



## Efeitos do Isomix® e virginiamicina na fermentação ruminal *in vitro*

Effects of Isomix® and virginiamycin on *in vitro* ruminal fermentation

Sara Adriana Salinas Laura<sup>1</sup> , Rogério de Paula Lana<sup>2</sup> , Márcia das Neves Sáores<sup>1</sup> , Paulo Sérgio Dornelas Silva<sup>2</sup> , Ruth Ccalta Hancco<sup>1</sup>

1 Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil

2 Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil

\*autor correspondente: sarasalinas0697@hotmail.com

Recebido: 28 de novembro de 2024. Aceito: 18 de agosto de 2025. Publicado: 24 de setembro de 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

**Resumo:** O uso de aditivos melhora a eficiência alimentar de bovinos ao alterar as populações microbianas. Este estudo avaliou os efeitos de diferentes doses e da interação de dois aditivos sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a digestibilidade da fibra em detergente neutro (DIVFDN) e os parâmetros de fermentação ruminal, utilizando líquido ruminal de vacas fistuladas. Dietas com relação 70:30 de forragem para concentrado foram incubadas por 48 h pelo método de Tilley & Terry, utilizando *Brachiaria decumbens* como forragem e um concentrado de milho moído, farelo de soja e ureia. Os aditivos testados foram Isomix® (0,0 a 4,8 % da matéria seca da dieta) e virginiamicina (0,0 a 0,80 %). Efeitos significativos ( $P<0,05$ ) da virginiamicina incluíram aumento do pH, NH<sub>3</sub> e proteína solúvel (PS), com redução da DIVMS, DIVFDN, proteína microbiana (PM) e ácidos graxos voláteis (AGV). O Isomix não apresentou efeitos significativos sobre essas variáveis, mas aumentou ( $P<0,05$ ) a concentração de isobutirato. As interações entre os aditivos afetaram o acetato, propionato, butirato, isovalerato e a relação acetato:propionato ( $P<0,05$ ). Embora nenhum dos aditivos tenha melhorado a digestibilidade, o Isomix aumentou o propionato e reduziu a relação acetato:propionato, potencialmente melhorando o balanço energético e o desempenho. Recomenda-se mais pesquisas, especialmente em dietas com baixo teor de proteína e suplementação de ureia em sistemas de pastejo tropical.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada; digestibilidade *in vitro*; pastagens tropicais.

**Abstract:** Additives improve cattle feed efficiency by altering microbial populations. This study evaluated the effects of varying doses and the interaction between two additives on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), neutral detergent fiber digestibility (IVNDFD), and ruminal fermentation parameters using rumen fluid from fistulated cows. Diets with a 70:30 forage-to-concentrate ratio were incubated for 48 h using the Tilley and Terry method, with *Brachiaria decumbens* as the forage and a concentrate composed of corn meal, soybean meal, and urea. The additives tested were Isomix® (from 0.0 to 4.8 % of diet dry matter) and virginiamycin (from 0.0 to 0.80 %). The significant effects ( $P<0.05$ ) of virginiamycin included increased pH, NH<sub>3</sub>, and soluble protein (SP) and decreased IVDMD, IVNDFD, microbial protein (MP), and volatile fatty acids (VFA). Isomix had no significant effects on these variables, but increased isobutyrate concentration ( $P<0.05$ ). Additive interactions affected acetate, propionate, butyrate, isovalerate, and the acetate:propionate ratio ( $P<0.05$ ). While neither additive improved digestibility, Isomix enhanced propionate production and reduced the acetate:propionate ratio, potentially improving energy balance and performance. Further research is recommended, particularly on diets with low protein and urea supplementation in tropical grazing systems.

**Key-words:** Branched-chain volatile fatty acids; *in vitro* digestibility; tropical pastures.



## 1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo, em sistemas de produção predominantemente a pasto e, em sua maioria, com forrageiras tropicais. Elevadas proporções de carboidratos estruturais presentes nas forragens limitam o consumo voluntário e a digestibilidade dos alimentos pelos ruminantes, uma vez que reduzem as taxas de fermentação<sup>(1)</sup>. A busca por novas tecnologias para aumentar o desempenho animal tem sido considerada como alternativa para reduzir custos na nutrição de ruminantes<sup>(2)</sup>.

Os processos de fermentação ruminal proporcionam diversas vantagens nos mecanismos digestivos e metabólicos dos ruminantes. Os produtos da fermentação ruminal, como os ácidos graxos voláteis e a proteína microbiana, constituem as principais fontes de energia e nutrientes para esses animais. A possibilidade de controlar determinados processos metabólicos no rúmen, visando à melhoria do desempenho animal, tem sido um conceito atrativo para nutricionistas e microbiologistas ruminais<sup>(3)</sup>. Assim, o uso de aditivos alimentares pode trazer benefícios ao sistema de produção, como aumento do ganho de peso, melhoria na conversão alimentar, redução do risco de acidose e incremento na resposta imune, resultando em ganhos produtivos<sup>(4,5)</sup>.

A virginiamicina é um antibiótico não-ionóforo que inibe a síntese e o crescimento de células bacterianas gram-positivas<sup>(6)</sup>. Os ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR; ou seja, isobutírico, isovalélico, valérico e 2-metilbutílico) são considerados essenciais para o crescimento de microrganismos celulolíticos, fundamentais para a degradação dos componentes fibrosos das dietas<sup>(7)</sup>. Bactérias fibrolíticas podem ser as mais beneficiadas pela adição de AGVCR à dieta, enquanto outros microrganismos podem se favorecer do aumento da degradação da fibra<sup>(8)</sup>.

Pesquisas anteriores demonstraram resultados variáveis da suplementação de AGVCR sobre a atividade ruminal, mas ainda há pouca informação sobre seus efeitos em nossas condições. Do mesmo modo, não é concreto o conhecimento dos efeitos da virginiamicina em dietas com alta proporção de volumosos<sup>(18, 21, 22)</sup>.

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes níveis de virginiamicina e Isomix (produto contendo AGVCR) sobre microrganismos ruminais, utilizando a técnica *in vitro*, por meio da avaliação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro da dieta, bem como possíveis modificações em alguns parâmetros da fermentação ruminal *in vitro*.

## 2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal e no Laboratório de Microbiologia do Rúmen do Departamento de Zootecnia, e no Laboratório de Microbiologia Anaeróbia do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção da UFV (CEUAP-UFV; protocolo 032/2020).

Foram utilizadas duas vacas da raça Holandesa, com peso vivo médio de 550 kg, fistuladas no rúmen, mantidas sob as mesmas condições, adaptadas à dieta experimental por 15 dias antes da coleta do fluido ruminal e com fornecimento de água *ad libitum*. A dieta foi composta por silagem de milho

como volumoso e concentrado à base de milho moído e farelo de soja, fornecida duas vezes ao dia, após as ordenhas da manhã e da tarde. Os animais foram mantidos em baias individuais com piso de cimento, providas de bebedouro e cocho para volumoso e concentrado.

No experimento, avaliaram-se os efeitos da inclusão de diferentes níveis de virginiamicina e de um produto comercial (Isomix®) sobre a fermentação ruminal *in vitro*, em dieta à base de *Brachiaria decumbens*, com relação volumoso:concentrado de 70:30. Os parâmetros de fermentação avaliados foram pH, ácidos graxos voláteis totais (AGV) e os ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, isovalérico e valérico, expressos em mM e em porcentagem; relação acético:propiônico; nitrogênio amoniacal (em mM ou mmol/L e mg de N-NH<sub>3</sub>/100 mL); proteína solúvel e proteína microbiana (mg/L).

O volumoso foi colhido ao final do período chuvoso, por simulação de pastejo manual, em piquete da Fazenda Boa Vista, distrito de Cachoeira de Santa Cruz, Viçosa-MG, pertencente ao Departamento de Zootecnia da UFV. A dieta experimental foi composta por capim *Brachiaria decumbens*, milho moído, farelo de soja e ureia, na proporção de 70,0; 19,3; 9,7 e 1,0 % na amostra pré-seca, respectivamente. Um total de 75 g de dieta foram preparados, homogeneizados e processados em moinho tipo Willey, com peneira de 1 mm, também para análises bromatológicas. A composição obtida foi: proteína bruta, 16,7 %; fibra em detergente neutro (FDN), 66,7 %; fibra em detergente ácido (FDA), 32,4 %; lignina, 5,21 %; extrato etéreo, 2,29 %; e cinzas, 6,03 %.

Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial 6x6, sendo seis níveis de Isomix (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 mg de Isomix, ou concentrações de 0,0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 %) e seis níveis de virginiamicina (0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg de virginiamicina 10 %, ou concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 %), em 500 mg de matéria seca de dieta (ou 550 mg de amostra pré-seca), além de dois controles adicionais, com três repetições, totalizando 114 unidades experimentais. Os níveis mais elevados de Isomix e virginiamicina *in vitro* foram bem superiores aos recomendados comercialmente *in vivo*, mas os níveis mais baixos aproximam-se das recomendações, permitindo verificar os limites de efeitos potenciais em condições *in vitro*.

Na preparação dos seis tratamentos com Isomix, foram adicionados 0,873 g de Isomix e 9,13 g da dieta pré-seca em frasco, resultando em mistura contendo 24 mg de Isomix para cada 275 mg de amostra (denominado 24 mg). Diluições secas sucessivas foram realizadas, obtendo-se concentrações de 12, 6, 3 e 1,5 mg de Isomix. O controle (0 mg) correspondeu à dieta pura.

Na preparação dos seis tratamentos com virginiamicina, foram adicionados 0,145 g de virginiamicina (10 %) e 9,86 g da dieta pré-seca em frasco, resultando em mistura contendo 4 mg de virginiamicina para cada 275 mg de amostra (denominado 4 mg). Diluições secas sucessivas foram realizadas, obtendo-se concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mg. O controle (0 mg) correspondeu à dieta pura.

Na fermentação *in vitro*, utilizaram-se 0,275 g de amostra com ou sem Isomix e 0,275 g de amostra com ou sem virginiamicina, dependendo da combinação dos tratamentos (6 x 6), totalizando 0,550 g de amostra pré-seca. Foram adicionados 10 mL de fluido ruminal e 40 mL de tampão McDougall <sup>(9)</sup>, em frascos de penicilina de 100 mL (proporção inoculo:tampão de 1:4). O método de Tilley & Terry <sup>(10)</sup>, considerado padrão para estudos de digestibilidade *in vitro*, foi empregado.

O tampão McDougall <sup>(9)</sup> foi preparado no dia anterior às incubações, em sala climatizada a 39 °C. Antes de cada repetição, o conteúdo ruminal (líquido e sólido) foi coletado em diferentes pontos da interface líquido-sólido do rúmen, acondicionado em recipientes térmicos a 39 °C, homogeneizado por 30 segundos em liquidificador e filtrado em três camadas de gaze em Erlenmeyer de 2 L <sup>(11)</sup>.

O espaço livre dos frascos foi saturado com CO<sub>2</sub>, sendo estes vedados com rolhas de borracha e selos de alumínio, e mantidos sob agitação (40 rpm) em sala climatizada a 39 °C. Os gases da fermentação foram liberados a cada três horas, com auxílio de agulhas. Após 48 horas de incubação, o pH foi medido, e o conteúdo dos frascos transferido para cadiinhos filtrantes, lavados com água destilada a 90 °C. Os cadiinhos foram secos (105 °C/24 h) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da matéria seca.

Para a digestibilidade acetona (30 mL), os cadiinhos foram secos (105 °C/24 h) e pesados, obtendo-se o resíduo de FDN de *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), os cadiinhos com resíduo foram acondicionados em coletores universais autoclaváveis (120 mL), adicionando-se 80 mL de solução detergente neutro produzida segundo Mertens<sup>(12)</sup>, sem sulfito de sódio, e 250 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X). Os coletores foram autoclavados (105 °C/1 h), conforme Detmann *et al.*<sup>(13)</sup>; INCT-CA F-002/1. Após lavagem com água destilada quente, e acetona (30 mL), os cadiinhos foram secos (105 °C/24 h) e pesados, obtendo-se o resíduo de FDN.

Após abertura dos frascos, o líquido foi coletado em tubos Eppendorf, em triplicata por amostra. Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme Siegfried *et al.*<sup>(14)</sup>, utilizando coluna Phenomenex Rezex ROA (300 x 7,8 mm) a 45 °C, em cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 acoplado a detector de índice de refração Shodex RI-101. A fase móvel foi ácido sulfúrico 5 mM, com fluxo de 0,7 mL/min. Padrões externos: ácido propioníco (60 mM), acético (60 mM), butírico (20 mM), valérico (20 mM), isovalérico (5 mM) e isobutírico (10 mM), em diluições sucessivas (1:2, 1:4, 1:16 e 1:32). Ácido crotônico (12,5 mM) foi utilizado como padrão interno.

A concentração de amônia foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney & Marbach<sup>(15)</sup>, com leitura em 630 nm, em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA), utilizando cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) como padrão.

A proteína solúvel foi quantificada no sobrenadante após centrifugação (10.600 x g/10 min), segundo Bradford<sup>(16)</sup>, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A proteína microbiana foi quantificada após centrifugação (10.600 x g/10 min), descarte do sobrenadante e digestão do pellet com NaOH (0,2 N/5 min a 100 °C), seguindo o método colorimétrico de Bradford<sup>(16)</sup>, com BSA como padrão.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS<sup>(17)</sup>, utilizando-se modelo linear geral, adotando-se 5 % de significância (*p* < 0,05). O delineamento fatorial 6x6, composto pelas combinações das concentrações de Isomix e virginiamicina, mais dois controles adicionais, em três repetições, totalizou 114 unidades experimentais. As diferenças entre médias foram avaliadas pelo teste LS-Means Tukey, ao nível de 5 % de significância.

### 3. Resultados e discussão

Houve efeito da virginiamicina sobre o pH, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (Tabela 1). Não foi observado efeito do Isomix nem de suas interações com a virginiamicina sobre essas variáveis (*P*>0,05).

**Tabela 1.** Valores de *P* para algumas variáveis analisadas.

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

DIVMS – digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN – digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; V – virginiamicina; I – Isomix

Em estudo conduzido por Roman<sup>(18)</sup>, com a inclusão de ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR), não foi verificado efeito sobre o pH, assim como observado no presente trabalho. Os valores finais de pH das incubações entre diferentes forragens e a adição de AGVCR variaram de 6,64 a 6,86, estando dentro da faixa considerada ideal para a digestão de fibras no rúmen<sup>(19)</sup>.

A ausência de efeito do Isomix, que contém AGVCR, sobre a digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro foi distinta dos resultados relatados em estudos prévios, nos quais foram observados efeitos positivos sobre a digestibilidade. Liu *et al.*<sup>(20)</sup>, por exemplo, verificaram aumento na concentração ruminal de AGV e na digestibilidade total dos nutrientes. Zhang *et al.*<sup>(21)</sup> avaliaram a inclusão de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) em dietas à base de trigo nas concentrações de 0, 2, 4, 7 e 10 mmol/L, observando efeito linear crescente nos AGVCR com a suplementação de AACR, sendo que a menor concentração (2 mmol/L) permitiu melhor eficiência na fermentação ruminal e digestibilidade da matéria seca e da fibra. Já Suryapratama & Suhartati<sup>(22)</sup> sugerem que a suplementação de 0,05 mM de AGVCR não é suficiente para influenciar o crescimento das bactérias ruminais.

Outros estudos *in vitro* demonstraram que os AGVCR aumentam a fermentação ruminal e a digestão da fibra por estimularem os microrganismos celulolíticos, uma vez que sua suplementação melhora a atividade das enzimas carboximetilcelulase, xilanase e β-glicosidase<sup>(23a)</sup>. A variação nos efeitos da suplementação pode estar relacionada à composição das dietas experimentais, visto que os resultados indicam maior efetividade em dietas à base de gramíneas em comparação às dietas com leguminosas, devido ao maior teor de proteína bruta destas últimas<sup>(23b)</sup>. A literatura também mostra que a resposta da fermentação ruminal e da degradação da fibra seria limitada pela suplementação de AGVCR (na dose de 2 mM) em dietas com elevado teor de proteína bruta e rápida degradação da fibra em detergente neutro<sup>(24)</sup> ou em dietas com baixo teor de carboidratos fermentescíveis<sup>(25)</sup>.

No presente estudo, o pH do meio aumentou com a utilização de virginiamicina (Tabela 2), em concordância com Maciel *et al.*<sup>(26)</sup>, que relataram o potencial da virginiamicina em elevar o pH ruminal de animais recebendo diferentes dietas, com variações na relação volumoso:concentrado. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da população de bactérias utilizadoras de ácido lático e pela redução das bactérias produtoras de ácido lático<sup>(27)</sup>.

A adição de virginiamicina promoveu redução crescente na DIVMS e na DIVFDN (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados por Maciel *et al.*<sup>(26)</sup>, ao avaliar a digestibilidade do capim-Marandu em vacas Nelore recebendo 33,5 mg/100 kg de peso vivo de virginiamicina, em abril e maio, o que pode estar associado ao menor teor de proteína bruta do pasto, reduzindo a degradação dessa proteína e o aporte de nutrientes às bactérias celulolíticas. De forma semelhante, Thorniley *et al.*<sup>(28)</sup>, ao avaliarem diferentes concentrações de virginiamicina em ovelhas alimentadas com palha de trigo, observaram que as maiores doses (80 e 160 mg/dia) reduziram a digestibilidade, associada à menor ingestão de matéria seca.

Quanto à DIVFDN, o comportamento foi semelhante ao relatado por Oliveira *et al.*<sup>(29)</sup>, que avaliaram a suplementação de virginiamicina (150 mg/kg MS) em vacas leiteiras a pasto, verificando redução na digestibilidade da fibra. Tal efeito pode estar relacionado à tendência de redução da amônia com o uso de virginiamicina ou ao efeito tóxico sobre a microbiota ruminal celulolítica. Por outro lado, Silva *et al.*<sup>(30)</sup>, suplementando 22,5 mg/kg de MS de concentrado em vacas mestiças alimentadas com dieta à base de cana-de-açúcar, observaram tendência de aumento da digestibilidade da MS e da FDN, sugerindo melhor ambiente ruminal e maior aproveitamento da fibra.

**Tabela 2.** Valores (médias ± erro padrão)<sup>1</sup> de pH e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro em função dos níveis de virginiamicina.

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

<sup>1</sup>Valores de P na Tabela 1; DIVMS – digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVFDN- digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; A,B,C,D,E – médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

As variáveis DIVFDN e DIVMS apresentaram uma alta correlação positiva (0,89) entre si ( $P < 0,05$ ). Outra variável que também foi analisada e é importante é a concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen, pois esta pode comprometer a atividade dos microrganismos ruminais, especialmente daqueles responsáveis pela degradação dos carboidratos fibrosos. O uso de aditivos seletivos da microbiota ruminal tem como objetivo promover níveis de nitrogênio amoniacal adequados para o crescimento microbiano<sup>(31)</sup>. Considera-se que a concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen pode influenciar a degradação da fibra, e valores acima de 4 mg/dL podem maximizar esse processo<sup>(32, 33)</sup>.

Em nossos resultados, os valores de N-NH<sub>3</sub> (mg/dL = mM × 1,4) ficaram abaixo do nível adequado para melhorar a degradação da fibra nos quatro menores níveis de virginiamicina (Tabelas 3 e 4). Ferreira *et al.*<sup>(34)</sup> não encontraram diferença entre os tratamentos, obtendo valores de 3,961; 3,876 e 4,147 mg/dL no controle e com 108 e 216 mg de virginiamicina/animal/dia, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado no estudo de Salinas-Chavira<sup>(35)</sup>, em que a suplementação com virginiamicina não afetou a quantidade de N-NH<sub>3</sub> nem a eficiência microbiana líquida (g de N microbiano por kg de MO fermentada), mostrando resultados em que os efeitos da virginiamicina sobre os parâmetros ruminais foram muito pequenos. A virginiamicina aumentou o pH, associado ao aumento na concentração de proteína solúvel e amônia.

Por outro lado, nos resultados obtidos por Moreira *et al.*<sup>(36)</sup>, a aplicação de virginiamicina produziu uma redução na concentração de amônia, e o autor atribuiu esse comportamento ao efeito da virginiamicina em inibir a proteólise e a desaminação de aminoácidos, o que pode reduzir o acúmulo de amônia no rúmen e favorecer maior retenção da proteína da dieta no hospedeiro. No caso de Costa<sup>(37)</sup> e Neto *et al.*<sup>(38)</sup>, os resultados foram semelhantes aos nossos (Tabelas 3 e 4), em que a presença de virginiamicina aumentou a disponibilidade de N-NH<sub>3</sub>, podendo-se inferir que a virginiamicina apresentou baixa eficácia no controle do crescimento de bactérias fermentadoras de aminoácidos e na redução da desaminação proteica (*Clostridium aminophilum* e *Clostridium sticklandii*, que são bactérias Gram-positivas).

Além disso, neste estudo também se observou que um fator a ser considerado como influente na concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen é o teor de proteína bruta presente nas forragens e suplementos oferecidos aos animais<sup>(29)</sup>. Proteínas com maiores frações prontamente solúveis sofrem degradação mais rápida no ambiente ruminal, aumentando a concentração de NH<sub>3</sub><sup>(34)</sup>. Outra possível explicação para esse

comportamento é que a virginiamicina pode aumentar a população de protozoários; por exemplo, no estudo de Costa *et al.*<sup>(39)</sup>, foi observado aumento na população de *Entodinium*, responsável por 70 a 75 % da lise bacteriana.

**Tabela 3.** Valores P das variáveis relacionadas a fermentação ruminal.

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

FV – Fonte de variação; V – virginiamicina; I – Isomix; PS – proteína solúvel; PM – proteína microbiana; DPB – degradabilidade da proteína bruta; AGV – ácidos graxos voláteis; A:P – acetato:propionato.<sup>1</sup> Média ± EP = 288 ± 64.3 mg/L;<sup>2</sup> Média ± EP = 0.46 ± 0.17 %

**Tabela 4.** Médias ± erro padrão<sup>1</sup> das variáveis significativas, sem interação, para virginiamicina.

| % V  | NH <sub>3</sub> (mM) | PS (mg/L)        | DPB (%)      | AGV totais (mM) |
|------|----------------------|------------------|--------------|-----------------|
| 0.0  | 2,24±0,74 C          | 166,64±43,43 B   | 34,47±1,82 B | 82,23±16,19 BDE |
| 0.05 | 2,61±0,74 BC         | 189,57±43,43 BD  | 38,25±1,82 A | 82,12±16,19 BDE |
| 0.1  | 2,34±0,73 BC         | 200,20±43,43 ABC | 37,72±1,82 A | 72,63±16,19 ACE |
| 0.2  | 2,77±0,73 BC         | 198,62±43,43 ABC | 40,14±1,82 A | 68,06±16,19 AC  |
| 0.4  | 3,01±0,74 AB         | 233,70±43,43 AC  | 42,43±1,82 A | 62,29±16,19 AC  |
| 0.8  | 3,45±0,74 A          | 213,33±43,43 ACD | 44,46±1,82 A | 61,98±16,19 A   |

<sup>1</sup>Valores de P na Tabela 3; V – virginiamicina; PS – proteína solúvel; DPB – degradabilidade da proteína bruta; AGV – ácidos graxos voláteis; A,B,C,D,E – médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A proteína microbiana pode fornecer até 100 % dos aminoácidos requeridos pelo animal, dependendo da qualidade e/ou quantidade de proteína não degradável no rúmen<sup>(40)</sup>, e sua limitação pode afetar o desempenho animal. No presente estudo, esta não foi afetada pela adição de virginiamicina (Tabela 3), embora a proteína solúvel tenha aumentado com o incremento da concentração de virginiamicina. De forma semelhante, no estudo de Moreira *et al.*<sup>(36)</sup>, a adição de virginiamicina não afetou a concentração de proteína microbiana. Entretanto, foi observada redução na atividade de desaminação específica com a adição de 10 µmol L<sup>-1</sup>, e a concentração de amônia foi inibida com 20 µmol L<sup>-1</sup>. O estudo de Souza *et al.*<sup>(41)</sup> sugere que a ausência de carboidratos solúveis, como açúcares de pasto ou carboidratos insolúveis como o amido, parece ter sido limitante para a síntese microbiana.

A virginiamicina causou redução nos AGV totais (Tabelas 3 e 4), enquanto Coe *et al.*<sup>(42)</sup> e Costa *et al.*<sup>(39)</sup> não encontraram efeito sobre concentração de AGV totais, consumo e digestibilidade. Os autores atribuíram a influência moderada da virginiamicina sobre a fermentação ruminal à baixa presença de *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus bovis* em comparação ao tratamento controle. Outros fatores, como a relação entre as concentrações de AGV no rúmen e o fluxo destes a partir do rúmen, precisam ser considerados ao interpretar as proporções de AGV<sup>(43)</sup>.

Os AGV de cadeia ramificada (AGVCR) e N-NH<sub>3</sub> são obtidos pela degradação da proteína da dieta e também utilizados para crescimento bacteriano e síntese de proteína microbiana<sup>(44)</sup>, embora em nossos resultados (Tabela 3) não tenha sido observado efeito da suplementação de AGVCR via Isomix sobre as concentrações de N-NH<sub>3</sub>, proteína microbiana, proteína solúvel e AGV totais. Outros estudos também relatam que dietas com alto teor de forragem não apresentam efeitos sobre a concentração de N-NH<sub>3</sub><sup>(45)</sup>. Por outro lado, trabalhos têm mostrado redução da atividade de proteases ruminais com suplementação de AGVCR<sup>(46, 47, 48)</sup>. Liu *et al.*<sup>(20)</sup> observaram aumento na síntese de proteína microbiana, relacionado à diminuição do N-NH<sub>3</sub> ruminal com incremento da suplementação de AGVCR.

No presente estudo, os AGV totais não foram afetados pela incorporação de AGVCR, ao contrário do resultado obtido por Zhang *et al.*<sup>(21)</sup>, ao suplementar aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) separadamente, encontrando aumento na concentração de AGV totais nos três casos. Eles também observaram incremento no pH final, enquanto no nosso caso o pH não foi influenciado pela adição de AGVCR via Isomix. No estudo de Wang *et al.*<sup>(23)</sup>, o aumento de AGV foi justificado pelo crescimento de bactérias celulolíticas e pela maior atividade enzimática, em que a suplementação com AGVCR aumentou o consumo de matéria seca, proporcionando mais substrato à fermentação microbiana e, consequentemente, aumentando a concentração de AGV. Os autores observaram comportamento linear decrescente do propionato, associado ao aumento da proporção molar de acetato e da relação acetato:propionato. Sugeriram, portanto, que a fermentação ruminal foi afetada, com maior produção de ácido acético, similar aos resultados de outros estudos<sup>(49, 20)</sup>. Por outro lado, a concentração de valerato não variou neste estudo, assim como relatado por Wang *et al.*<sup>(23)</sup>. No caso do isobutirato, houve crescimento com o aumento da concentração de AGVCR (Tabela 5), em concordância com os resultados de Liu *et al.*<sup>(49)</sup>, justificado pela suplementação exógena de AGVCR, neste caso do produto Isomix.

**Tabela 5.** Médias ± erro padrão<sup>1</sup> das variáveis significativas, sem interação, para Isomix.

| Item          | % de Isomix |            |            |            |            |            |
|---------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|               | 0,0         | 0,3        | 0,6        | 1,2        | 2,4        | 4,8        |
| Isobutirato % | 0,35±0,48C  | 0,42±0,48C | 0,52±0,48C | 0,64±0,48C | 0,99±0,48B | 1,40±0,48A |

<sup>1</sup>Valores de P na Tabela 3; I – Isomix; A-C – médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

No presente estudo, para os parâmetros acetato, propionato, butirato, isovalerato e a relação acetato:propionato, foi encontrada interação entre os aditivos (Tabela 6). A dosagem recomendada *in vivo* em g de Isomix/g de MS da dieta reproduziu o melhor resultado *in vitro*, como pode ser observado nos AGV, com aumento de propionato e redução da relação acetato:propionato. *In vitro*, foram utilizados níveis acima e abaixo da recomendação *in vivo* de 28 g Isomix/kg de MS. É possível que o Isomix contenha ionóforos, como a monensina, que atuam reduzindo a relação acetato:propionato<sup>(50)</sup>.

Os resultados obtidos por Liu *et al.*<sup>(25)</sup> mostram que o aumento de AGV totais sugere melhora na fermentação ruminal e no aproveitamento de nutrientes com a suplementação de AGVCR, e o incremento de acetato foi obtido à medida que aumentava a digestibilidade da FDN e da FDA. A produção de propionato não foi afetada, o que significa que a suplementação de AGVCR não influenciou o crescimento de bactérias produtoras de propionato. Além disso, estudos anteriores mostraram que bactérias amilolíticas e amilase não foram alteradas<sup>(46, 47, 48)</sup>, mas os AGV totais e a relação acetato:propionato aumentaram com a suplementação de AGVCR.

**Tabela 6.** Teste de médias das variáveis significativas, com interação, para virginiamicina e Isomix.

| Isomix             | Virginiamicina |            |            |           |           |             |
|--------------------|----------------|------------|------------|-----------|-----------|-------------|
|                    | 0,0            | 0,05       | 0,1        | 0,2       | 0,4       | 0,8         |
| Acetato            |                |            |            |           |           |             |
| 0,0                | 61,95 Aab      | 55,91 Abc  | 54,48 ABc  | 63,05 Aa  | 62,41 Aab | 52,01 Ac    |
| 0,3                | 66,60 ABabc    | 56,08 Aabc | 53,21 ABbc | 59,27 Aab | 62,33 Aa  | 50,02 Abc   |
| 0,6                | 62,40 Aa       | 53,14 Ab   | 58,06 ABab | 62,21 Aa  | 60,84 Aa  | 41,84 Cc    |
| 1,2                | 43,95 Cd       | 49,91 Acd  | 55,32 ABbc | 62,64 Aa  | 61,25 Aab | 48,49 ABCcd |
| 2,4                | 53,86 Bb       | 52,12 Abc  | 52,51 Bbc  | 64,01 Aa  | 61,49 Aa  | 45,74 ABCc  |
| 4,8                | 54,8 Bb        | 54,52 Ab   | 59,74 Aab  | 62,79 Aa  | 60,03 Aab | 44,89 BCc   |
| Propionato         |                |            |            |           |           |             |
| 0,0                | 27,30 Bbc      | 34,66 Aab  | 34,82 ABab | 25,83 Ac  | 26,66 Abc | 37,36 Ba    |
| 0,3                | 34,38 Babc     | 32,21 Abc  | 36,91 ABab | 30,11 Abc | 28,34 Ac  | 41,45 Ba    |
| 0,6                | 27,82 Bb       | 35,16 Ab   | 31,54 ABb  | 27,52 Ab  | 27,40 Ab  | 54,00 Aa    |
| 1,2                | 47,02 Aa       | 39,06 Aab  | 33,34 ABbc | 26,91 Ac  | 28,76 Ac  | 37,96 Bb    |
| 2,4                | 33,91 Bab      | 36,33 Aa   | 38,45 Aa   | 25,29 Ac  | 26,84 Abc | 40,25 Ba    |
| 4,8                | 32,46 Bb       | 31,72 Ab   | 28,30 Bb   | 25,39 Ab  | 24,58 Ab  | 43,01 Ba    |
| Butirato           |                |            |            |           |           |             |
| 0,0                | 8,89 Aab       | 7,63 Ab    | 8,67 Aab   | 10,20 Aa  | 10,09 Aab | 8,02 Aab    |
| 0,3                | 8,53 Aa        | 8,59 Aa    | 8,29 Aa    | 9,29 Aa   | 8,85 Aa   | 7,90 Aa     |
| 0,6                | 8,40 Aa        | 8,21 Aa    | 9,38 Aa    | 9,65 Aa   | 10,25 Aa  | 3,73 Ab     |
| 1,2                | 6,78 Ab        | 7,56 Aab   | 8,30 Aab   | 9,53 Aa   | 8,72 Aab  | 8,07 Aab    |
| 2,4                | 8,21 Aa        | 7,54 Aa    | 9,43 Aa    | 8,64 Aa   | 9,52 Aa   | 7,38 Aa     |
| 4,8                | 8,23 Aa        | 8,04 Aa    | 8,23 Aa    | 8,14 Aa   | 9,52 Aa   | 7,32 Ba     |
| Isovalerato        |                |            |            |           |           |             |
| 0,0                | 0,71 Ba        | 0,81 Ba    | 1,41 Aa    | 0,15 Ba   | 0,31 Ba   | 2,28 BCa    |
| 0,3                | 0,36 Ba        | 1,90 ABa   | 1,14 Aa    | 0,35 ABa  | 0,12 Ba   | 0,07 Da     |
| 0,6                | 0,59 Ba        | 2,06 ABa   | 0,50 Aa    | 0,29 ABa  | 0,33 Ba   | 0,30 CDa    |
| 1,2                | 1,78 ABb       | 2,07 ABb   | 2,38 Ab    | 0,34 ABb  | 0,50 Bb   | 4,66 Aa     |
| 2,4                | 2,43 ABb       | 2,71 ABb   | 1,51 Ab    | 0,75 ABb  | 0,74 Bb   | 5,60 Aa     |
| 4,8                | 3,90 Aa        | 3,84 Aa    | 1,63 Ab    | 2,43 Aab  | 4,02 Aa   | 3,99 ABa    |
| Acetato:Propionato |                |            |            |           |           |             |
| 0,0                | 2,27 Aa        | 1,62 Ab    | 1,58 ABb   | 2,45 Aa   | 2,35 Aa   | 1,43 Ab     |
| 0,3                | 1,69 ABab      | 1,75 Aab   | 1,44 Bb    | 2,06 Aa   | 2,20 Aa   | 1,23 ABb    |
| 0,6                | 2,25 Aa        | 1,51 Ab    | 1,85 Aab   | 2,27 Aa   | 2,23 Aa   | 0,79 Bc     |
| 1,2                | 0,94 Cc        | 1,28 Abc   | 1,66 ABb   | 2,34 Aa   | 2,14 Aa   | 1,30 ABbc   |
| 2,4                | 1,60 Bbc       | 1,44 Ac    | 1,40 Bc    | 2,55 Aa   | 2,29 Aa   | 1,14 ABC    |
| 4,8                | 1,71 ABb       | 1,72 Ab    | 2,13 Aab   | 2,48 Aa   | 2,47 Aa   | 1,05 ABC    |

I – Isomix; V – virginiamicina; A,B,C,D – médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma coluna, e a,b,c,d – médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha, dentro de cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.<sup>1,2,3,4,5</sup> Erro padrão para acetato = 3,698; propionato = 4,635; butirato = 1,083; isovalerato = 0,889; e A:P = 0,289.

No estudo de Costa <sup>(37)</sup>, a virginiamicina aumentou a proporção de propionato e reduziu acetato e butirato, coincidindo com o resultado de Wolin <sup>(51)</sup>, o que significa que esta é a via mais eficiente de fermentação de carboidratos no rúmen. Nesse mesmo estudo de Costa <sup>(37)</sup>, foi demonstrado que em 33,3 % dos trabalhos houve aumento de propionato e em 66,7 % não houve alteração ou até redução de propionato com o uso de virginiamicina. Segundo Neto et al. <sup>(38)</sup>, a virginiamicina promove o aumento de bactérias produtoras de butirato, como *Butyrivibrio*, o que pode explicar a melhoria na eficiência dos animais, uma vez que o butirato é a principal fonte de energia para as células epiteliais, e seu aumento pode favorecer a maior absorção de nutrientes.

Nos resultados de Moreira et al. <sup>(36)</sup>, observou-se aumento do pH e, além disso, redução nos AGV e na relação acetato:propionato, o que pode ter ocorrido devido à capacidade de inibir a produção de ácidos orgânicos associada ao uso de aminoácidos e fontes de energia, como isobutírico, valérico e isovalérico. Também foi observado aumento do propionato, assim como em nossos dados para maior concentração de virginiamicina (Tabela 6).

## 4. Conclusão

O Isomix e a virginiamicina não melhoraram a digestibilidade, porém o Isomix aumentou o propionato e reduziu a relação acetato:propionato, podendo potencialmente melhorar o balanço energético e o desempenho. No entanto, recomenda-se a realização de mais pesquisas, especialmente em dietas com baixo teor de proteína e suplementação de ureia em sistemas de pastejo tropical.

### Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação.

### Contribuições do autor

Conceituação: S. A. Salinas e R. Hancco. Curadoria de dados: R. Lana. Obtenção de financiamento: R. Lana. Supervisão: R. Lana. Investigação: S. A. Salinas e P. S. Dornelas. Visualização: S. A. Salinas e M. Soares. Redação (versão original): S. A. Salinas. Redação (revisão e edição): R. Lana.

### Referências

1. Feng YL. Ruminant nutrition. Beijing, China: Science Press. 2004.636p.
2. Val Neto ER, Lana RP, Val HN, Leao MI, Mancio AB. Evaluation of performance of lactating dairy. Journal of Animal Science. 2010; 88.
3. Dilorenzo N. Manipulation of the rumen microbial environment to improve performance of beef cattle. Proceedings of the 22nd Florida Ruminant Nutrition Symposium. North Florida Research and Education Center, University of Florida. 2011. 118-132p.
4. Callaway TR, Edrington TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS, et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. Current Issues in Intestinal Microbiology. 2003; 4 (2): 43-51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14503688/>
5. Santos J, Rocha V, Campos T, Gomes R, Napar P, Matanna H, Silvia F, Braga R. Suplementação com virginiamicina e monensina em dietas de vacas leiteiras com alta inclusão de concentrado. Pubvet. 2019; 13 (12): 1-13. doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n12a480.1-13>
6. Rogers JA, Branine ME, Miller CR, Wray MI, Bartle SJ, Preston RL, Gill DR, Pritchard RH, Stilborn RP, Bechtol DT. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. Journal of Animal Science. 1995; 73(1): 9-12. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.7319>
7. Wilson DB. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. Ann. N. Y. Academic Science. 2008; 1125: 289-297. doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1419.026>

8. Roman-Garcia, Y., Mitchell, K. E., Denton, B. L., Lee, C., Socha, M. T., Wenner, B. A., & Firkins, J. L. (2021). Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 104(9), 9853–9867. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20335>
9. McDougall EL. Studies on ruminant saliva. The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical journal*. 1949; 43: 99-109. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16748377/>
10. Tilley J, Terry R. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal British Grassland Society*. 1963; 18 (2): 104-111. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
11. Silva BC, Pacheco MVC, Godoi LA, Alhadas HM, Pereira JMV, Rennó LN, et al. Reconstituted and ensiled corn or sorghum grain: Impacts on dietary nitrogen fractions, intake, and digestion sites in young Nellore bulls. *PLoS ONE*. 2020; 15(8): e0237381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237381>
12. Mertens D. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal AOAC International*. 2002; 85 (6): 1217-1240.
13. Detmann E, Souza M, Valadares Filho SC, Queiroz AC Berchielli TT, Saliba E, Cabral L, Pina L, Ladeira M, Azevedo J. *Métodos para análise de alimentos*. Suprema: Visconde do Rio Branco. 2012; p,204. ISBN 978-65-995122-2-3
14. Siegfried R, Ruckemann H, Stumpf G. Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography. *Landwirtschaftliche Forschung*. 1984; 37(3-4): 298-304. URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:209722138>
15. Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry*. 1962; 8(2); 130-132. doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
17. SAS. Statistical Analysis System for windows. Release 8.01, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA. 2000.
18. Roman Y. Assessing Dietary Conditions Influencing the Requirements by Rumen Bacteria for Branched Chain Volatile Fatty Acids. These of doctorate. Animal Science. The Ohio State University. 2019. Disponível em: [http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc\\_num=osu1557171743925883](http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1557171743925883)
19. Mackie RI, White BA. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science*. 1990; 73(10): 2971 – 2995. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78986-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78986-2)
20. Liu Q, Wang C, Liu Q, Guo G, Huo W, Zhang Y, Pei C, Zhang S. Effects of branched-chain volatile fatty acids on lactation performance and mRNA expression of genes related to fatty acid synthesis in mammary gland of dairy cows. *Animal*. 2018; 12 (10), 2071–2079. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731118000113>
21. Zhang HL, Chen L, Xia, Y. Effects of branched-chain amino acids on *in vitro* ruminal fermentation of wheat straw. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013; 26 (4): 523–528. doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12539>
22. Suryapratama W, Suhartati FM. Effect of supplementation of branched chain fatty acid on colony of ruminal bacteria and cell of protozoa. *Journal of Animal Production*. 2009; 11(2): 129–134. ISSN 2541-5875. Disponível em: <http://www.animalproduction.net/index.php/JAP/article/view/234>
- 23a. Wang C, Liu Q, Guo G, Huo W, Zhang Y, Pei C, Zhang, S. Effects of rumen-protected folic acid and branched-chain volatile fatty acids supplementation on lactation performance, ruminal fermentation, nutrient digestion and blood metabolites in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 2018; 99(13):5826-5833. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9853>.
- 23b. Neto, ER. Branched-chain amino acids in cattle nutrition. (Dissertação). Viçosa-MG: Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa; 2009. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/5956>
24. Yang C. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. American Dairy Science Association. 2002; 85: 1183-1190. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74181-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74181-7)
25. Liu Q, Wang C, Liu Q, Guo G, Huo W, Zhang Y, Pei C, Zhang S. Effects of branched-chain volatile fatty acids and fibrolytic enzyme on rumen development in pre- and post-weaned Holstein dairy calves. *Animal Biotechnology*. 2019; 31 (6): 512–519. doi: <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1633340>
26. Maciel ICF, Saturnino HM, Barbosa FA, Malacco VMR, Andrade JMC, Maia GHB, Costa PM. Suplementação com virginiamycinina e monensina sódica para bovinos de corte a pasto. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2019; 71, 1999-2008. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10659>
27. Guo T, Wang J, Liu K, Wang J, Li D, Luan S, Huao X. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using time PCR in steers. *Journal of animal Science*. 2010; 55(7): 276-285, 2010. doi: <https://doi.org/10.17221/74/2009-CJAS>
28. Thorniley GR, Boyce MD, Rowe JB. Changes in feed intake and digestibility in sheep given virginiamycin. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1996; 47(4): 539–544. doi: <https://doi.org/10.1071/AR9960539>
29. Oliveira IS, de Pauda D, Queiroz A, Macedo B, Garcia D, Eloisa I, Weich R. Salinomycin and virginiamycin for lactating cows supplemented on pasture. *Scientia Agricola*. 2015; 72(4): 285–290. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0401>

30. Silva JSS, Rocha VM, Campos T, Gomes R, Nazar PV, Mattana H, Braga R. Suplementação com virginiamicina e monensina em dietas de vacas leiteiras com alta inclusão de concentrado. *Pubvet*. 2020; 13 (12). doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n12a480.1-13>
31. Ferreira SF, Resende J, Pádua, J, Oliveira U, Freitas M, Gomes R. Use of virginiamycin and salinomycin in the diet of beef cattle reared under grazing during the rainy season: Performance and ruminal metabolism. *Ciência Animal Brasileira*. 2019; 20, 1–10. doi: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-26867>
32. Satter LD, Slyter LL. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production *in vitro*. *The British journal of nutrition*. 1974; 32 (2): 199–208. doi: <https://doi.org/10.1079/bjn19740073>
33. Hoover WH. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of dairy science*. 1986; 69(10): 2755–2766. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80724-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80724-X)
34. Ferreira SF, Resende J, Padua J, Oliveira U, Sales M, Souza A, Aparecido E, Grandini, D. Desempenho e metabolismo ruminal em bovinos de corte em sistema de pastejo no período seco do ano recebendo virginiamicina na dieta. *Semina: Ciências Agrárias*. 2015; 36(3): 2067–2078. doi: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2067>
35. Salinas-Chavira, Lenin J, Ponce U, Sanchez N, Torrenetera RA. Lenin. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. *Journal of Animal Science*. 2009; 87(12): 4101–4108. doi: <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1959>
36. Moreira S, Pereira CB, Azevedo AC, Montavani H. Effects of Bovicin HC5 and Virginiamycin on *in vitro* Ruminal Fermentation and Microbial Community Composition. *Journal of Agricultural Science*. 2018; 10(8): 156. doi: <https://doi.org/10.5539/jas.v10n8p156>
37. Costa J, Fernandes HJ, Silva AG, Rosa EP, Santos Y. Homeopathic additives and virginiamycin® in grazing beef cattle. *Revista Ciência Agronômica*. 2020; 51 (2). doi <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200026>
38. Neto JA, Oliveira I, Moretti M, Siqueira G. Determining the optimal dose of virginiamycin for ruminal parameters and performance of Nellore cattle on pasture. *Semina: Ciencias Agrarias*. 2018; 39(4): 1749–1758. doi: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n4p1749>
39. Costa JP, Jesus R, Oliveira A, Resende F, Siqueira G, Malheiros E. Does virginiamycin supplementation affect the metabolism and performance of Nellore bulls grazing under low and high gain rates? *Animal Science Journal*. 2018; 89 (10): 1432–1441. doi: <https://doi.org/10.1111/asj.13052>
40. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press. 1996.
41. Souza MA, Detmann E, Paulino MF, Sampaio CB, Lazzarini I, Valadares-Filho SC. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fibre in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. *Tropical animal health and production*. 2010; 42(6): 1299–1310. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9566-6>
42. Coe ML, Nagaraja TG, Sun Y, Wallace N, Kemp K, Hutcheson J. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *Journal of Animal Science*. 1999; 77 (8): 2259–2268. doi: <https://doi.org/10.2527/1999.7782259x>
43. Cummins KA, Papas AH. Effect of Isocarbon-4 and Isocarbon-5 Volatile Fatty Acids on Microbial Protein Synthesis and Dry Matter Digestibility In Vitro. *Journal of Dairy Science*. 1985; 68(10): 2588–2595. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81141-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81141-3)
44. Clayton EH, Lean IJ, Rowe JB, Cox J. Effects of Feeding Virginiamycin and Sodium Bicarbonate to Grazing Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82 (7): 1545–1554. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75382-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75382-8)
45. Mccollum FT, Kim YK, Owens FN. Influence of supplemental four- and five-carbon volatile fatty acids on forage intake and utilization by steers. *Journal of Animal Science*. 1987; 65 (6): 1674–1679. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1987.6561674x>
46. Liu Q, Wang, C, Pei C, Li H, Wang Y, Zhang S, Zhang Y, He J, Wang H, Yang W, Bai Y, Shi Z, Liu X. Effects of isovalerate supplementation on microbial status and rumen enzyme profile in steers fed on corn stover based diet. *Livestock Science*. 2014; 161: 60–68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.12.034>
47. Wang C, Liu Q, Zhang Y, Pei C, Zhang S, Wang Y, Yang W, Bai Y, Shi Z, Liu X. Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2015; 99 (1): 123–131. doi: <https://doi.org/10.1111/jpn.12191>
48. Zhang YL, Liu Q, Wang C, Pei C, Li H, Wang Y, Yang W, Bai Y, Shi Z, Liu X. Effects of supplementation of Simmental steers with 2-methylbutyrate on rumen microflora, enzyme activities and methane production. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 199, 84–92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.003>
49. Liu Q, Wang C, Huang Y, Dong K, Yang, W, Zhang S, Wang H. Effects of isoalurate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2009; 93(6): 716–725. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00861.x>
50. Lana RP, Russell JB. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. *Journal of animal Science*. 1997; 75 (1): 224–229. doi: <https://doi.org/10.2527/1997.751224x>
51. Wolin M.J. Theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*. 1960; 43 (10):1452–1459. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(60\)90348-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(60)90348-9)