

Fonte: Tabela Adaptada, autoria*

GMD-Ganho médio diário; PC-Peso corporal; Ca-Cálcio; AGVT-Ácidos graxos voláteis totais; N-NH₃- Nitrogênio amoniacal.

3.9 Enzimas exógenas sobre a fermentação ruminal

Na área de nutrição, os maiores esforços estão em aumentar os índices zootécnicos e otimizar os custos da formulação, melhorar os aspectos nutricionais dos alimentos administrados e disponibilizados nas dietas. Dentre as estratégias biotecnológicas, a adição de enzimas é uma ferramenta que tem apresentado alta resposta zootécnica e econômica com aumento da produção animal (Fraatz *et al.*, 2014).

Para que a celulose e a hemicelulose sejam degradadas completamente, necessita-se de um complexo conjunto de enzimas, as quais são responsáveis por efetuar a quebra das ligações β -1,4, ocasionando a liberação dos monossacarídeos. Diferentes sistemas enzimáticos são necessários para que ocorra a hidrólise da celulose e da hemicelulose individualmente, esses sistemas são chamados de celulolíticos e hemicelulolítico (Gupta *et al.*, 2016).

Na natureza, as enzimas que hidrolisam os complexos celulolíticos atuam em conjunto para que possa acontecer a hidrólise completa. De acordo com Lynd *et al.* (2002) essas enzimas são classificadas conforme a sua atuação no substrato, sendo a Endoglucanase (EnG), a qual possui a responsabilidade de iniciar a quebra das ligações internas das fibras, fazendo com que seja liberado inúmeros oligossacarídeos; a Exoglucanase (ExG) que é a responsável por hidrolisar a parte primária das fibras agindo sobre a parte externa da celulose; e as β -glicosidases

(BG), as quais clivam oligossacarídeos e celobiose, que são solúveis, em glicose (Lynd *et al.*, 2002).

Essas enzimas quando em sinergia, demonstram um aumento nas suas atividades, melhor do que quando atuam de maneira individual. A atuação em sinergia ocorre de três maneiras (Castro & Pereira, 2010):

- As EnG-ExG quando em sinergia, atuam sobre as regiões amorfas das fibras celulósicas, essa ação potencializa a receptividade de terminais não redutores e redutores, para que haja acesso da celobio-hidrolase I (CBH) e CBH II;

- As ExG-ExG (CBH I e CBH II), ao ficarem em sinergia simultaneamente, atuam sobre a hidrólise dos terminais não redutores e redutores que são disponibilizados pela ação da EnG;

- Através da sinergia entre as ExG-BG e EnG-BG, que ocorre por meio da hidrólise e os produtos liberados das ExG e EnG;

- Por meio da sinergia entre ExG-BG e EnG-BG, após hidrólise de ExG e EnG os produtos liberados por essas enzimas são celobiose e oligossacarídeos, os quais são substratos para a enzima BG.

As xilanas, que são o principal constituinte das hemiceluloses, e as glucomananas são as hemiceluloses mais importantes, elas necessitam de um complexo conjunto de enzimas para que ocorra a degradação dos diferentes grupos de moléculas laterais da hemicelulose (Gírio *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2016). A degradação completa da hemicelulose requer a ação de duas enzimas que compõem o sistema xilanolítico, as quais atuam nas ligações β -1,4 glicosídicas das xilanas. As xilanases quebram em diferentes graus de polímeros as ligações de xilanas até oligossacarídeos. Enquanto os xilo-oligossacarídeos e xilobiose são quebrados pelas β -xilosidases (Gírio *et al.*, 2010; Van Dyk & Pletscheke, 2012; Sakita, 2018).

Para que ocorra a degradação da lignina necessita-se de um sistema enzimático característico, sendo interessante evidenciar que a lignina em condições anaeróbicas não sofre degradação. A interação que ocorre entre a lignina, os polímeros de celulose e hemicelulose dificulta a ação dos microrganismos, evitando a clivagem pelas enzimas (Sakita, 2018). Diante disso, a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas pode potencializar a ação dos microrganismos ruminais e suas enzimas, proporcionando uma maior disponibilidade dos monossacarídeos para serem fermentados, ou minimizando a polimerização dos polissacarídeos e,

umentando a ação dos microrganismos com o substrato (Díaz *et al.*, 2015; Elghandour *et al.*, 2016).

Os microrganismos presentes no rúmen, degradam cereais e forrageiras. Esses microrganismos sintetizam uma série de enzimas que atuam na degradação da parede celular das fibras: celulases, xilanases, amilase e lipases são exemplos dessas enzimas. Estas macromoléculas biológicas são altamente específicas para os substratos e na célula dirigem todos os eventos metabólicos. Na nutrição animal, as enzimas que são adicionadas nas rações durante uma pré-hidrólise ou atuantes no trato digestivo são denominadas exógenas. Já as enzimas produzidas no trato digestivo no animal são denominadas endógenas (Son & Ravindran, 2011). O uso de enzimas exógenas que atuam na degradação das fibras pode potencializar a taxa de digestão de forrageiras utilizadas nas dietas de ruminantes.

Em dietas de ruminantes, a adição de enzimas exógenas atua como um modulador de fermentação ruminal e, trabalhando de forma sinérgica com as enzimas endógenas, contribuem com o aumento da digestibilidade dos nutrientes (Pimentel *et al.*, 2022). Quando se ligam ao seu substrato específico, a enzima desenvolve estabilidade devido ao complexo enzima-substrato, modulando a ação das proteases, fazendo com que haja um aumento do tempo da enzima no rúmen. A solubilização das enzimas no ambiente ruminal é resultado da não formação do complexo enzima-substrato (Meale *et al.*, 2014).

Para que a enzima exógena desenvolva uma ótima atividade, ela deve suportar as condições fisiológicas do rúmen, a proteólise por meio das proteases e o antagonismo das próprias enzimas endógenas (Thorpe & Beal, 2001). O tempo de permanência dessas enzimas no rúmen, sem sofrer degradação, é determinante para sua efetividade, pois quanto maior sua estabilidade, maior o tempo disponível para catalisar a degradação das fibras, amidos e outros componentes presentes na dieta (Adesogan *et al.*, 2014).

Além disso, fatores como a rápida taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal e distúrbios fermentativos como por exemplo, a acidose ruminal, podem reduzir ainda mais o tempo de ação dessas enzimas sobre os substratos (Beauchemin *et al.*, 2003; Kung *et al.*, 2000). Por isso, estratégias tecnológicas têm sido estudadas para melhorar a eficácia das enzimas exógenas como: proteção contra proteólise por meio de encapsulamento ou formulações especiais; pré-aplicação nas forragens para favorecer a ligação da enzima ao substrato antes da

ingestão, aumentando sua resistência à degradação no rúmen; seleção de cepas microbianas que produzam enzimas com maior tolerância a variações de pH ou maior especificidade de ligação à parede celular vegetal (Beauchemin *et al.*, 2004).

Essas práticas visam garantir que as enzimas cheguem ativas ao local de ação e atuem por tempo suficiente para promover maior degradação dos nutrientes potencialmente digestíveis, melhorando assim a eficiência alimentar dos ruminantes.

Diante dessa abordagem e dos problemas enfrentados com a dificuldade de disponibilidade de nutrientes por forragens de baixa qualidade, o uso de enzimas exógenas vem sendo aplicado em estudos que buscam avaliar diferentes formas de disponibilidade e qualidade de fibra (Kondratovich *et al.*, 2019).

Ao avaliarem a inclusão de xilanase com diferentes níveis na fermentação *in vitro* de forragens, Ele *et al.* (2014) observaram que não houve interação entre as doses, mas o aumento da dose proporcionou um aumento linear na produção de gases, na degradabilidade da matéria seca e na degradabilidade de FDN em três tipos de forragens em 24h, resultando também em um aumento linear na proporção de acetato às 24h e de ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal em 48h.

Ao avaliarem a inclusão de xilanase e um *blend* enzimático composto por xilanase, celulase e glucanase sobre a degradação *in situ* da matéria seca e da fibra de feno de alfafa, capim-braquiária, cana-de-açúcar, capim-Mombaça e silagem de milho, Antonio *et al.* (2018) observaram que a xilanase aumentou a degradação da fibra em detergente ácido, quando comparado ao controle. Também houve um aumento na degradabilidade da matéria seca e da fibra detergente neutro, quando adicionado o *blend*, em relação ao controle e a xilanase sozinha.

Após conduzir um estudo com o intuito de avaliar diferentes níveis de celulase e xilanase na fermentação *in vitro*, Selzer *et al.* (2021) relataram que a inclusão de 100% de celulase ao feno de Smutsfinger aumentou a degradabilidade do FDN e a produção de gases quando comparado com a inclusão de 100% de xilanase. As duas enzimas com níveis de 100% reduziram o pH final da fermentação *in vitro*.

Em um estudo realizado por Bontà *et al.* (2024), foi observado que a inclusão de celulase e xilanase na fermentação *in vitro* proporcionou um aumento de 5% no FDNd em consideração aos tipos de forragem utilizadas como substrato, essa atividade também proporcionou um aumento significativo na produção dos gases. Os autores relatam que essa atividade está ligada ao tipo de alimento e o seu teor de lignina.

3.10 Minerais com potencial de modificação da ruminal

Os carboidratos e as proteínas são os principais componentes em dietas de bovinos. No entanto, para os microrganismos ruminais e para os bovinos outros nutrientes, além destes são necessários, tais como as vitaminas, os lipídeos e os minerais. Os minerais são divididos em macrominerais, os quais são fornecidos em quantidades maiores que 100 mg/kg e microminerais, fornecidos em quantidades menores que 100 mg/kg da dieta (Harvey *et al.*, 2021). O seu fornecimento deve ser definido pelas exigências nutricionais conforme a categoria do animal. A ausência do consumo de minerais pode ocasionar problemas reprodutivos e afetar a saúde do animal (Pires, 2010). A literatura considera apenas 8 microminerais essenciais aos ruminantes, sendo eles: cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), iodo (I), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) (Arthington & Ranches, 2021).

Os microminerais são importantes e essenciais na nutrição de bovinos em pasto, eles estão presentes nas forrageiras, onde a sua concentração pode ser alterada conforme a espécie forrageira, maturidade da planta, época do ano, condições e fertilidade do solo. Diante desses fatores que variam as concentrações dos minerais nas plantas, a exigência nutricional dos animais pode não ser atendida (Ribeiro *et al.*, 2019; Nascimento, 2023). Nas regiões tropicais, principalmente em determinadas épocas do ano, as forrageiras apresentam baixas concentrações de minerais, agravando ainda mais a situação (Ribeiro *et al.*, 2019).

Minerais na forma inorgânica, como carbonatos, cloretos, óxidos e sulfatos, são mais baratos e disponíveis, sendo os mais utilizados pela indústria. No entanto, eles precisam ser convertidos em formas orgânicas para serem absorvidos pelo organismo animal, porém possuem menor disponibilidade e estabilidade no organismo (Arthington & Ranches, 2021; Spears, 1996). Por outro lado, os minerais na forma orgânica ou quelatados são ligados a compostos orgânicos, sendo de melhor absorção. Por não possuírem carga elétrica, não interagem negativamente com outros componentes da dieta e são facilmente absorvidos, sendo mais eficaz biologicamente (Spears, 1996).

Diante disso, tem sido muito investigado o uso de aditivos alimentares à base de macro e microminerais na forma orgânica com a finalidade de otimizar a fermentação ruminal, proporcionando impacto direto na eficiência dos sistemas de produção. Segundo Swain *et al.* (2016), alguns minerais apresentam efeitos de

promotores de crescimento e antibacterianos, ou seja, podem alterar a fermentação ruminal de forma benéfica quando adicionados à alimentação dos animais.

Para os ruminantes, o cobre (Cu) é primordial, devido a sua participação na síntese da cianocobalamina (vitamina B12). Os microrganismos ruminais a sintetizam, fazendo com que ela atue em uma série de enzimas, trabalhando na transferência de síntese de proteínas, gliconeogênese, no metabolismo de gorduras e carboidratos, auxiliando na integridade do sistema nervoso central, como precursor de células sanguíneas, nas biossínteses de pirimidinas e purinas, no transporte de ferro e na proteção contra agentes oxidantes (Goff, 2018). Segundo Engle *et al.* (2000) o Cu possui elevado potencial de redução e, no rúmen, pode atuar reduzindo equivalentes redutores como NADPH e NADH, influenciando no processo de biohidrogenação microbiana dos ácidos graxos insaturados.

A recomendação do Cu em dietas de bovinos é na faixa de 10 mg/kg de MS, isso em casos em que a dieta não ultrapasse os 0,25% de S e 2 mg/kg de Mo. Diante disso, pode ocorrer uma variação no fornecimento de Cu, principalmente em bovinos confinados, em razão das dietas ricas em concentrado apresentarem maior concentração de Cu (Nasem, 2016). Ao avaliarem a suplementação de Cu com dois níveis diferentes 10 e 40 mg/kg de MS de fontes inorgânicas e orgânicas sobre a fermentação ruminal, Correa, (2010) observou que o pH ruminal, os ácidos graxos voláteis e o nitrogênio amoniacal não foram influenciados pelos tratamentos.

Para os microrganismos ruminais o manganês (Mn) é indispensável, atuando na síntese de ácidos graxo e colesterol, na fosforilação oxidativas, no metabolismo de carboidratos e formação de tecido ósseo, no sistema imune e reprodutivo, na integridade celular e no sistema nervoso. Dentro da mitocôndria ele pode ser encontrado em concentrações maiores, o qual está ligado ao desenvolvimento da superóxido dismutase (Goff, 2018), além de estar envolvido em diversos sistemas enzimáticos junto com o Zn e o Cu (Overton & Yasui, 2014).

A exigência de Mn para bovinos é estimada em 20 mg/kg de MS em animais na fase de crescimento e terminação. Em animais em fase de reprodução a exigência chega a 40 mg/kg de MS. Níveis elevados de ferro (Fe), cálcio (Ca) e fósforo (P) nas dietas, podem prejudicar a absorção de Mn, minimizando a sua biodisponibilidade e aumentando a sua excreção fecal (Suttle, 2010; Nasem, 2016).

O selênio (Se) faz parte de diversas selenoproteínas, tais como, iodotironina deiodenase, glutatona peroxidase e tioredoxina redutase, as quais são encontradas

frequentemente no tecido muscular, ósseo, nos testículos e no plasma, onde são responsáveis por processos antioxidantes, transporte, armazenamento, entre outros (Goff, 2018; Suttle, 2010).

A primeira selenoproteína encontrada foi a glutatona peroxidase, atualmente outras quatro são conhecidas. Ela age sobre o processo de regulação oxidativo e na proteção da membrana celular contra os radicais livres presentes no metabolismo (Hefnawy & Tortora-Perez, 2010; Bento & Franco, 2021). Outro grupo de selenoproteínas de importância é o da iodotironina 5-deiodinase tipos I, II e III, elas são essenciais para que ocorra a conversão do hormônio tireoideano T4 na forma ativa T3, dessa forma influenciando diversos processos fisiológicos (Hefnawy & Tortora-Perez, 2010; Chauhan *et al.*, 2014).

A exigência nutricional de Se em bovinos é fixa para todas as categorias, sendo 0,1 mg/kg de MS, onde 2 mg/kg de MS é o limite de ingestão, níveis acima apresentam toxicidade aos animais (Nasem, 2016). Em um estudo conduzido por Del Claro *et al.* (2013), bovinos receberam suplementação de 1) Se – 2 mg/kg de MS na forma de selenito de sódio; 2) Cu – 40mg/kg de MS em forma de sulfato de Cu e 3) Se/Cu – 2 mg/kg e 40 mg/kg de MS. Os animais apresentaram um aumento no ganho de peso com a suplementação de Se. Entre os tratamentos não foram encontrados resultados significativos para ácido propiônico e butírico.

O zinco (Zn) está presente na maioria das enzimas pertencentes às vias metabólicas, absorção de lipídeos, síntese proteica, além de ser importante para que ocorra o desenvolvimento do sistema fisiológico dos mamíferos. O papel deste elemento relacionado com mais de 300 enzimas, sendo uma delas a superóxido dismutase Cu-Zn e a metalotioneína. Sua ação está relacionada à produção de hormônios, crescimento, controle de apetite e imunidade (Overton & Yasui, 2014; Goff, 2018). A exigência nutricional Zn em dietas de bovinos é de 40 mg/kg de MS dependendo da categoria do animal (NRC, 2016). Elevados níveis de Ca, Cu e Se na dieta, podem reduzir a absorção do Zn. Situações em que a concentração de Zn é elevada, podem acarretar o processo de antagonismo dos mesmos minerais citados anteriormente, principalmente do Cu (NASEM, 2016).

Um estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho de crescimento, incidência de diarreia, teores de micronutrientes nas fezes e no soro, indicadores antioxidantes e as concentrações de enzimas e proteínas-chave envolvidas no metabolismo do zinco em bezerros leiteiros, através da

suplementação de diferentes níveis de óxido ZnO), 20, 40, 80 e 120 mg/d de MS. Wei *et al.* (2019) observaram que os diferentes níveis de ZnO não influenciaram o desempenho de crescimento ou a incidência de diarreia. Houve um aumento linear de Zn e Fe fecais conforme a quantidade de ZnO suplementada. Os níveis 40 e 120 mg/d apresentaram uma maior excreção de Zn, e Fe foi mais excretado com 120 mg/d. Os diferentes níveis não afetaram as concentrações séricas dos micronutrientes. As doses apresentaram um aumento linear nas concentrações de metalotioneína e superóxido dismutase e aumentaram quadraticamente a concentração de fosfatase alcalina, mas reduziram linearmente a malondialdeído no soro.

Apesar da importância da suplementação dos microminerais, como cobre, manganês e zinco, poucos estudos abordam seus efeitos sobre a cinética de fermentação ruminal. Essa lacuna na literatura realça a necessidade de apurar de forma mais profunda, já que o entendimento da atuação desses microminerais nos parâmetros fermentativos do rúmen podem contribuir significativamente para o entender a sua influência nas atividades microbianas.

3.11 Nanominerais

Outra ferramenta tecnológica que pode ser utilizada para melhorar o processo de fermentação ruminal é a nanotecnologia. O uso de aditivos alimentares na forma de nanopartículas nas dietas bovinas tem sido investigado nos últimos anos como uma alternativa viável para otimizar a fermentação ruminal, causando impacto direto na eficiência dos sistemas de produção.

As nanopartículas (10^{-9} m) apresentam propriedades únicas, como maior área superficial específica, alta atividade superficial e eficiência catalítica e maior capacidade de absorção quando comparadas com micropartículas, que apresentam diâmetro bem maior (10^{-6} m) (Rajendran *et al.*, 2013). Elas são estáveis mesmo sob alta temperatura e pressão e podem ser facilmente transportadas, absorvidas pelo trato gastrointestinal e utilizadas pelos animais (Swain *et al.*, 2016). Geralmente, os nanominerais apresentam efeitos significativos mesmo em doses mais baixas do que aquelas recomendadas pelos fabricantes para o uso de fontes minerais convencionais.

A biodisponibilidade que os nanominerais exibem é alta, devido a interação da superfície com o volume, isso também se deve ao seu alto potencial catalítico e sua

alta absorção. Por conta da biodisponibilidade, as nanopartículas compostas por minerais traços, podem ser administradas em menor dose, comparadas aos minerais convencionais presentes no mercado. Diante disso, a administração de minerais na forma nanométrica pode reduzir a excreção destes minerais pelos animais e a contaminação do meio ambiente (Swain *et al.*, 2016; Raje *et al.*, 2018).

Trabalhos mostram que o uso de nanominerais, como nano-selênio (nano-Se), nano-cromo (nano-Cr₂O₃) ou nano-zinco (nano-ZnO), além de apresentarem melhores resultados quando comparados com os sais inorgânicos e quelatos desses elementos, pode melhorar os parâmetros de produção animal, a saúde dos rebanhos e a qualidade dos produtos (Konkol & Wojnarowski, 2018). Essas vantagens estão relacionadas com a maior interação das nanopartículas com outras substâncias orgânicas e inorgânicas devido à maior área superficial de contato.

Ao avaliarem a adição de nanopartículas de óxido de Zinco (ZnO) sobre fontes de proteína animal (farinha de vísceras de aves) e vegetal (farelo de soja) na fermentação ruminal *in vitro*, Chanzanagh *et al.* (2018) não observaram nas fontes avaliadas efeitos significativos na produção de gases *in vitro*.

No entanto Sarker *et al.* (2018), utilizando fluido ruminal de novilhos alimentados com dois tipos de dieta (alfafa e silagem de milho), mostraram que a suplementação com altos níveis de nano-ZnO (500 e 1000 µg/g) diminuiu a concentração de CH₄ produzido na fermentação *in vitro* em comparação com o tratamento sem suplementação.

Em ovelhas, Riazi *et al.* (2019) também estudaram *in vitro* os efeitos do nano-ZnO na fermentação ruminal. Os tratamentos foram dieta controle e dietas contendo 20, 40 ou 60 µg de Zn suplementar (como ZnO ou nano-ZnO) por g de matéria seca (MS). A suplementação de 20 µg de nano-ZnO diminuiu a produção de CH₄ e a quantidade de protozoários; melhorou os parâmetros de capacidade antioxidante total, produção de biomassa microbiana, digestibilidade e substrato verdadeiramente degradado. As dietas contendo 40 e 60 µg de Zn suplementar, como nano-ZnO ou ZnO, não apresentaram vantagem.

Em um estudo conduzido por Abdollahi *et al.* (2019) onde foram avaliadas a inclusão de nanopartículas de ZnO e micropartículas de ZnO em dietas de bezerros, os autores observaram que na fase de pré-desmama de 7 a 70 dias, houve um ganho médio diário maior nos bezerros que foram alimentados com a dieta que continha nano-ZnO.

3.12 Forrageiras tropicais utilizadas no Brasil

Os gêneros de forrageiras tropicais que se destacam no Brasil são as *Brachiaria* spp. e *Panicum* spp. pela sua alta produção e adaptação a diversos ambientes tropicais. Por possuir uma ótima adaptação aos tipos de solo e as condições climáticas, faz com que as braquiárias sejam uma das mais utilizadas no Brasil (Pedreira *et al.*, 2017). Em 1984, foi lançada a cultivar Marandu com características de maior produção e resistência às cigarrinhas-das-pastagens, para substituir a *B. decumbens*. O capim-Marandu tem uma média a alta exigência por solos férteis, seu crescimento é cespitoso, podendo formar touceiras vigorosas. Suas características não são recomendadas para regiões que sofrem por alagamentos constantes (Barbero *et al.*, 2021).

Por apresentar um bom valor nutritivo e possuir alta produtividade, o gênero *Panicum* ssp. se destaca entre as forrageiras tropicais, as cultivares mais utilizadas são Tanzânia, Mombaça e Massai. Essas cultivares contribuem de forma significativa para a pecuária nacional, ocupando cerca de 30 milhões de hectares (Valle, 2009). No entanto, forrageiras do gênero possuem uma maior exigência de fertilidade quando comparadas ao gênero *Brachiaria* ssp. (Werner, 1996).

Quando comparadas com gramíneas temperadas e leguminosas, as gramíneas tropicais normalmente possuem menor valor nutritivo, porém sua produção de massa é maior devido a sua eficiência em fixação de carbono, uso do nitrogênio e aproveitamento de água (Sollenberger *et al.*, 2020; Delevatti *et al.*, 2019).

As mudanças de estação entre primavera/verão (época das águas) e outono/inverno (época da seca) faz com que o acúmulo da massa de forragem sofra variações. Devido as variações ao longo do ano, a capacidade de suporte da pastagem é maior em períodos chuvosos, onde o acúmulo de massa pode atingir 80%, ocasionando uma maior taxa de lotação (Barbero *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2007). No entanto, o contrário acontece no período da seca, onde a adoção de estratégias é necessária para suprir a demanda da massa de forragem pelos animais (Barbeiro *et al.*, 2021). Nesse contexto, a forragem reduz sua produção de massa, impactando diretamente na produção animal (Pires, 2010).

Diversos fatores como a espécie e cultivar, pastejo intenso, tipos de sistemas de integração, consórcios, adubação nitrogenada, diferentes condições climáticas

que ocorrem durante o ano e sombreamento podem modificar a composição química das forrageiras (Dias *et al.*, 2021; Delevatti *et al.*, 2019; Barbero *et al.*, 2021). Devido as alterações na produtividade das forrageiras, sua composição bromatológica se modifica. Em períodos de maior disponibilidade de nutrientes, as forrageiras apresentam maior qualidade, menor agrupamento de fibra na parede celular vegetal e uma melhor relação entre colmos e folhas (Da Silva *et al.*, 2013).

3.13 Degradação ruminal de forrageiras tropicais

A criação de bovinos em pasto é predominante no Brasil, onde estima-se que cerca de 95% da criação seja em regime de pastagem, tornando-se uma produção de baixo custo quando comprada ao mercado internacional (Sampaio *et al.*, 2017). Mesmo com o alto potencial em degradar carboidratos fibrosos, os ruminantes apresentam dificuldades na digestão completa das forrageiras tropicais, principalmente no período da seca (Martins *et al.*, 2007).

Durante o período seco essas dificuldades aumentam em decorrência da baixa oferta e qualidade de forragens (Nascimento, 2023), ocasionando uma redução na digestibilidade, na taxa de passagem, no consumo da matéria seca e na produção de ácidos graxos voláteis, essas reduções possuem impacto direto no metabolismo energético do animal. Diante disso, estratégias nutricionais são necessárias para suprir as limitações da dieta com pastagem (Koscheck *et al.*, 2011).

Além disso, a incompleta degradação pode acontecer devido ao rápido fluxo de saída dos alimentos no rúmen, o que faz que o alimento fique menos tempo para que ocorra a sua completa degradação, pode ocorrer também por meio da dificuldade dos microrganismos e suas enzimas aderirem o alimento e pela baixa colonização dos microrganismos, o que proporciona uma menor quantidade de enzimas endógenas no ambiente ruminal (Beauchemin *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2018).

Os microrganismos presentes no rúmen são capazes de produzir enzimas que atuam nesses polissacarídeos presentes na parede celular das forrageiras, sendo assim, disponibilizado seus nutrientes. No entanto, a incompleta degradação desses polissacarídeos minimiza a produtividade animal, além de serem excretados em maior quantidade no ambiente (Beauchemin *et al.*, 2004).

Considerada uma estrutura complexa, a parede celular vegetal é constituída por celulose, hemicelulose, lignina, açúcares solúveis, proteínas e minerais. Essa estrutura é dividida em compostos solúveis e insolúveis. O composto celulose e hemicelulose são considerados os polissacarídeos mais abundantes da parede vegetal das plantas e em conjunto com a lignina constituem a porção insolúvel da planta (Van Soest, 1994).

A celulose, um polissacarídeo lignocelulósico, é conhecida por ser a principal constituinte das biomassas, sendo o mais abundante na natureza. À sua estrutura é ligada a lignina e a hemicelulose. A celulose é constituída por moléculas de glicose, que por sua vez unidas por ligações do tipo β -1,4 (Sánchez, 2009). A estrutura em cadeia linear da celulose possibilita a criação de ligações de hidrogênio entre estas, resultando na formação de microfibrilas. As microfibrilas possuem em média 36 cadeias de celulose unidas entre si, o que faz com que as microfibrilas seja cristalina e de baixa degradação (Van Dyk & Pletschike, 2012; Sun *et al.*, 2016). Entretanto, outras regiões apresentam características amorfas, sendo menos ordenadas e, mais fácil de serem degradadas (Van Dyk & Pletschike, 2012; Sun *et al.*, 2016).

Considerada o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, a hemicelulose é um polímero constituído por arabinose (pentose) e xilose, glicose (hexoses) e galactose, manose e ácidos urônicos, unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Gírio *et al.*, 2010; Sakita, 2018).

A lignina é um composto não polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal. Este composto é constituído por polímeros de fenilpropano, com três monômeros, sendo eles: álcool p-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Jorgensen, Kristensen, Felby, 2007; Sakita, 2018). Para que ocorra a degradação da lignina necessita-se de um sistema enzimático característico, sendo interessante evidenciar que a lignina em condições anaeróbicas não sofre degradação. A interação que ocorre entre a lignina, os polímeros de celulose e hemicelulose dificulta a ação dos microrganismos, evitando a clivagem pelas enzimas (Sakita, 2018).

Os teores de proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) são os principais componentes que influenciam no valor nutritivo da forragem. Forrageiras tropicais acima de 60% de matéria seca (MS) e com menos de 7% PB e elevado teor de FDN tendem a reduzir o consumo e a digestão. Diante disso, o crescimento

e a atividade dos microrganismos ficam limitados devido à falta de nitrogênio no ambiente ruminal (Mertens, 1997).

O manejo adequado do pasto e espécie forrageira, ajudam a limitar esses fatores relacionados à digestão das forrageiras. O uso de aditivos alimentares para aumentar a eficiência na digestibilidade é uma alternativa para suprir essas dificuldades encontradas, seu principal objetivo é melhorar a disponibilidade dos nutrientes para melhor aproveitamento do animal (Cabral *et al.*, 2011).

3.14 A técnica da digestibilidade *in vitro* por produção de gases

Visando replicar as condições do rúmen em laboratório, Tilley & Terry (1963) descrevem a metodologia da técnica de digestibilidade *in vitro*, sendo um dos pioneiros na aplicabilidade da técnica. Os autores descrevem a técnica sobre a incubações de tubos de digestibilidade contendo solução tampão, aspensão de CO₂, substrato e líquido ruminal de animais doadores (canulados), os quais devem ser mantidos em banho-maria sob agitação em temperatura constante de 39°C. O tempo estimado de incubação pode variar de acordo com o substrato estudado, podendo ser de 24 a 96 horas.

Diante de um entendimento mais detalhado sobre a cinética de degradação ruminal, a técnica da produção de gases, permite a avaliação *in vitro* da fermentação ruminal bem como inferências quantitativas e qualitativas dos processos de digestão ruminal (Menke *et al.*, 1979; Pell & Schofield, 1993; Theodorou *et al.*, 1993; Cone *et al.*, 1995). Basicamente, as amostras moídas são incubadas em garrafas hermeticamente fechadas, mantidas a 39 °C, com um meio anaeróbio, inoculado com líquido ruminal. Conforme a fermentação avança, a pressão dos gases acumulado no espaço superior dessas garrafas é mensurada. As curvas de produção de gases, isto é, curvas de pressão versus tempo de fermentação, são estabelecidas, à medida que os registros são feitos e os gases são liberados, a intervalos regulares, durante o tempo total de incubação.

Atualmente todas as técnicas têm em comum o uso de tampões, um agente redutor, macro e microminerais e a resazurina, que indica um potencial redox na solução. A aspensão de CO₂ nos frascos ajuda a garantir um menor potencial redox no instante do inóculo. Garantir um baixo potencial redox é muito importante, ainda mais quando o substrato analisado são forragens muito fibrosas ou ricas em amido (Leedle & Hespell, 1983; Williams, 2000).

Segundo Van Soest (1994), a técnica *in vitro* pode ser mais acurado, diante do fato de que os microrganismos e as enzimas presentes no líquido ruminal são extremamente sensíveis, afetando a taxa e a extensão da digestão, porém oferecem uma ampla replicação. Além disso, ele salienta que o sucesso da técnica varia em decorrência do grau de replicação dos eventos ruminais e da acurácia em relação as respostas biológicas.

Referências

- ABAL, R. T. **Desempenho de novilhos Nelore em pastagem suplementados com diferentes aditivos**. 2016. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, J.; FAZAELI, H.; Performance, rumen fermentation, blood minerals, leukocyte and antioxidant capacity of young Holstein calves receiving high-surface ZnO instead of common nano ZnO. **Arch. Anim. Nutr.**, 74, 189–205, 2019.
- ADESOGAN, A. T.; MA, Z. X.; ROMERO, J. J.; ARRIOLA, K. G. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, 92: 1317-1330, 2014.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598–1624, 2000.
- ALMEIDA, M.C. **Lasalocida sódica na suplementação de bovinos de corte em pastejo no período das águas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso. Sinop, MT, 2016.
- ANTONIO, G.; FILLA, G. M.; DEL VALLE, T. A.; CAMPANA, M.; MORAIS, J. P. G. Efeitos de enzimas fibrolíticas sobre a degradação *in situ* da matéria seca e da fibra de forrageiras. **Revista Agrarian**, v.11, n.42, p.363-370, 2018.
- ARTHINGTON, J. D.; RANCHES, J. Trace Mineral Nutrition of Grazing Beef Cattle. **Animals** 11:2767, 2021.
- ASMARE, B. Biotechnological Advances for Animal Nutrition and Feed Improvement. **World Journal of Agricultural Research**, 2(3), 115–118, 2014.
- BARBERO, R. P.; BARBOSA, M, A, A, F.; CASTRO, L. M.; RIBEIRO, E. L. A.; MIZUBUTI, I. Y.; BUMBIERIS JÚNIOR, V. H.; SILVA, L. D. F.; MASSARO JÚNIOR, F. L. Desempenho de novilhos de corte em pastos de capim-tanzânia sob quatro alturas de desfolha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 66(2):481-488, 2014.
- BARBERO, R. P.; RIBEIRO, A. C. C.; MOURA, A. M.; LONGHINI, V. Z.; MATTOS, T. F. A.; BARBERO, M. D. Potencial de produção de bovinos de corte em pastagens tropicais: revisão de literatura. **Ciência Animal Brasileiras**, V22, e-69609, 2021.
- BARRAGRY, T. B. **Growth-promoting agents**. **Veterinary Drug Therapyp**. v. 510, p. 597- 654. 1994.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 18, n. 14, p. E37-E47, Suppl. 2. 2003.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal os Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 13-22, 2004.

BENCHAAR, C.; HASSANT, F. Assessing the effects of high-carvacrol oregano oil on rumen microbial Fermentation, gas production, and methane production *in vitro*. **Canadian Journal of Animal Science**. December 2024.

BENETEL, G. **Efeitos da inclusão de monensina sódica em suplementos proteicos sobre desempenho, fermentação ruminal, degradabilidade de feno de *Brachiaria decumbens* e produção de metano em bovinos**. 2014, 103p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

BENTO, A. L. L.; FRANCO, G. L. Microminerais injetáveis para bovinos: uma revisão. **Boletim da Indústria Animal**, 2021.

BERCHIELLI, T. T.; BERTIPAGLIA, L. M. A. **Utilização de aditivos em dietas de bovinos de corte**. In: BOVINOCULTURA DE CORTE – VOL. I. p.295-330, FEALQ – São Paulo, 2010.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 616 p. 2011.

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

BEZERRA, F. V. S. **Influência da pecuária bovina na emissão dos principais gases do efeito estufa**. Trabalho de Conclusão de Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2019.

BONTÀ, V.; BATTELLI, M.; RAMA, E.; CASANOVA, M.; PASOTTI, L.; GALASSI, G.; COLOMBINI, S.; CALVIO, C. Um estudo *in vitro* sobre o papel das celulasas e xilanasas de *Bacillus subtilis* na nutrição de bovinos leiteiros. **Microrganismos**, 12, 300, 2024.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 0168–1605, p. 223–253, 2004.

BRAGA, G. J.; PEDREIRA, C. G. S.; HERLING, V. R.; LUZ, P. H. D. C. Eficiência de pastejo de capim-marandu submetido a diferentes ofertas de forragem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42:1641-1649, 2007.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA. Instrução Normativa nº 44, de 15 de Dezembro de 2015. Alteração da Instrução Normativa nº 13, de 2004 e Instruções Normativas nº 15 e 30 de 2009 e nº 29 de 2010. Diário Oficial da União. 17 Dez 2015. Sec.1, p.7.

BRUNES, L. C.; COUTO, V. R. M. Greenhouse gas balance in beef cattle production systems. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.254, p.287-299, 2017.

CABRAL, L. S.; TOLEDO, C. L. B.; RODRIGUES, D. N.; LIMA, L. R.; CABRAL, W. B.; NETO, I. M. S.; GALATI, R. L.; ANDRADE, K. M.; CENI, I.; CARVALHO, L. B.; ALVES, A. O. **Oportunidades e Entraves para a Pecuária de Corte Brasileira**. In: I SIMBOV. Ed.: Zervoudakis, J.T. *et al.*, Cuiabá, p.1-57, 2011.

- CASTELÁN-ORTEGA, O. A.; KU-VERA, J. C. AND ESTRADA FLORES, J.G. Modeling methane emissions and methane inventories for cattle production systems in Mexico. **Atmósfera**, v.27, p.185-191, 2014.
- CASTRO, A.; e PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, 33(1), 181-188, 2010.
- CASTRO, E. S. F.; ROMA JR. L. C.; EZEQUIEL, J. M. B.; SALLES, M. S. V.; ALMEIDA, M. T. C.; PEREZ, H. L.; SUGUINO, E.; CLEEF, E. H. C. B. V. Effect of thyme essential oil supplementation on feed intake, apparent digestibility, rumen Fermentation, blood parameters and *in vitro* methane yield of Nellore cattle. **Livestock Science**. Volume 244. February 2021.
- CHANZANAGH, E. G.; SEIFDAVATI, J.; GHESHLAGH, F. M. A.; BENAMAR, HÁ.; SHARIFI, R. S. Effect of ZnO nanoparticles on *in vitro* gas production of some animal and plant protein sources. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, 24 (1): 25-32, 2018.
- CHAUHAN, S. S.; CELI, P.; PONNAMPALAM, E. N.; LEURY, B. J.; LIU, F.; DUNSHEA, F. R. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: Role of vitamin E and selenium. **Anim. Prod. Sci.**, v. 54, p. 1525–1536, 2014.
- CHURCH, C.D. Feed additives and growth stimulator. In: CHURCH, C.D. **Digestive Physiology and Nutrition of ruminants**. Oregon: Department of Animal Science Oregon State University, v. 3, p. 77-91. 1972.
- COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin Family, inhibitors wich contain synergistic componentes. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 43, p. 145-198, 1979.
- CONE, J. W.; BEUVINK, J. A. M. W.; RODRIGUES, M. A. M. Use and applications of an automated time related gas production test for the *in vitro* study of fermentation kinetics in the rumen. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, n.1, p.25-36, 1995.
- CORREA, L. B. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídeos em bovinos**. 2010. 124p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- COSTA, J. P. R.; JESUS, R. B.; OLIVEIRA, I. M.; RESENDE, F. D.; SIQUEIRA, G. R.; MALHEIROS, E. B. Does virginiamycin supplementation affect the metabolism and performance of Nellore bulls grazing under low and high gain rates?. **Animal Science Journal**, 89: 1432-1441. 2018.
- COSTA, A. C. **Avaliação de um “blend” de óleos essenciais na fermentação *in vitro* de dietas a base de forragem e alto concentrado para ruminantes**. Dissertação. Cuiabá, Mato Grosso, 2022.
- DALLANTONIA, E. E.; SOLVA, L. G.; GRANJA-SALCEDO, Y. T.; MESSANA, J. D.; BRITO, L. F.; LIMA, A. R. C.; VITO, E. S.; CASTAGNINO, P. S.; SOBRINHO, A. G. S.; REIS, R. A.; BERCHIELLI, T. T. Association of additives in supplemented grazing cattle during the finishing phase at the rainy season. **Brazilian Journal os Animal Science**, 52:e20210225. 2023.

- DA SILVA, S. C.; GIMENES F. M. A.; SARMENTO, D. O. L.; SBRISSIA, A. F.; OLIVEIRA, D. E.; HERNADEZ-GARAY, A.; PIRES, D. A. V. Grazing behaviour, herbage intake and animal performance of beef cattle heifers on marandu palisade grass subjected to intensities of continuous stocking management. **Journal of Agricultural Science**. 151(5):727–739, 2013.
- DELEVATTI, L. M.; CARDOSO, A. S.; BARBERO, R.P.; LEITE, R. G.; ROMANZINI, E. P.; RUGGIERI, A. C.; REIS, R. A. Effect of nitrogen application rate on yield, forage quality, and animal performance in a tropical pasture. **Scientific reports**. 9(1):7596, 2019.
- DEL CLARO, G. R.; ZANETTI, M. A.; NETTO, S.; VILELA, F. G.; MELO, M. P.; CORREA, L. B.; FREITAS JR, J. E. Efeitos da suplementação de cobre e selênio na dieta de novilhos Brangus sobre o desempenho e fermentação ruminal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.1, p.255-261, 2013.
- DIAS, M. B. C.; COSTA, K. A. P.; SEVERIANO, E. C.; BILEGO, U. O.; VILELA, L.; SOUZA, W. F.; OLIVEIRA, I. P.; SILVA, A. C. G. Cattle performance with *Brachiaria* and *Panicum maximum* forages in an integrated crop-livestock system. **Journal of Range & Forage Science**. 1-14, 2021.
- DÍAZ, A.; RANILLA, M. J.; GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on Chemical composition and *in vitro* rumen Fermentation. **Journal of Animal Physiology and animal Nutrition**, Berlin, V. 99 n. 2, p. 345-55, 2015.
- ELE, Z. X.; ELE, M.L.; WALKER, N. D.; MCALLISTER, T. A.; YANG, W. Z. Use of fibrolytic enzyme in barley-based diets containing distillers' dried wheat grains with solubles: ruminal fermentation, digestibility and growth performance of confined steers. **J Anim Sci**, 92:3978–3987, 2014.
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; KHOLIF, A. E.; HERNÁNDEZ, J.; MARIEZCURRENA, M. D.; LÓPEZ, S.; CAMACHO, L. M.; MÁRQUEZ, O.; SALEM, A. Z. M. Influence the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal Fermentation of three feeds. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 61, n. 6, p. 262-272, 2016.
- ENGLE, T. E; SPEARS, J. W. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance and ruminal fermentation in finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2452-2458. 2000.
- FERREIRA, S. F.; FERNANDES, J. J. D. R.; PADUA, J. T.; BILEGO, U. O.; FREITAS NETO, M. D. D.; FURTADO, R. G. Use of virginiamycin and salinomycin in the diet of beef cattle reared under grazing during the rainy season: performance and ruminal metabolism. **Brazilian Animal Science**, v. 20, p. 1-10, 2019.
- FONSECA, M. P.; VIVENZA, P. A. D.; BORGES, A. C. C. Uso combinado de monensina e virginiamicina na dieta de bovinos em condição tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 24., 2014. **Anais. Vitória**, 2014.

FRAATZ, M. A.; RÜHL, M.; ZORN, H. Adv. **Biochem Eng Biotechnol**, 143:229-56 2014.

GARCIA, S. A. **Suplementação com diferentes aditivos para bovinos em pastagem no período das águas**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GOFF, J. P. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-based and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. **Journal of Dairy Science** 101:2763-2813, 2018.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, L-G.; BERLIN, A.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; FILHO, E. X. F.; EZEQUIEL, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainables and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HARVEY, K. M.; COOKE, R. F.; MARQUES, R. D. S. Supplementing Trace Minerals to Beef Cows during Gestation to Enhance Productive and Health Responses of the Offspring. **Animals** 11:1159-1174, 2021.

HEFNAWY, A. E. G.; TÓRTORA-PÉREZ, J. L. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 185-192, 2010.

HUWS, S. A.; CREEVEY, C. J.; OYAMA, L. B.; MIZRAHI, I.; DENMAN, S. E.; POPOVA, M.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; FORANO, E.; WATERS, S. M.; HESS, M.; TAPIO, I.; SMIDT, H.; KRIZSAN, S. J.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; BELANCHE, A.; GUAN, L.; GRUNINGER, R. J.; MCALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J.; ROEHE, R.; DEWHURST, R. J.; SNELLING, T. J.; WATSON, M.; SUEN, G.; HART, E. H.; SMITH, A. H. K.; SCOLLAN, N. D.; DO PRADO, R. M.; PILAU, E. J.; MANTOVANI, H. C.; ATTWOOD, G. T.; EDWARDS, J. E.; MCEWAN, N. R.; MORRISSON, S.; MAYORGA, O. L.; ELLIOT, C.; MORGAVI, D. P. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Front. Microbiol.**, v. 9, n. 2161, p. 1-33, 2018.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Hoboken, v. 1, n. 2, p 119-134, 2007.

KONDRATOVICH, L. B.; SARTURI, J. O.; HOFFMANN, C. A.; BALLOU, M. A.; TROJAN, S. J.; CAMPANILI, P. R. Effects of dietary exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation characteristics of beef steers fed high-and low-quality growing diets. **Journal of animal science** 97:3089-3102, 2019.

- KONKOL, D.; WOJNAROWSKI, K. The use of nanominerals in animal nutrition as a way to improve the composition and quality of animal products. **J. Chem.**, v. 2018, p. 1-7, 2018.
- KOSCHECK, J. F. W.; ZEVOUDAKIS, J. T.; CARVALHO, D. M. G.; CABRAL, L. S.; AMORIM, K. P.; SILVA, R. G. F.; SILVA, R. P. Suplementação de bovinos de corte em sistema de pastejo. **UNICIÊNCIAS**, 2011.
- KUNG JR., L.; TREACHER, R. J.; NAUMAN, G. A.; SMAGALA, A. M.; ENDRES, K. M.; COHEN, M. A. The effect of treating forage with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 83(6): 115–122, 2000.
- LEEDLE, J. A. Z. e HESPELL, R. B. Breves incubações de bactérias ruminais mistas: efeitos da anaerobiose e fontes de nitrogênio e carbono. **Journal of Dairy Science**, 66, 1003–1014, 1983.
- LYND, L.; WEIMER, P.; ZYL, W.; PRETORIUS, I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66, (3), 505 –577, 2010.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; LEMPP, B.; PAULA, M. C. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.
- MEALE, S. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HRISTOV, A. N.; CHAVES, A. V.; MCALLISTER, T. A. Revisão convidada pelo conselho: oportunidades e desafios no uso de enzimas exógenas para melhorar a produção de ruminantes. **J Anim Sci**. 92:427–442, 2014.
- MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; SLEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHENEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas productions when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v.93, n.1, p.217-222, 1979.
- MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1463-1481, 1997.
- MOURTHE, M. H. F.; REIS, R. B.; LADEIRA, M. M.; SOUZA, R. C.; COELHO, S. G.; SATURNINO, H. M. Suplemento múltiplo com ionóforo para novilhos em pasto: desempenho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63, 124—128, 2011.
- MOTA, M. F.; VILELA, D.; Santos, G. T.; ELYAS, A. C. W.; LOPES, F. C. F.; VERNEQUE, R. S.; PAIVA, P. C. A.; PINTO NETO, A. P. Parâmetros ruminais de vacas leiteiras mantidas em pastagem tropical. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 217- 224, 2010.
- MUÑOZ, C.; LATELIER, P. A.; UNGERFELD, E. M.; MORALES, J. M.; HUBE, S.; PÉREZ-PRIETO, L. A. Effects of pregrazing herbage mass in late spring on enteric

methane emissions, dry matter intake, and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7945–7955, 2016.

NAGARAJA, T.; TAYLOR, M. B.; HARMON, D. L.; BOYER, J. E. *In vitro* lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. **Journal of Animal Science**, v.65, n. 4, p.1064–1076, 1987.

NASCIMENTO, K. S. **Efeito da suplementação com diferentes fontes de microminerais em associação a enzimas fibrolíticas no desempenho produtivo de vacas nelore a pasto**. Tese (doutorado). Jaboticabal, São Paulo, 2023.

NASEM. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 8th revised edition. Washington, DC: **National Academy Press**, 2016.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. Ed. National Academy Press, Whashington, DC: USA, 2016.

NUSSIO, L. G; CAMPOS, F. P; LIMA, M. L. M. Metabolismos de carboidratos estruturais. IN: **Nutrição de ruminantes**. 2º Ed. Jaboticabal: SP, cap. 07, p.183-223. 2006.

OLIVEIRA, S; ADELSON, J.; NETO, S. Carboidratos fibrosos e não fibrosos na dieta de ruminantes e seus efeitos sobre a microbiota ruminal. **Veterinária Notícias**, v. 22, n. 5778/2, p. 1–18, 2016.

OVERTON, T. R.; YASUI, T. Practical applications of trace minerals for dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 416-426, 2014.

PEDREIRA, C. G. S.; SILVA, V. J.; PEDREIRA, B. C.; SOLLENBERGER, L. E. Herbage accumulation and organic reserves of palisade grass in response to grazing management based on canopy targets. **Crop Science**, 57(4):2283–2293, 2017.

PATRA, A.; PARK, T.; KIM, M.; YU, Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. **J. Anim. Sci. Biotechnol.**, v. 8, n. 13, p. 1-18, 2017.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.6, n.5, p.1063-1073, 1993.

PIMENTEL, P. R. S.; SANTOS BRANT, L. M.; OLIVEIRA LIMA, A. G. V.; COTRIM, D. C.; NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, R. L. How can nutritional additives modify ruminant nutrition?. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo**, 2022.

PIRES, A. V. **Bovinocultura de Corte**. Volume I. Piracicaba, São Paulo, 2010.

PHIBRO. Collection of works on virginiamycin and salomycin. **Animal Health Corporation**. São Paulo: (s. n.), 2008.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Reviews Further**, 1976.

- RAJE K, OJHA S, MISHRA A, MUNDE VK, RAWAT C, CHAUDHARY SK. Impact of supplementation of mineral nano particles on growth performance and health status of animals: a review. **J Entomol Zool Stud**. 6:1690–1694, 2018.
- RAJENDRAN, D.; THULASI, A.; JASH, S.; SELVARAJU, S. B. N. R. Synthesis and application of nano minerals in livestock industry. In: **Animal Nutrition and Reproductive Physiology** (Recent Concepts). Satish Serial Publishing House, Delhi. p. 517-530, 2013.
- RANGEL, A. H. N.; LEONEL, F. P.; ALVES, S. A.; DE MENDONÇA JÚNIOR, A. F. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 8, núm. 1, pp. 264-273 Universidade Estadual da Paraíba Paraíba, Brasil, 2008.
- RIAZI, H.; REZAEI, J.; ROUZBEHAN, Y. Effects of supplementary nano-ZnO on *in vitro* ruminal fermentation, methane release, antioxidants, and microbial biomass. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 43: 737-746 2019.
- RIBEIRO, D. M.; MOURATO, M. P.; ALMEIDA, A. M. Assessing mineral status in edible tissues of domestic and game animals: A review with a special emphasis in tropical regions. **Tropical animal health and production**, 51:1019-1032, 2019.
- RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. New York, p.139, 2002.
- RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of Ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 1989.
- RUSSEL, J. B. A. Proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, p 1519- 1525, 1997.
- SAKITA, G. Z. **Gas production, rumen fermentation and performance of lambs supplemented with fibrolytic enzymes**. 2018. 139 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2018.
- SAMPAIO, R. L.; RESENDE, F. D.; REIS, R. A.; OLIVEIRA, I. M.; CUSTÓDIO, L.; FERNANDES, R. M.; PAZDIORA, R. D.; SIQUEIRA, G. R. The nutritional interrelationship between the growing and finishing phases in crossbred cattle raised in a tropical system. **Tropical Animal Health and Production** 49:1015-1024, 2017.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.
- SANTOS, R. L. C. **Avaliação da monensina, da virginiamicina e do óleo funcional na suplementação da dieta de bovinos**. Dissertação de Mestrado. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 56p, 2016.
- SARKER, N. C.; KEOMANIVONG, F.; BORHAN, M.; RAHMAN, S.; SWANSON, K. *In vitro* evaluation of nano zinc oxide (nZnO) on mitigation of gaseous emissions. **Journal of Animal Science and Technology**, 60: 27, 2018.

SARTORI, E. D.; CANELLAS, L. C.; PEREIRA, G. R. Performance of beef heifers supplemented with lasalocid sodium. **Trop Anim Health Prod** 49, 273–279, 2017.

SCHÄREN, M.; DRONG, C.; KIRI, K.; RIEDE, S.; GARDENER, M.; MEYER, U.; HUMMEL, J.; URICH, T.; BREVES, G.; DÄNICKE, S. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2765–2783, 2017.

SELZER, K.; HASSEN, A.; AKANMU, A. M.; SALEM, A. Z. M. Digestibility and rumen fermentation of a high forage diet pre-treated with a mixture of cellulase and xylanase enzymes. **South African Journal of Animal Science**, 51 (No. 3) 2021.

SIPPERT, M. R. **Avaliação de óleos essenciais de laranja e cravo em rações de ruminantes utilizando sistemas *in vitro***. (Dissertação), Maringá, Paraná, 2019.

SOLLENBERGER, L. E.; VENDRAMINI, J. M.; PEDREIRA, C. G.; RIOS, E. F. Warm-Season Grasses for Humid Areas. In: Moore KJ, Collins M, Nelson JC, Redfearn DD. **Forages: The Science of Grassland Agriculture**, 2 (7th ed). 331-345, 2020.

SON J-H, RAVINDRAN. Feed enzyme technology: present status and future developments. **Recent Pat Food Nutr Agric**, 3:102–109, 2011.

SONG, S. D.; CHEN, G. J.; GUO, C. H.; RAO, K. Q.; GAO, Y. H.; PENG, Z. L.; ZHANG, Z. F.; BAI, X.; WANG, B. X.; CHEN, Z. H.; FU, X. S.; ZHU, W. L. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, p. 170-177, 2018.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology** 58:151–163, 1996.

SUN, S.; Sun S.; Cao, X.; Sun, R. The role of pretreatment in improving the Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 49-58, 2016.

SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 4rd edition. CABI, 579 p, 2010.

SWAIN, P.S.; RAO, S.B.N.; RAJENDRAN, D.; DOMINIC, G.; SELVARAJU, S. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: a review. **Anim Nutr**. 2:134–141, 2016.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A. A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.3-4, p.185-197, 1993.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable Protein Meals and the Effects of Enzymes. In.: Bedford MR, Partridge GG (Eds.). **Enzymes in farm nutrition**. Oxon: Cab International. 125-144, 2001.

TILLEY, J. M. A., & TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Grass and forage science**, 18(2), 1963.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects 2019, Highlights**. New York, 2019.

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, 56(4):460-472, 2009.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHIKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using Enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and Synergy. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 1, p. 191-202, 2012.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. Ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.

VIEGAS, C. R. **Aditivos ionóforos e não ionóforos na dieta de tourinhos na fase de recria e terminação**. 61p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

WEI, J.; MA, F.; HAO, L.; SHAN, Q.; SUN, P. Effect of differing amounts of zinc oxide supplementation on the antioxidant status and zinc metabolism in newborn dairy calves. **Livestock Science**. Volume 230, December 2019.

WERNER, J. C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N. O.; QUAGGIO, J. A. Forrageiras. In: Raij, B. van; Cantarella, H.; Quaggio, J.A.; Furlani, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2nd ed. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, Fundação IAC.263-273, 1996.

WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–16, 2015.

WILLIAMS, B. A. **Cumulative Gas-production techniques for forage evaluation**. CBA International, 2000.

ZINN, R. A. Effect of salinomycin supplementation on characteristics of Digestion and feedlot performances of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 6, p. 1996-2004, 1986.

4 ARTIGO:

Artigo redigido nas normas do periódico Tropical Animal Health and Production

Efeito de aditivos modificadores da fermentação ruminal sobre a produção de gases *in vitro*

Aline Reginaldo dos Santos^a, Carolina Tobias Marino^b, Ester de Queiroz Cusinato Alves^c, Anny Caroline Della Vechia de Souza^a, Alexandre de Oliveira Bezerra^c, Marlene de Barros Coelho Caviglioni^b, Fabiane Siqueira^b, Gelson dos Santos Difante^a, Rodrigo da Costa Gomes^b

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Senador Felinto Muller, 2443, Pioneiros, Campo Grande, MS, Brasil

^b Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, Vila Popular, Campo Grande, MS, Brasil.

^c Universidade Católica Dom Bosco - UCDB, Avenida Tamandaré 3000, Campo Grande, MS, Brasil.

* Corresponding author.

Aline Reginaldo dos Santos: e-mail: aline.reginaldo@ufms.br

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Av. Senador Filinto Müller, 2443. Cidade Universitária. 79070-900.

Campo Grande-MS, Brazil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética de fermentação ruminal *in vitro* de gramíneas tropicais submetidas à adição de aditivos ionóforos e não-ionóforos (Experimento 1), nanopartículas de zinco e selênio (Experimento 2), e enzimas comerciais (Experimento 3). No Experimento 1, as gramíneas *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Massai foram incubadas com monensina, salinomocina, lasalocida e virginiamicina. No Experimento 2, nanopartículas de óxidos de zinco e selênio foram sintetizadas e comparadas a fontes inorgânicas (sulfato de zinco e selenito de sódio), utilizando *B. brizantha* cv. Marandu como substrato. Após 48 horas de fermentação *in vitro*, foram coletadas amostras de gases do headspace de dois frascos por tratamento aleatoriamente, utilizando seringas e frascos de 20 mL previamente evacuados. No Experimento 3, foram testadas as enzimas comerciais Fibrozyme®, Allzyme SSF®, Allzyme VegPRO® e Potenzya® Grano, também incubadas com *B. brizantha* cv. Marandu. Foi utilizada a técnica de fermentação *in vitro* com 0,5 g de forragem como substrato, em ensaios de 48 horas. A produção de gases foi monitorada automaticamente pelo sistema Ankom^{RF}. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey (5%). A virginiamicina reduziu significativamente ($P < 0,05$) a degradabilidade da matéria seca em 11%, a produção máxima de gases em 20%, e a taxa de fermentação ruminal, destacando-se pela redução de até 43% na taxa de fermentação da cv. Basilisk; para a cv. Marandu. A degradabilidade da matéria seca foi 10% menor ($P < 0,05$) no tratamento virginiamicina, quando comparado a monensina e a taxa de fermentação foi 40% menor ($P < 0,0001$); e para a cv. Massai, a taxa de fermentação foi 39% menor ($P < 0,0001$) no tratamento virginiamicina, quando comparado aos demais. Já os aditivos à base de nanominerais e enzimas comerciais não promoveram alterações significativas na cinética de fermentação ruminal *in vitro*. No entanto, na análise de cromatografia gasosa feita no estudo de nanominerais, a proporção de CO₂ foi menor ($P = 0,0513$) nos tratamentos com nanopartículas de selênio e de óxido de zinco 400 mg em relação ao sulfato de zinco. Conclui-se que a virginiamicina tem potencial para inibir a fermentação ruminal de gramíneas tropicais, enquanto outros antibióticos, nanominerais e enzimas comerciais não alteraram a fermentação ruminal *in vitro* nas condições avaliadas. Estudos devem ser realizados para mais extensa investigação dos efeitos de nanominerais de selênio sobre a produção de CO₂ *in vitro*.

Palavras-chave: bovinos, enzimas, fermentação ruminal *in vitro*, ionóforos e não-ionóforos, nanoaditivos, promotor de crescimento.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* ruminal fermentation kinetics of tropical grasses supplemented with ionophore and non-ionophore additives (Experiment 1), zinc and selenium nanoparticles (Experiment 2), and commercial enzymes (Experiment 3). In Experiment 1, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, and *Panicum maximum* cv. Massai were incubated with monensin, salinomycin, lasalocid, and virginiamycin. In Experiment 2, zinc oxide and selenium oxide nanoparticles were synthesized and compared with inorganic sources (zinc sulfate and sodium selenite), using *B. brizantha* cv. Marandu as substrate. After 48 hours of *in vitro* fermentation, gas samples were collected from the headspace of two randomly selected bottles per treatment. In Experiment 3, the commercial enzymes Fibrozyme®, Allzyme SSF®, Allzyme VegPRO®, and Potenzya® Grano were also incubated with *B. brizantha* cv. Marandu. Gas production was automatically monitored using the Ankom^{RF} system. Virginiamycin significantly reduced ($P<0.05$) dry matter degradability by up to 11%, maximum gas production by 20%, and fermentation rate by up to 43%, especially in cv. Basilisk. In cv. Marandu, dry matter degradability was 10% lower, and fermentation rate was 40% lower compared to monensin. For cv. Massai, the fermentation rate was 39% lower with virginiamycin compared to other treatments. Nanomineral-based additives and commercial enzymes did not significantly affect ruminal fermentation kinetics. However, gas chromatography showed a lower CO₂ proportion ($P=0.0513$) with selenium nanoparticles and 400 mg zinc oxide nanoparticles compared to zinc sulfate. It can be concluded that virginiamycin has the potential to inhibit ruminal fermentation of tropical grasses, while other antibiotics, nanominerals, and commercial enzymes showed no effect under the evaluated conditions. More studies are encouraged to investigate the potential effects of nano selenium on *in vitro* CO₂ production.

Keywords: cattle, enzymes, growth promoter, *in vitro* ruminal fermentation, ionophores and non-ionophores, nano-additives.

Introdução

Com o aumento do rebanho ao longo dos anos, a pecuária tem enfrentado o desafio de conciliar maior eficiência produtiva com a sustentabilidade dos sistemas de produção. Essa demanda é intensificada pela contribuição significativa dos ruminantes para as emissões de gases de efeito estufa (GEE), especialmente o metano entérico (CH_4), gerado durante a fermentação ruminal. (Tedeschi *et al.*, 2022) O CH_4 apresenta potencial de aquecimento global aproximadamente 25 vezes superior ao do dióxido de carbono (CO_2), tornando-se um dos principais responsáveis pela intensificação do efeito estufa associado à atividade pecuária. No entanto, a quantidade de CH_4 produzida pode variar de acordo com o tipo de sistema de produção adotado, a ingestão de matéria seca (MS) e a digestibilidade dos alimentos oferecidos aos animais (Kennedy *et al.*, 2024).

Dentre as tecnologias utilizadas para melhorar a eficiência produtiva em ruminantes, destacam-se os aditivos alimentares modificadores da fermentação ruminal, como os antibióticos (ionóforos e não-ionóforos) e as enzimas. Esses compostos atuam sobre a microbiota ruminal, promovendo alterações na dinâmica fermentativa que resultam em maior eficiência no aproveitamento dos nutrientes. Um exemplo amplamente estudado é a monensina, um antibiótico ionóforo que apresenta toxicidade seletiva para bactérias gram-positivas, inibindo a entrada de nutrientes por meio da desestabilização de suas membranas celulares (Berchielli & Bertipaglia, 2010). A monensina atua no ambiente ruminal interferindo no transporte iônico transmembranar, o que compromete o crescimento microbiano indesejado e favorece uma fermentação mais eficiente, com menor produção de metano entérico.

Diante dessa abordagem e dos problemas enfrentados com a dificuldade de disponibilidade de nutrientes por forragens de baixa qualidade, o uso de enzimas exógenas vem sendo aplicado em estudos que buscam avaliar diferentes formas de disponibilidade e qualidade de fibra (Kondratovich *et al.*, 2019). Em dietas de ruminantes, a adição de enzimas exógenas como xilanase e celulase atuam como um modulador de fermentação ruminal e, trabalhando de forma sinérgica com as enzimas endógenas, contribuem com o aumento da digestibilidade dos nutrientes (Pimentel *et al.*, 2022).

As regiões tropicais desempenham um papel estratégico na produção global de ruminantes, sendo caracterizadas por sistemas alimentares predominantemente

baseados em forragens tropicais. Embora diversos aditivos alimentares apresentem resultados consistentes na literatura quanto ao desempenho animal, sua eficácia pode ser influenciada pelas particularidades do ambiente ruminal. As variações nutricionais e estruturais das forragens tropicais, especialmente durante o período seco, reduzem a qualidade e a disponibilidade da dieta, o que pode comprometer o modo de ação dos aditivos no rúmen (Nascimento, 2023). Nesse contexto, torna-se imprescindível avaliar os efeitos desses compostos sob condições tropicais reais, garantindo sua aplicabilidade, eficiência zootécnica e sustentabilidade ambiental.

Além disso, novas tecnologias, estão sendo investigadas para o desenvolvimento de aditivos alimentares. O uso de nano-selênio (nano-Se), nanocromo (nano-Cr₂O₃) ou nano-zinco (nano-ZnO), por exemplo, tem demonstrado vantagens em relação aos sais inorgânicos e quelatos desses elementos, apresentando melhores resultados na produção animal, saúde dos rebanhos e qualidade dos produtos (Konkol & Wojnarowski, 2018). Essas vantagens estão associadas à maior interação das nanopartículas com outras substâncias orgânicas e inorgânicas devido à sua maior área superficial de contato.

Foi levantada a hipótese de que possíveis interações entre cultivares forrageiras e aditivos alimentares poderiam alterar as condições da fermentação ruminal, favorecendo ou desfavorecendo sua cinética. Além disso, considerando avanço no desenvolvimento de novas classes de aditivos, como os nanominerais, supõe-se que nanopartículas de elementos minerais (sendo o nanômetro igual a 10⁻⁹ m) possam influenciar positivamente o processo fermentativo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de antibióticos ionóforos e não ionóforos, nanominerais e enzimas comerciais sobre a cinética de fermentação ruminal, utilizando a técnica da produção de gases *in vitro*, com diferentes cultivares de forrageiras tropicais como substrato.

Material e métodos

Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Corte (#01/2022). O estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Gado de Corte, localizado no município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul.

O estudo compreende três experimentos distintos, desenvolvidos com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias e produtos comerciais sobre a

cinética de fermentação ruminal *in vitro* de gramíneas tropicais (Figura 1). Cada tratamento dentro de um ensaio continha quatro réplicas, e foram realizados três ensaios repetidos no tempo, totalizando 12 amostras por tratamento, por experimento. Os tratamentos foram distribuídos seguindo o delineamento em blocos ao acaso, sendo o ensaio considerado como bloco e cada frasco de fermentação uma unidade experimental.

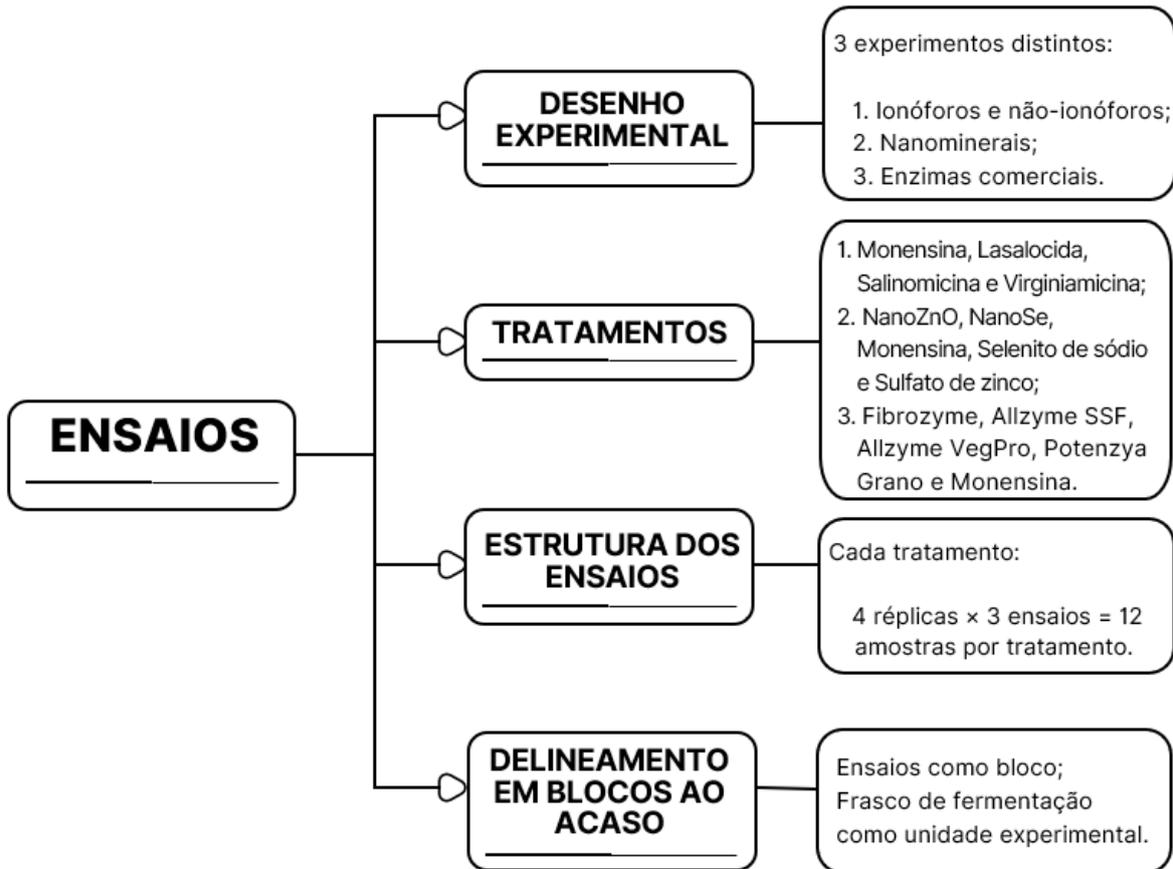


Figura 1. Representação resumida do delineamento experimental.

Análises realizadas

Amostras de forragem (0,5 g) foram previamente secas e passadas em moinho de peneira de 1mm, incubadas em quadruplicata, com três repetições no tempo, em frascos de vidro de 250 mL, com 50 mL de solução tampão e 25 mL de inóculo ruminal (Goering & Van Soest, 1970). Os frascos fechados hermeticamente foram mantidos a 39 °C, por 48h, em meio anaeróbico, inoculado com fluido ruminal na presença de uma solução de digestão/tampão contendo macro e micro minerais e agentes tamponantes, simulando as condições ruminiais. A pressão dos gases acumulados no espaço superior dessas garrafas, denominado *headspace*, foi

mensurada por módulos ANKOM^{RF} Gas Production System (Ankom Technology, Macedon - NY, USA) contendo dispositivos de mensuração automatizada por rádio frequência (*wireless*). Também foram adicionados dois frascos denominados “brancos”, que continham apenas inóculo ruminal e solução tampão, para descontar a produção de gases oriunda da fermentação produzida a partir destas soluções.

O inóculo ruminal foi coletado de dois bovinos canulados no rúmen, alimentados com silagem de sorgo, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu *in natura* e sal mineral *ad libitum*. O conteúdo ruminal foi exprimido e o líquido coletado em um balde após filtragem em duas camadas de pano. O líquido filtrado foi recolhido diretamente em uma garrafa térmica pré-aquecida a 39 °C, e imediatamente levado para o laboratório.

As leituras de pressão (psi) foram registradas em intervalos de 15 min, totalizando n = 192 por curva, e convertidas para mL de gases através da Lei de Avogadro, segundo a equação:

$$V_g = V_f P_{psi} \times 0,068004084$$

Em que, V_g = volume de gases em mL a 39°C; V_f = headspace do frasco de fermentação em mL; e P_{psi} = pressão acumulativa registrada em psi.

Os resultados foram expressos em mL de gases produzidos por grama de matéria seca incubada (mL/g MS incubada). Os dados de produção acumulativa de gases foram analisados pelo modelo logístico de Schofield *et al.* (1994), sendo os parâmetros do modelo estimados pelo algoritmo de Gauss-Newton modificado inserido no procedimento NLIN do aplicativo SAS, *Statistical Analysis System* versão 9.4 (SAS Institute, Cary - NC, USA), através do modelo Gompertz:

$$Y = A \exp [-L \exp (- c^t)]$$

Onde:

A = produção de gases assintótica (máxima);

L = *lag time* e;

c = constante de produção de gases.

Para a determinação da degradabilidade da matéria seca (DMS) da forrageira adotada como substrato, a amostra foi acondicionada em bolsas de filtro de TNT, as quais foram pesadas antes e ao término do ensaio. A DMS foi calculada pela razão da massa de matéria seca (MS) do substrato restante após a incubação (g) pela massa de MS do substrato original (g) multiplicado por 100. Na sequência, foi

calculada a produção total de gases *in vitro* por matéria seca degradável (MSD) e o volume total de acordo com as equações:

$$\text{MSD} = \text{massa de substrato (g)} \times \text{DMS}/100$$

$$\text{Vt (mL/g MSD)} = \text{Volume total (mL)}/\text{MSD}.$$

Experimento 1: Avaliação de aditivos ionóforos e não-ionóforos com diferentes cultivares forrageiras tropicais

No experimento 1 os tratamentos foram: Controle (CON, sem aditivos); Monensina sódica (MON, monensina 99%, Sigma Aldrich, EUA) (0,1 mg); Lasalocida (LAS, lasalocida sódica 15%, Taurotec, Zoetis, Brasil) (0,1 mg); Virginiamicina (VIRG, virginiamicina 10%, V-Max, Phibro, Brasil) (0,1 mg); e Salinomocina (SAL, salinomocina sódica 12%, Posistac, Phibro, Brasil) (0,05 mg). As quantidades incubadas dos aditivos equivalem às doses de 25, 30, 20 e 12 mg/kg de MS incubada, respectivamente, respeitando-se valores estabelecidos de acordo com a literatura ou recomendação do fabricante.

Neste experimento, os aditivos foram incubados com diferentes cultivares forrageiras tropicais. As amostras de forrageiras *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (colhida no período da seca); *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (colhida no período das águas); *Panicum maximum* cv. Massai (colhida no período de transição seca-águas), foram obtidas por meio de um corte rente ao solo, passaram por um processo de separação morfológica e apenas as folhas foram secas a 55° C e moídas em peneiras de 1 mm. As amostras das folhas foram analisadas quanto aos teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e lignina em detergente ácido (LDA), conforme Campos *et al.* (2024) (Tabela 1).

As cultivares apresentaram diferenças na sua composição bromatológica (Tabela 1), onde a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu apresentou maior teor de PB (12,6%) e DIVMO (52,0%), enquanto *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Panicum maximum* cv. Massai apresentaram teores mais elevados de FDN (74,2% e 81,2%, respectivamente) e FDA (36,6% e 45,1%, respectivamente), indicando maior proporção de fração estrutural da parede celular (Van Soest, 1994; Minson, 1990).

Tabela 1. Análise bromatológica das folhas de diferentes cultivares tropicais aplicadas na fermentação ruminal *in vitro*.

Gramínea	PB	FDN	FDA	DIVMO	LDA
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	12,6	72,8	37,1	52,0	4,6
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk	6,9	74,2	36,6	48,3	4,0
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai	6,5	81,2	45,1	49,1	3,9

PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; DIVMO: digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica; LDA: lignina em detergente ácido.

Experimento 2: Avaliação de nanominerais

No experimento 2 os tratamentos foram: Controle (CON, sem aditivos); Monensina sódica (MON, monensina 99%, Sigma Aldrich, EUA) (0,1 mg); Nanopartículas de óxido de zinco (NZnO) com diâmetro médio de 208 nm (40 e 400 mg); Suspensão de nanopartículas de selênio (NSe) com diâmetro médio de 250 nm (1 µl); Solução de Selenito de sódio (SS), comprada de uma empresa local (10 µl); e Sulfato de zinco (SZn), comprada de uma empresa local (40 mg). As quantidades incubadas dos aditivos equivalem às doses de 40 e 0,1 mg/kg de MS incubada, respectivamente, respeitando-se valores estabelecidos de acordo com a literatura ou recomendação do fabricante. Foi utilizado como substrato de folhas *Brachiaria brizantha* cv. Marandu seca e moída a 1mm (0,5 g).

As suspensões de nanopartículas de selênio foram preparadas a partir da redução de um sal, o selenito de sódio, pelo ácido ascórbico (vitamina C), metodologia considerada síntese “verde” (*green synthesis*) ou ambientalmente mais amigável. Todas as amostras foram armazenadas em geladeira desde o dia de síntese até a data das avaliações *in vitro*, levando-se em conta a manutenção da estabilidade da suspensão com o tempo de armazenamento.

Esta rota de síntese foi baseada em Bai *et al.* (2017), onde foram preparadas duas soluções. A primeira é uma solução de quitosana 0,5% (w/v) em ácido acético 1% (v/v), adicionado 1,6 g de ácido ascórbico. A solução 2, em 10 mL de água ultrapura. Para esta reação, adicionou-se, então, a solução 2 sobre a solução 1 lentamente. A solução permaneceu sob agitação vigorosa por 30 minutos e ao final foi observada formação de um líquido vermelho semelhante à cor de tijolo, característico de nanopartículas de Se.

Já para as nanopartículas de ZnO, considerando que os solventes, a temperatura e o meio reacional afetam sensivelmente o tamanho e a morfologia das

nanopartículas, optou-se por encontrar uma rota simples, utilizando-se para isso o método sol-gel. Esta metodologia se baseou em Alwan *et al.* (2015), em que para um volume final de 500 mL, foram preparadas duas soluções. A primeira constituiu na dissolução de 6,3 g (0,03 mol) de acetato de zinco di-hidratado (marca: Sigma-Aldrich, pureza 98%) em 200 mL de água ultrapura em temperatura ambiente, onde o pH medido foi de 6. Em seguida, foi aquecida a solução de acetato de zinco a 50 °C e ainda mantendo-se o aquecimento, adicionou-se lentamente 300 mL (5,14 mol) de etanol, a solução ficou esbranquiçada. A agitação foi aumentada e, então, foi adicionado gota a gota, 4 mL (0,171 mol) da solução de peróxido de hidrogênio 35%. Passados 20 minutos, foi desligada a temperatura, que era mantida constante. A solução coloidal ainda permaneceu sob agitação por aproximadamente mais 4 horas, quando foi desligada a agitação e neste período a solução não alterou seu aspecto. O pH medido após reação foi de 5.

A solução foi deixada em incubação sob refrigeração (~ 15 °C), por 24 horas e ao final deste tempo a solução foi retirada da geladeira, levemente agitada e levada para o banho ultrassônico em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, conduziu-se a secagem a ~80 °C por 80 horas em estufa (marca Nova Técnica). Após a primeira secagem, a amostra foi suspensa em água ultrapura, dispersada em banho ultrassônico em temperatura ambiente por 30 minutos e lavada, o que consistiu de 3 ciclos de centrifugação a 5000 rpm por 45 min em temperatura de 25°C e ressuspensão em água ultrapura para a completa remoção de subprodutos. Por fim, a suspensão final foi levada para secagem a 80 °C por 24 horas em estufa, com o tubo completamente aberto. A conversão completa do óxido de zinco ocorre durante o processo de secagem. O resultado da secagem é um pó branco. Antes da utilização, o produto final foi caracterizado por ensaios de espectrofotometria UV-vis, DLS (*Dynamic Light Scattering*) e potencial zeta. Até a avaliação o material foi mantido sob refrigeração na forma de pó e qualquer uso posterior somente foi possível após aplicação de maceração em gral de ágata, suspensão em água ultrapura, concentração 20% (w/v), seguida de banho ultrassônico por no mínimo 30 minutos.

Coleta e determinação da concentração dos gases do experimento 2

Após 48 horas de fermentação *in vitro*, ou seja, ao término dos ensaios de cada semana, foram coletadas, para análise de metano por meio de cromatografia gasosa, amostras dos gases dos frascos de fermentação contendo os diferentes tratamentos. Para as coletas, foram escolhidos aleatoriamente dois frascos de fermentação de cada tratamento e foram utilizadas seringas com agulhas finas de volume maior do que a dos frascos de vidro que são próprios para análise em cromatógrafo, para manter uma pressão positiva nestes.

Os frascos de 20 mL para coleta dos gases foram previamente evacuados com o auxílio de bomba de vácuo e lacrados com septos de borracha. As agulhas foram introduzidas no septo dos frascos, coletando os gases diretamente do *headspace*.

As alíquotas, um total de 42 frascos, foram acondicionadas em temperatura ambiente até a análise da concentração de CH₄ por cromatografia gasosa, realizada na Embrapa Agropecuária Oeste, na cidade de Dourados/MS. Foi utilizado um cromatógrafo modelo Trace 1310 GC FID/ECD (Thermo Scientific Autosampler TriPlus RSH Coluna RESTEK, Packed Column, Haye Sep Q 80/100, 6ft 2mm ID Stainless, Made in USA.), equipado com colunas empacotadas (pré-coluna e coluna analítica) de injeção automática, com Detector de Captura de Elétrons (ECD) operando a 350 °C, utilizado para quantificar N₂O, e com Detector por Ionização de Chama (FID) operando a 250 °C, para determinar a concentração de CO₂ e CH₄.

Experimento 3: Avaliação de complexo enzimáticos comerciais

No experimento 3, os tratamentos foram: Controle (CON, sem aditivos); Monensina sódica (MON, monensina 99%, Sigma Aldrich, EUA) (0,1 mg); Fibrozyme® - Sapogenina, *S. cerevisiae* e xilanase (FBZ, Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA, Brasil) (900 mg); Allzyme SSF® - Fitase e xilanase (SSF, Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA, Brasil) (900 mg); Allzyme VegPRO® - Protease e celulase (VEGP, Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA, Brasil) (1800 mg); Potenzia® Grano – Endo-1,4-β-xilanase, vitaminas A, D3 e E (PGRANO, Safeeds Nutrição Animal, Brasil) (400 mg). As quantidades incubadas dos aditivos equivalem às doses de 0,9; 0,9; 1,8; 0,4 g/kg de MS incubada, respectivamente, respeitando-se valores estabelecidos de acordo com a recomendação do fabricante. Foi utilizado

como substrato amostras de folhas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu seca e moída à 1mm (0,5 g).

Varáveis analisadas na produção de gás

As variáveis analisadas foram produção de gases às 48h (PG48, mL), degradabilidade da matéria seca (DMS, %), volume total de gases produzidos por matéria seca degradada (VTMSD, mL/g MSD), produção máxima de gases (A, mL), Lag time (L, h) e taxa de fermentação (c, %/h).

A partir dos dados de pressão em função do tempo foi calculada a produção de gases às 48 h (PG48, mL), que representa os produtos da fermentação ruminal (principalmente dióxido de carbono e metano). Juntamente com os dados da degradabilidade da matéria seca (DMS, %), foi calculada a relação volume total de produção de gases por matéria seca degradada (VTMSD, mL/g MSD). Essa variável expressa a quantidade de gases produzidos por cada grama de substrato degradado durante a fermentação ruminal *in vitro* (Menke & Steingass, 1988). Valores mais altos de VTMSD podem indicar uma maior quantidade de frações solúveis que se degradam rapidamente, elevando a produção de gases, mesmo que a degradação de frações fibrosas seja limitada (Blümmel & Ørskov, 1993; Getachew *et al.*, 2004). No entanto, valores menores de VTMSD podem mostrar que há uma maior absorção de nutrientes na biomassa microbiana e uma produção menor de gases, o que indica uma fermentação mais eficiente sob o ponto de vista da formação da população microbiana (Blümmel; Steingass; Becker, 1997).

A variável produção máxima de gases (A, mL) representada o valor máximo de produção de gases às 48 h. A variável Lag time (L, horas) configura o tempo que os microrganismos necessitam para colonizarem a fibra, se multiplicarem e iniciarem a fermentação, levando em consideração que quanto menor o Lag time, mais rápido se inicia a fermentação. Por fim, a taxa de fermentação (c, %/h) simboliza a velocidade do processo de fermentação. Espera-se que taxas de fermentação mais elevadas contribuam para uma elevação da degradação da matéria seca.

Procedimentos estatísticos

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento *Mixed do software SAS Statistical Analysis System* versão 9.4 (SAS Institute, Cary - NC, USA). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com efeito fixo de tratamento e aleatório de ensaio (bloco). Os dados foram avaliados para normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey-Kramer, adotando-se 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Sabe-se que o uso de forrageiras tropicais é predominante nos sistemas de produção extensivos de bovinos no Brasil. Entretanto, durante o período seco, essas forrageiras apresentam significativa queda na qualidade nutricional, o que compromete o desempenho animal. Uma das estratégias para contornar esse desafio é a inclusão de aditivos promotores de crescimento, como os antibióticos ionóforos (monensina, lasalocida e salinomocina) e não-ionóforos (virginiamicina), com o intuito de melhorar a fermentação ruminal, aumentar a eficiência alimentar e reduzir a produção de metano entérico.

Para o capim-Basilisk o uso da virginiamicina resultou em redução significativa ($P=0,0055$) ($P<0,05$) da degradabilidade da matéria seca (DMS, %) em 11%, quando comparado aos tratamentos com monensina, lasalocida e salinomocina. Esse comportamento foi inesperado, uma vez que a virginiamicina é reconhecida por modular positivamente o ambiente ruminal ao inibir microrganismos gram-positivos que promovem fermentações menos eficientes, o que teoricamente favoreceria uma maior degradabilidade da fibra e melhor aproveitamento da MS (Tabela 2).

Além disso, observou-se que a produção máxima de gases (A, mL) foi 20% menor ($P=0,0178$) com virginiamicina quando comparada aos tratamentos controle e monensina, sem diferença para lasalocida e salinomocina. Esse resultado sugere que a virginiamicina pode ter modificado o equilíbrio da microbiota ruminal, estimulando populações microbianas com menor capacidade fermentativa ou menor atividade metanogênica. Conseqüentemente, houve redução na produção de gases, sem que isso estivesse necessariamente associado a um aumento na degradação da matéria seca. Por outro lado, a taxa de fermentação ruminal (c, %/h) foi reduzida

($P < 0,0001$) em até 43% com o uso da virginiamicina, indicando um possível atraso na colonização e na atividade microbiana sobre a forragem (Tabela 2).

Essa redução pode estar relacionada à qualidade da forragem colhida no período da seca, como observado na Tabela 1, que apresenta a análise bromatológica do capim-Basilisk, com baixo teor de proteína bruta (PB < 7%) e elevado teor de fibra em detergente neutro (FDN). Segundo Mertens (1997), forragens com essas características dificultam a colonização microbiana no rúmen devido à escassez de nitrogênio disponível, fator limitante para o crescimento e a atividade de microrganismos celulolíticos.

Além disso, a eficácia de aditivos ionóforos (como monensina, lasalocida e salinomicina) e não-ionóforos (como virginiamicina) também depende de sua solubilidade e estabilidade no ambiente ruminal. Estudos indicam que diferenças na solubilidade podem afetar a liberação, a absorção pelas membranas microbianas e a atividade antimicrobiana dos compostos, influenciando diretamente sua capacidade de modular a fermentação ruminal (Russell & Strobel, 1989; Nagaraja *et al.*, 1997; Callaway *et al.*, 2003). No caso dos ionóforos, por exemplo, a solubilidade em lipídios favorece sua ação sobre a membrana celular de bactérias Gram-positivas, enquanto alterações no pH ruminal ou na composição da dieta podem impactar essa ação. Para aditivos não ionóforos, a solubilidade e a estabilidade frente às proteases ruminais são fatores determinantes para sua eficácia (Thonney *et al.*, 1981; Broderick, 2004).

Contudo, era esperado que os aditivos, sobretudo os ionóforos, contribuíssem para aumentar a DMS, visto que promovem maior eficiência na fermentação e seleção de bactérias mais eficientes energeticamente. Os resultados encontrados, portanto, indicam que o efeito da virginiamicina, nesse contexto, pode estar relacionado a uma interação negativa entre o tipo de forragem (baixo valor nutricional) e a modulação microbiana promovida pelo aditivo, gerando resultados inferiores aos observados com os ionóforos.

Para a cultivar Marandu, os resultados também apresentaram um efeito negativo da virginiamicina sobre a degradabilidade da matéria seca (DMS, %), que foi 10% menor ($P = 0,0124$) quando comparada à monensina sem diferença para os tratamentos controle, lasalocida e salinomicina. Além disso, a taxa de fermentação (c, %/h) foi reduzida ($P < 0,0001$) em 40% com a virginiamicina, em relação aos

demais aditivos, o que indica menor velocidade na atividade microbiana sobre a forrageira (Tabela 2).

No entanto, ao contrário do que foi observado para o capim-Basilisk, a cultivar Marandu apresentou excelente valor nutricional, conforme demonstrado na Tabela 1, com níveis adequados de proteína bruta (PB > 7,0%) e composição fibrosa compatível para uma boa degradação ruminal. Segundo Van Soest (1994), forrageiras com essas características favorecem a ação dos microrganismos ruminais, principalmente celulolíticos, permitindo melhor aproveitamento da parede celular. Assim, esperava-se que a presença da virginiamicina promovesse ou, ao menos, mantivesse uma elevada DMS, o que não foi observado nos resultados.

E para a cultivar Massai, a virginiamicina também reduziu ($P < 0,0001$) taxa de fermentação (c, %/h), que foi 39% menor quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 2). Esse comportamento repete o observado nas outras cultivares, sendo um efeito consistente na redução da atividade fermentativa microbiana pela virginiamicina, independente da qualidade nutricional da forrageira. Essa persistência em reduzir a atividade fermentativa das bactérias, pode indicar que a virginiamicina pode ter afetado a fase inicial de colonização e contato das bactérias com a forrageira, impactando direto na velocidade e na produção dos gases. Diante do que foi apresentado, é importante ressaltar que a virginiamicina pode estar interferindo no equilíbrio da microbiota ruminal.

Esses resultados reforçam a ideia de que o uso de aditivos promotores de crescimento deveria levar em consideração alguns fatores como o tipo de forragem, o valor nutricional da mesma e a época de ano. Além disso, os resultados nos mostram que há uma necessidade em efetuar novos estudos complementares que possam avaliar o impacto da virginiamicina direto sobre a população microbiana e o seu efeito sobre os ácidos graxos voláteis (AGV), a fim de entender o que levou a redução da eficiência fermentativa.

Tabela 2. Cinética de degradação ruminal por produção de gases *in vitro* de diferentes cultivares de forrageiras tropicais com a utilização de diferentes aditivos modificadores da fermentação ruminal.

Variável	Tratamentos					Média	EPM	P>F
	CON	MON	LAS	SAL	VIRG			
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk								
PG48, mL	93,94	96,08	97,20	93,82	84,11	92,67	1,88	0,1155
DMS, %	59,24 ^{AB}	60,35 ^A	60,94 ^A	60,21 ^A	53,97 ^B	58,72	0,76	0,0055
VTMSD, mL/g	315,31	319,02	318,69	311,15	309,79	314,71	4,94	0,9364
A, mL	99,95 ^B	100,74 ^B	104,83 ^{AB}	103,78 ^{AB}	125,97 ^A	108,58	3,27	0,0178
L, h	2,81	2,60	2,90	2,61	2,75	2,75	0,08	0,5117
c, %/h	0,0826 ^A	0,0863 ^A	0,0819 ^A	0,0732 ^A	0,0459 ^B	0,0721	0,003	<0,0001
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu								
PG48, mL	95,83	90,28	94,31	89,80	86,71	91,34	1,90	0,5709
DMS, %	61,90 ^{AB}	66,35 ^A	63,03 ^{AB}	63,22 ^{AB}	59,83 ^B	63,12	0,72	0,0124
VTMSD, mL/g	311,86	272,38	296,74	284,03	287,81	290,49	7,02	0,4202
A, mL	97,12	91,40	95,10	91,41	102,46	95,13	2,40	0,3552
L, h	2,32	2,93	2,64	2,85	2,96	2,75	0,09	0,0575
c, %/h	0,1049 ^A	0,1120 ^A	0,1102 ^A	0,1003 ^A	0,0644 ^B	0,1009	0,005	<0,0001
<i>Panicum maximum</i> cv. Massai								
PG48, mL	103,72	108,16	98,88	103,78	93,77	101,40	1,96	0,1808
DMS, %	52,62	53,27	52,38	54,96	49,66	52,41	0,76	0,4013
VTMSD, mL/g	395,18	404,65	375,38	383,61	377,71	386,46	5,66	0,3794
A, mL	109,58	115,03	106,31	112,54	153,34	119,38	7,23	0,2137
L, h	2,34	2,31	2,20	2,36	2,46	2,33	0,05	0,4745
c, %/h	0,0760 ^A	0,0753 ^A	0,0697 ^A	0,0776 ^A	0,0456 ^B	0,0686	0,002	<0,0001

PG48: Produção de gases por 48 h; DMS: Degradabilidade da matéria seca; VTMSD: Volume total de gases produzido por matéria seca degradada; MS: Matéria seca; CON: controle; MON: monensina sódica; LASA: lasalocida; SALI: salinomicina; VIRGI: virginiamicina; EPM: erro padrão médio. A: produção de gases máxima; L: Lag time; c: taxa de fermentação, P>F = probabilidade de um erro tipo I.

Ainda, com o intuito de modificar a fermentação ruminal, melhorar a degradabilidade da matéria seca e minimizar a produção de CH₄, formulou-se a hipótese de que nanopartículas (10⁻⁹ m) de elementos minerais poderiam afetar positivamente o processo. Os nanominerais apresentam propriedades únicas, como maior biodisponibilidade, devido à maior área superficial específica, alta atividade superficial e eficiência catalítica e maior capacidade de absorção quando comparadas com micropartículas, que apresentam diâmetro bem maior (10⁻⁶ m) (Rajendran *et al.*, 2013). Nanopartículas ou nanominerais apresentam efeitos adversos mínimos nas células quando comparadas com sua forma microparticulada ou iônica (Swain *et al.*, 2016). No entanto, na Tabela 3 podemos observar que nenhum dos tratamentos com nanominerais (ZnO e Se) apresentaram resultados significativos (P>0,05), nem mesmo suas formas convencionais (selenito de sódio e sulfato de zinco).

A ausência de efeito dos nanominerais pode estar relacionada a determinados fatores interativos que influenciam a cinética de fermentação ruminal. O capim-Marandu, utilizado como substrato neste experimento apresenta ótimo valor nutricional (Tabela 1), o que, por si só, pode proporcionar condições ideais para a atividade microbiana, não sendo necessário a adição dos elementos fornecidos (Zn e Se). Outro fator que pode ter influenciado é a dosagem e a forma como foi disponibilizada aos microrganismos, não sendo suficiente para provocar alterações significativas na microbiota e na atividade fermentativa *in vitro*.

Chen *et al.* (2011), ao estudarem a suplementação *in vitro* com nano-ZnO no padrão de fermentação ruminal, observaram que as nanopartículas foram capazes de melhorar o crescimento de microrganismos ruminais, aumentar a síntese proteica microbiana e a eficiência de utilização de energia na fase inicial da incubação (6 a 12 horas). Diante dos resultados encontrados nesse estudo e os achados de Chen *et al.* (2011), essa divergência pode estar relacionada com o tempo de incubação, tipo de substrato, dosagem e concentração dos nanominerais, sendo importante ressaltar que o ambiente *in vitro* possui limitações. No entanto, na análise de cromatografia gasosa (Tabela 4) pode se observar que não houve efeito das nanopartículas ou monensina na proporção de metano (P>0,05), resultado que corrobora achados prévios de Petrič *et al.* (2024) e Sofi'ul Anam *et al.* (2023). Esses autores também relataram ausência de efeito expressivo das nanopartículas de Se ou Zn na produção de CH₄ durante ensaios *in vitro* ou *in vivo*, ainda que tenham

verificado efeitos positivos sobre a digestibilidade da matéria seca e outros parâmetros fermentativos.

Já a proporção de CO₂ foi menor (P=0,0513) nos tratamentos nanopartículas de selênio e de óxido de zinco 400 mg em relação ao sulfato de zinco. Esse achado pode estar relacionado à modulação da microbiota ruminal e da atividade fermentativa promovida pelas nanopartículas, uma vez que estudos como o de Shakweer *et al.* (2023) demonstraram que doses mais elevadas de nano-Se podem reduzir a produção total de gases e alterar o perfil fermentativo sem impactar a produção de metano. Além disso, Petrič *et al.* (2024) observaram que nano-ZnO pode melhorar a digestibilidade da matéria seca sem afetar significativamente a produção de CH₄, sugerindo que a substituição de fontes minerais convencionais por nanopartículas pode alterar a dinâmica fermentativa, favorecendo vias metabólicas que reduzem a formação de CO₂.

Dessa forma, os resultados encontrados sugerem que, embora a utilização de nanopartículas de selênio e de óxido de zinco não tenha promovido redução direta na produção de CH₄, elas podem influenciar a proporção de CO₂. Isso reforça a necessidade de mais estudos para compreender como diferentes formas minerais, especialmente na forma de nanopartículas, podem afetar o metabolismo microbiano e o balanço entre os gases de efeito estufa produzidos no rúmen.

Tabela 3. Cinética de degradação ruminal por produção de gases *in vitro* da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com a utilização de nanominerais.

Variável	Tratamentos							Média	EPM	Valor-P
	CON	MON	NSE	NZNO40	NZNO400	SS	SZN			
PG48, mL	87,09	80,56	90,26	83,33	78,48	85,91	77,75	83,07	2,00	0,6041
DMS, %	63,48	63,41	64,68	61,47	60,78	62,66	62,22	62,63	0,41	0,1931
VTMSD, mL/g	273,21	253,61	279,20	271,03	255,76	279,46	248,87	265,20	6,16	0,6607
A, mL	91,34	85,07	97,22	86,87	81,77	88,38	81,88	87,01	2,05	0,5296
L, h	3,33	4,01	3,74	3,85	3,99	4,13	3,87	3,84	0,14	0,3412
c, %/h	0,1159	0,1219	0,1176	0,1162	0,1243	0,1202	0,1194	0,1194	0,002	0,9149

PG48: Produção de gases as 48 h; DMS: Degradabilidade da matéria seca; VTMSD: Volume total de matéria seca degradável; MS: Matéria seca; CON: controle negativo; MON: monensina sódica; NSe: Nanopartículas de selênio; NZnO40: Nanopartículas de óxido de zinco 40 mg; NZnO400: Nanopartículas de óxido de zinco 400 mg; SS: Selenito de sódio; SZn: Sulfato de zinco; EPM: Erro padrão da média; A: produção de gases máxima; L: Lag time; c: taxa de fermentação.

Tabela 4. Proporção de metano e gás carbônico pela fermentação *in vitro* da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com a utilização de nanominerais.

Variável	Tratamentos							EPM	Valor-P
	CON	MON	NSE	NZNO40	NZNO400	SS	SZN		
CH ₄ , %	4,42	4,23	3,62	4,60	3,84	4,34	4,26	0,16	0,5414
CO ₂ , %	73,5 ^{abc}	74,1 ^{ab}	69,8 ^c	73,3 ^{abc}	71,4 ^{bc}	73,3 ^{abc}	75,5 ^a	0,814	0,0513

CON: controle; MON: monensina sódica; NSe: Nanopartículas de selênio; NZnO40: Nanopartículas de óxido de zinco 40 mg; NZnO400: Nanopartículas de óxido de zinco 400 mg; SS: Selenito de sódio; SZn: Sulfato de zinco; EPM: Erro padrão da média.

O uso de enzimas exógenas ou complexos enzimáticos nas dietas de bovinos tem se mostrado muito satisfatório em sua atividade de proporcionar uma maior disponibilidade dos monossacarídeos para serem fermentados (Tirado-González et al., 2021). No entanto, nenhum dos quatro tipos de complexos enzimáticos avaliados na fermentação ruminal *in vitro* por produção de gases afetou ($P>0,05$) as variáveis analisadas (Tabela 5).

A ausência de efeito pode estar relacionada com fatores que podem limitar a atividade enzimática na cinética de fermentação ruminal. Embora Neumann *et al.* (2018) tenham relatado aumento no ganho médio diário e aumento no consumo alimentar com a inclusão de Potenzya® Grano (Endo-1,4- β -xilanase, vitaminas A, D3 e E) em touros Angus, esses resultados podem estar associados a modificações no ambiente ruminal ao longo do tempo, o que não pode ser captado por completo em ensaios *in vitro*.

Por outro lado, Martins *et al.* (2006), ao avaliarem a inclusão de Fibrozyme® (Sapogenina, *S. cerevisiae* e xilanase) em bovinos canulados, relataram que adição da enzima não apresentou resultado sobre os parâmetros ruminiais. Isso reforça a ideia de que as enzimas exógenas dependem de uma boa estabilidade e atividade sinérgica na cinética de fermentação ruminal. Segundo Thorpe & Beal (2001), para que a enzima exógena desenvolva uma ótima atividade, ela deve suportar as condições fisiológicas do rúmen, a proteólise por meio das proteases e o antagonismo com as próprias enzimas endógenas. Também, o tempo de permanência dessas enzimas no rúmen, sem sofrer degradação, é determinante para sua efetividade, pois quanto maior sua estabilidade, maior o tempo disponível para catalisar a degradação das fibras, amidos e outros componentes presentes na dieta (Adesogan *et al.*, 2014).

Além disso, fatores como a rápida taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal e distúrbios fermentativos como por exemplo, a acidose ruminal, podem reduzir ainda mais o tempo de ação dessas enzimas sobre os substratos (Beauchemin *et al.*, 2003; Kung *et al.*, 2000). Em ensaios *in vitro*, onde esse tempo de permanência é limitado, é possível que a enzima não alcance seu pico de atividade, reduzindo o contato das enzimas com o substrato.

Tabela 5. Cinética de degradação ruminal por produção de gases *in vitro*, da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com a utilização de enzimas comerciais.

Variável	Tratamento						Média	EPM	Valor - P
	CON	MON	FBZ	SSF	VEGP	PGRANO			
PG48, mL	90,88	83,24	88,46	93,07	94,58	89,36	90,07	1,81	0,5932
DMS, %	65,16	66,06	64,83	65,82	66,33	68,02	65,97	0,47	0,4838
VTMSD, mL/g	274,98	252,51	271,46	282,99	282,47	261,23	271,55	5,06	0,5164
A, mL	92,09	85,94	91,91	95,66	96,22	90,87	93,12	2,19	0,7241
L, h	3,38	3,59	3,30	3,25	3,14	3,43	3,34	0,07	0,5902
c, %/h	0,0972	0,1120	0,1130	0,1024	0,1031	0,1110	0,1060	0,003	0,2253

PG48: Produção de gases as 48 h; DMS: Degradabilidade da matéria seca; VTMSD: Volume total de gases produzido por matéria seca degradável; MS: Matéria seca; CON: controle negativo; MON: monensina sódica; FBZ: Fibrozyme; SSF: Allzyme SSF; VEGP: Allzyme VegPro; PGRANO: Potenzya Grano; EPM: erro padrão da média. A: produção de gases máxima; L: Lag time; c: taxa de fermentação.

Conclusão

A virginiamicina reduz a produção de gases, a degradabilidade e a taxa de degradação ruminal de gramíneas tropicais, promovendo efeito inibidor na fermentação ruminal *in vitro*. Por outro lado, os aditivos à base de nanominerais e enzimas comerciais não apresentaram efeitos significativos sobre a cinética fermentativa. Com base na produção de gases, nenhum dos aditivos testados resultou em melhorias na fermentação ruminal *in vitro*. O nanomineral de selênio pode reduzir a produção de CO₂ na fermentação ruminal *in vitro*.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Corte pela infraestrutura para a realização dos experimentos e análises laboratoriais, ao CNPq pela bolsa de estudos, à Fundect pelo suporte financeiro, à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo apoio à aluna de pós-graduação e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001.

Contribuição dos autores

Concepção do estudo: ARS, GSD MBCC e RCG

Execução: ARS e EQCA

Análise de dados: ARS, CTM e RCG

Redação do manuscrito: ARS e RCG

Redação do manuscrito: RCG

Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Financiamento

O estudo foi financiado pelo CNPq (bolsa de estudos) e pela Fundect (processos nº 71/002.321/2022 e 83/024.183/2023).

Declarações

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Disponibilidade de dados e materiais

Os conjuntos de dados gerados e/ou analisados durante o presente estudo estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

Aprovação ética

Os procedimentos experimentais utilizados nos experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, sob protocolo nº 01/2022.

Disponibilidade de código

Não aplicável.

Referências

- Adesogan AT, MA ZX, Romero JJ, Arriola KG (2014) Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. *Journal of Animal Science*, 92: 1317-1330
- Alwan RM, Kadhim QA, Sahan KM, Ali RA, Mahdi RJ, Kassim NA, Jassim AN (2015) Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Sol – Gel Route and Their Characterization. *Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, n. 1, p. 1–6
- Bai K, Hong B, He J, Hong Z, Tan R (2017) Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4527–4539
- Beauchemin KA, Colombatto D, Morgavi DP, Yang WZ (2003) Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 18, n. 14, p. E37-E47, Suppl. 2
- Berchielli TT, Bertipaglia LMA (2010) Utilização de aditivos em dietas de bovinos de corte. In: BOVINOCULTURA DE CORTE – vol. I. p.295-330, FEALQ – São Paulo
- Broderick GA (2004). Effect of low levels of feed antibiotics on the efficiency of microbial protein synthesis and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 843–857
- Blümmel M, Ørskov ER (1993) Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 40, n. 2–3, p. 109–119
- Blümmel M, Steingass H, Becker K (1997) The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, v. 77, n. 6, p. 911–921
- Campos RLC, Oliveira RHM, Macedo MCM, Gomes RC (2024) Predicting the nutritional value of tropical forages by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 56)
- Callaway TR, Edrington TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS, Nisbet DJ (2003). Ionophores: Their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4(2), 43–51
- Chen J, Wei W, Zhisheng W (2011) *In vitro* Evaluation of the Effect of Zinc Nano-Oxide Supplementation on Ruminal Fermentation. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23 (8): 1415-1421
- Getachew G, Depeters EJ, Robinson PH (2004) In vitro gas production provides effective method for evaluating ruminant feeds. *California Agriculture*, v. 58, n. 1, p. 54–58

Goering HK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), Agricultural Handbook n° 379 ARS-USDA, Washington, DC

Kennedy M, Lahart B, Herron J, Boland TM, Fleming C, Egan M (2024) Assessing the dry matter intake and enteric methane emissions of pre-partum dairy cows offered grass clover or grass-only silage. *Frontiers in Animal Science* 5:1433769

Kondratovich LB, Sarturi JO, Hoffmann CA, Ballou MA, Trojan SJ, Campanili PR (2019) Effects of dietary exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation characteristics of beef steers fed high-and low-quality growing diets. *Journal of animal science* 97:3089-3102

Konkol D, Wojnarowski K (2018) The use of nanominerals in animal nutrition as a way to improve the composition and quality of animal products. *J. Chem.*, v. 2018, p. 1-7

Kung JRL, Treacher RJ, Nauman GA, Smagala AM, Endres KM, Cohen MA (2000) The effect of treating forage with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(6): 115–122

Martins AS, Vieira PF, Berchielli TT, Prado IN, Garcia JAS (2006) Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.3, p. 1194-1200

Menke KH, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, v. 28, p. 7–55

Mertens DR (1997) Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.1463-1481

Minson DJ (1990) *Forage in Ruminant Nutrition*. San Diego: Academic Press

Nagaraja TG, Newbold CJ, Van Nevel CJ, Demeyer DI (1997). Manipulation of ruminal fermentation. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 523–632). Springer

Nascimento KS (2023) Efeito da suplementação com diferentes fontes de microminerais em associação a enzimas fibrolíticas no desempenho produtivo de vacas nelore a pasto. Tese (doutorado). Jaboticabal, São Paulo

Neumann M, Leão GFM, Vigne GLD, Santos LC, Venâncio BJ, Dochwat A (2018) Eficiência do complex xilanase em dietas de alta energia para passeios prolongados em confinamentos. *Ciências Animais*, vol. 40, e37321

Petrič D, Mikulová K, Bombárová A, Battányi D, Čobanová K, Kopel P, Lukomska A, Pawlak P, Sidoruk P, Kotwica S, Cieslak A (2024). Efcacy of zinc nanoparticle supplementation on ruminal environment in lambs. *BMC Veterinary Research*, v. 20, n. 1, p. 14

Pimentel PRS, Santos Brant LM, Lima AGVO, Cotrim DC, Nascimento T, Oliveira RL (2022) How can nutritional additives modify ruminant nutrition?. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo

Rajendran D, Thulasi A, Jash S, Selvaraju SBNR (2013) Synthesis and application of nano minerals in livestock industry. In: Animal Nutrition and Reproductive Physiology (Recent Concepts). Satish Serial Publishing House, Delhi. p. 517-530

Russell JB, Strobel HJ (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 55(1), 1–6

Schofield P, Pitt RE, Pell NA (1994) Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. Journal of Animal Science, v.72, n.11, p.2980-2991

Shakweer WME, Azzaz HH, El-Nomeary YA, El-Sayed SM, Youssef AM, Noha AH (2023) Synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its effects on *in vitro* rumen feed degradation, ruminal parameters, and total gas production. Egyptian Journal of Chemistry, v. 66, n. 12, p. 189-197

Sofi'ul Anam M, Astuti A, Widyobroto BP, Gunawan, Agus A (2023) *In vitro* Ruminal Cumulative Gas and Methane Production, Enzyme Activity, Fermentation Profile and Nutrient Digestibility on Feed Supplemented with Organic Selenium. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, v. 18, n. 4, p. 261–272

Swain OS, Rao SBN, Rajendran D, Dominic G, Selvaraju S (2016) Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: a review. Anim Nutr. 2:134–141

Tedeschi LO, Abdalla AL, Álvarez C, Anuga SW, Arango J, Beauchemin K, Becquet P, Berndt A, Burns R, De Camillis C, Chará J, Echazarreta JM, Hassouna M, Kenny D, Mathot M, Maurício RM, McClelland SC, Niu M, Onyango AA, Parajuli R, Pereira LGR, Del Prado A, Paz Tieri M, Uwizeye A, Kebreab E (2022) Quantification of methane emitted by ruminants: a review of methods. Journal of Animal Science, v. 100, n. 7

Tirado-González DN, Tirado-Estrada G, Miranda_Romero LA, Ramírez-Valverde R, Medina-Cuéllar SE, Salem AZM (2021) Effects of addition of exogenous fibrolytic enzymes on digestibility and milk and meat production: a systematic review. Annals of Animal Science, v. 21, n. 4, p. 1159-1192

Thonney ML, Bartholomew RC, Johnson LJ (1981). Effects of soluble and insoluble antibiotics on digestion and nitrogen balance in sheep. Journal of Animal Science, 52(3), 572–578

Thorpe J, Beal JD (2001) Vegetable Protein Meals and the Effects of Enzymes. In.: Bedford MR, Partridge GG (Eds.). Enzymes in farm nutrition. Oxon: Cab International. 125-144

Van Soest PJ (1994) Nutritional ecology of the ruminant. 2. Ed. Ithaca, NY: Cornell University Press