



EUGENIO FARIA BARBOSA

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO À
SUPLEMENTAÇÃO COM MONENSINA EM DIETAS
DIFERINDO NA CAPACIDADE ACIDOGÊNICA RUMINAL**

LAVRAS – MG

2017

EUGENIO FARIA BARBOSA

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO À SUPLEMENTAÇÃO COM
MONENSINA EM DIETAS DIFERINDO NA CAPACIDADE ACIDOGÊNICA
RUMINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Co-orientadora

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio (a) autor (a).**

Barbosa, Eugenio Faria.

Resposta de vacas leiteiras em lactação à suplementação
com monensina em dietas diferindo na capacidade
acidogênica ruminal: Monensina e amido para vacas leiteiras /
Eugenio Faria Barbosa. Lavras; UFLA, 2017.

136 p.

Orientador (a): Marcos Neves Pereira.

Coorientador (a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Eficiência alimentar. 2. Ionóforo. 3. Amido.

EUGENIO FARIA BARBOSA

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO À SUPLEMENTAÇÃO COM
MONENSINA EM DIETAS DIFERINDO NA CAPACIDADE ACIDOGÊNICA
RUMINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de Abril de 2017

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira - DZO/UFLA

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila - DZO/UFLA

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira - EPAMIG Lavras/MG

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Co-orientadora

LAVRAS – MG

2017

À Deus e à Nossa Senhora Aparecida por terem me concedido saúde e determinação.
À minha esposa Janssiane Rodrigues Barbosa pelo companheirismo, incentivo, dedicação e esforço para que eu pudesse realizar o mestrado.

À minha mãe Maria Auxiliadora de Faria Barbosa (*in memoriam*).

E a todos os familiares e amigos que compartilharam este desafio do mestrado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcos Neves Pereira pela dedicação durante a orientação e ensinamentos transmitidos, por me recepcionar muito bem no Grupo do Leite e por sua grande contribuição na minha vida profissional.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila e à Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Zootecnia da UFLA pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência.

Aos colegas e amigos da pós-graduação e graduação, integrantes e ex-integrantes do Grupo do Leite que contribuíram no meu projeto de pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco pela imensa contribuição durante o mestrado.

À MCassab Indústria e Comércio Ltda pelo apoio financeiro durante o estudo.

RESUMO

A suplementação de vacas leiteiras com Monensina (MON) pode interagir com a composição da dieta. Foi avaliada a resposta de vacas em lactação à suplementação com monensina em dietas diferindo na capacidade acidogênica ruminal. Vinte e oito vacas da raça Holandês com (157 ± 76 dias em lactação) foram alimentadas individualmente, em *tie stall* com uma dieta de padronização por 3 semanas e, em seguida, foi fornecido o tratamento monensina (MON 300 mg/d) ou controle (CTL) por 9 semanas, em um delineamento de blocos ao acaso ajustados para covariável. Foi oferecida, à partir do 1º ao 35º dia, uma dieta pouco acidogênica (LOW - 25,8% amido MS) e uma dieta muito acidogênica (HIGH - 30% amido MS) do 36º ao 63º dia. HIGH foi formulada substituindo o caroço de algodão e o milho maduro finamente moído por uma mistura iso-nitrogênio de farelo de soja e milho maduro finamente moído reidratado e ensilado. Os dados foram coletados diariamente ou após adaptação à LOW e a HIGH e foram analisados como medidas repetidas. O quadrado médio para a vaca aninhada dentro do tratamento foi o termo do erro para o efeito do tratamento. O consumo de MO digestível (CMOD) aumentou na dieta HIGH (14,7 vs. 14,3 kg/d) e reduziu com a suplementação de MON (14,2 vs. 15,2 kg/d). A produção de leite não foi afetada pela MON (32,3 kg/d). A MON reduziu o consumo de matéria seca (CMS) e aumentou as eficiências Leite/CMS, Leite corrigido para energia/CMS, Leite corrigido para energia/CMOD e a concentração de glicose plasmática apenas na dieta HIGH. A MON reduziu a relação acetato:propionato no fluido ruminal em ambas as dietas (2,43 vs. 1,81). A dieta HIGH reduziu o pH ruminal. A concentração de D-lactato plasmático aumentou na dieta HIGH e foi reduzido por MON em ambas as dietas. A HIGH aumentou a concentração de protozoários. A MON reduziu a digestibilidade da FDN no trato total, mais na dieta LOW (52,1 vs. 41,3% consumo) do que na dieta HIGH (57,0 vs. 52,0% consumo). A excreção diária de alantoína na urinária não foi afetada pela MON, nem o NUP em 0, 1,5 e 3 h após a alimentação. A MON induziu menor seleção de partículas longas e os animais tiveram preferência por ingestão de partículas curtas, à tarde, comparada ao CTL. A duração e o intervalo das refeições foram reduzidos pela MON apenas na dieta HIGH. A HIGH tendeu reduzir o pH no sangue e aumentou as concentrações e as produções dos ácidos graxos (AG) de cadeia curta, e reduziu as concentrações dos AG de cadeia longa no leite. A MON não afetou as concentrações e as produções dos AG de cadeia curta, média e longa no leite, mas reduziu as produções dos AG de cadeia ímpar e ramificada (C15:0 iso + C17:0 iso) na gordura do leite. O efeito positivo da MON sobre a eficiência alimentar ocorreu apenas quando a capacidade acidogênica ruminal da dieta foi aumentada.

Palavras-chave: Eficiência alimentar. Ionóforo. Glicose no plasma. Amido.

ABSTRACT

Monensin (MON) supplementation of dairy cows can interact with diet composition. The response of lactating dairy cows to MON supplementation of diets differing in ruminal acidogenic capacity was evaluated. Twenty-eight Holstein cows were individually fed a standard diet for 3 weeks and MON (300 mg/d) or control (CTL) for 9 weeks, in a covariate adjusted randomized block design. A low acidogenic diet (LOW, 25.8% starch) was offered from d 1 to 35 and a high acidogenic diet (HIGH, 30.0% starch) from d 36 to 63. Diet HIGH was formulated by replacing whole cottonseeds and finely ground corn by an iso-nitrogenous mixture of soybean meal and rehydrated and ensiled ground corn. Data were collected daily or after adaptation to LOW and HIGH and were analyzed as repeated measures. The mean square for cow nested within treatment was the error term for the treatment effect. Digestible organic matter intake was increased by HIGH (14.7 vs. 14.3 kg/d) and decreased by MON (14.2 vs. 15.2 kg/d) and milk yield was similar (32.3 kg/d). The MON reduced dry matter intake (DMI) and increased the ratios of milk to DMI, energy corrected milk to DMI, energy corrected milk to digestible organic matter intake and plasma glucose concentration only when HIGH was fed. The MON reduced the acetate to propionate ratio in ruminal fluid in both diets (2.43 vs. 1.81). The HIGH reduced ruminal pH. Plasma D-lactate concentration was increased by HIGH and decreased by MON. The HIGH increased total protozoa concentration in ruminal fluid. The MON reduced total tract neutral detergent fiber digestibility more in LOW (52.1 vs. 41.3% of intake) than in HIGH (57.0 vs. 52.0% of intake). Daily urinary allantoin excretion did not respond to MON, neither plasma urea-N at 0, 1.5, and 3 h post feeding. The MON induced lower degree of refusal of long feed particles and of preferential intake of short particles in the afternoon than CTL. Meal duration and interval was reduced by MON only when HIGH was fed. The HIGH tended to reduce jugular blood pH, increased the concentrations and yields of short-chain fatty acid (FA), and reduced the concentrations of long chain FA in milk. The MON did not affect the concentrations and yields of short, medium, and long chain FA, but reduced yields of odd and branched-chain FA (C15:0 iso plus C17:0 iso) in milk fat. The positive effect of MON on feed efficiency occurred only when diet acidogenic capacity was increased.

Key words: Feed efficiency. Ionophore. Glucose in plasma. Starch

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

- TABLE 1.** Ingredient and nutrient composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) of the low acidogenic diet fed on weeks 1 to 5 (LOW) and of the high acidogenic diet fed on weeks 6 to 9 (HIGH).....117
- TABLE 2.** Model evaluation (NRC 2001) of the diets on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet fed on weeks 1 to 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 6 to 9 (HIGH).....118
- TABLE 3.** Intake, lactation performance, milk urea-N, feed efficiency, BW, and BCS of dairy cows during the 9 weeks of the experiment on treatments Control (CTL) and Monensin (MON).....119
- TABLE 4.** Total tract apparent digestibility (D) of DM, OM, NDF, Non-NDF OM, and starch (% of intake), digestible OM intake (DOMI, kg/d), and ECM/DOMI (kg/kg) of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....120
- TABLE 5.** Ruminal fluid VFA proportions (mol/100 mol), acetate/propionate ratio (A/P), ruminal pH, total protozoa concentration ($\times 10^5$ /mL), urinary allantoin excretion (Alla, mmol/d), Alla/digestible OM intake (Alla/DOMI, mmol/kg), and plasma D-lactate concentration on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....121
- TABLE 6.** Plasma urea-N (PUN, mg/dL) 0, 1.5, and 3 h post feeding of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)...122

TABLE 7. Proportion of intake in periods of the day (% of daily intake), starch, NDF, and feed particles sorting behavior (Observed/Predicted, %), chewing activity, and meal pattern of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....123

TABLE 8. Jugular blood acid-base balance 8 h post-feeding of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (Low) and with the high acidogenic diet on week 9 (High).....124

TABLE 9. Fatty acid proportions in milk fat (g/100 g fatty acids) of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)...125

TABLE 10. Fatty acid secretion in milk fat (g/d) of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....126

TABLE 11. Odd and branched-chain fatty acid (OBCFA) proportions in milk fat (g/100 g fatty acids) of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....127

TABLE 12. Odd and branched-chain fatty acid (OBCFA) secretion in milk fat (g/d) of dairy cows on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH).....128

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

FIGURE 1. Daily means of the Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall. 3023 recordings at 30-min intervals. Temperature: 18.2 ± 4.8 °C. Humidity: $83.0 \pm 14.0\%$. THI: 64.8 ± 5.5 . $\text{THI} \geq 68$: 29.6% of time. $\text{THI} \geq 72$: 14.0% of time. Mean THI during days 1 to 35 (diet LOW): 64.9 ± 2.07 . Mean THI during days 36 to 63 (diet HIGH): 64.6 ± 1.43129

FIGURE 2. Milk fat concentration on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.06$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.08$ on wk 6, $P = 0.04$ on wk 7, $P = 0.03$ on wk 8, $P = 0.03$ on wk 9.....130

FIGURE 3. Milk yield, dry matter intake (DMI), and Milk/DMI on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. P -values for the interactions between treatment and week: 0.19 for Milk, 0.01 for DMI, < 0.01 for Milk/DMI. Slice option: $P < 0.01$ on wk 6, $P < 0.01$ on wk 7, $P < 0.01$ on wk 8, $P < 0.01$ on wk 9 for DMI. $P = 0.08$ on wk 7, $P < 0.01$ on wk 8, $P < 0.01$ on wk 9 for Milk/DMI.....131

FIGURE 4. Milk yield of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). P -values: 0.93 for treatment, 0.17 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), 0.10 for the interaction between treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).....132

FIGURE 5. Dry matter intake (DMI) of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). P -values: 0.05 for treatment, 0.04 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), < 0.01 for the interaction between

treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).
.....133

FIGURE 6. Feed efficiency defined by the ratio between milk yield and DMI of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). P -values: 0.09 for treatment, < 0.01 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), < 0.01 for the interaction between treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).....134

FIGURE 7. Ratio of ECM to digestible OM intake (DOMI) on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.04$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.08$ on wk 6, $P = 0.05$ on wk 7, $P = 0.01$ on wk 8, $P < 0.01$ on wk 9.....135

FIGURE 8. Plasma glucose concentration on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.05$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.09$ on wk 6, $P < 0.01$ on wk 7, $P < 0.01$ on wk 8, $P = 0.05$ on wk 9.....136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Histórico e uso da monensina	15
2.2 Mecanismo de ação da monensina	16
2.3 Sensibilidade das bactérias ruminais à monensina	17
2.4 Adaptação das bactérias ruminais à monensina.....	21
2.5 Metabolismo de vacas leiteiras suplementadas com monensina	25
2.5.1 Concentração de D-lactato no plasma e pH ruminal	25
2.5.2 Perfil da fermentação ruminal.....	30
2.5.3 Digestibilidade de fibra.....	38
2.5.4 Proteólise e desaminação no rúmen.....	43
2.5.5 Bio-hidrogenação no rúmen e perfil de ácidos graxos na gordura do leite	48
2.5.6 Consumo de matéria seca	53
2.5.7 Produção e composição do leite	55
2.5.8 Eficiência alimentar	60
2.5.9 Suplementação de vacas leiteiras em lactação com monensina em dietas diferindo na capacidade acidogênica ruminal.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	89
ARTIGO RESPONSE OF LACTATING DAIRY COWS TO MONENSIN SUPPLEMENTATION OF DIETS DIFFERING IN RUMINAL ACIDOGENIC CAPACITY	89

1 INTRODUÇÃO

A monensina é um ionóforo carboxílico produzido por *Streptomyces cinnamomensis* (HANEY; HOEHN, 1967) capaz de afetar seletivamente o transporte de íons através das membranas celulares e induzir o uso fútil de energia por microrganismos e subsequente morte celular (RUSSELL, 1987). A monensina tem sido extensivamente avaliado como uma ferramenta para manipular a fermentação ruminal (ELLIS et al., 2012) e meta-análises completas sobre a eficácia da monensina para vacas leiteiras em lactação estão disponíveis (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003; DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008b). A monensina pode aumentar a produção de propionato e reduzir a de acetato no rúmen (VAN MAANEN et al., 1978; ARMENTANO; YOUNG, 1983) impactando positivamente a gliconeogênese hepática (KARCHER et al., 2007). A suplementação com monensina para vacas leiteiras pode promover ganho na eficiência alimentar, por aumento da produção de leite e redução do consumo de matéria seca (CMS) (DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008b), pode favorecer o controle da acidose ruminal (NAGARAJA et al., 1981) e da cetose (DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008a, MULLINS et al., 2012), sendo desejável ambientalmente, uma vez que pode reduzir a produção de metano (CH₄) (APPUHAMY et al., 2013) e a perda de nitrogênio (N) na urina (BERGEN; BATES, 1984). A monensina também pode aumentar o *bypass* ruminal da proteína alimentar (ZINN; PLASCENCIA; BARAJAS, 1994; SURBER; BOWMAN, 1998) por inibição da desaminação de proteínas (CHEN; RUSSELL, 1990), e pode melhorar o valor nutricional dos produtos lácteos, aumentando a concentração de ácidos graxos (AG) linoleicos conjugados (CLA) na gordura do leite (FELLNER et al., 1997; DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008b). A suplementação com MON pode reduzir a concentração de gordura do leite, mas a produção de gordura não necessariamente segue a mesma tendência (MULLER; BARGO; IPHARRAGUERRE, 2006; DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008b).

A resposta da suplementação com MON para ruminantes parece ser dependente da dieta (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003; DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008a, 2008b). Akins et al. (2014) detectaram uma tendência de aumento da relação leite/CMS em resposta à monensina quando uma dieta com 26,9 % de amido foi fornecida por 12 semanas, em comparação com uma dieta com 20,4 % de amido. Guan et al. (2006) suplementaram MON para novilhos de corte durante 16 semanas e observaram que a extensão da supressão da produção de metano mediada por ionóforo foi semelhante em dietas formuladas com 86 % de forragem ou 31 % de forragem mais 68 % de cevada, mas a duração da supressão foi maior quando novilhos foram alimentados com a dieta com alta forragem, e o CMS foi reduzido e a

eficiência alimentar foi melhorada apenas na dieta com baixa forragem. Zinn, Plascencia e Barajas (1994) observaram que a monensina aumentou a proporção de propionato ruminal quando os novilhos foram alimentados com uma dieta de 10 % de forragem, mas reduziu a proporção de propionato quando foram alimentados com uma dieta com 20 % de forragem. A monensina teve maior efeito na redução da proporção de acetato e propionato (A:P) em fermentadores contínuos quando a dieta continha cevada em vez de milho (JENKINS; FELLNER; McGUFFEY, 2003).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho da lactação, eficiência alimentar e as respostas de digestibilidade em vacas em lactação suplementadas com monensina em dietas diferindo na capacidade acidogênica ruminal. Nossas hipóteses foram que à suplementação com monensina poderia ser mais favorável no desempenho da lactação e na eficiência alimentar quando a capacidade acidogênica ruminal da dieta fosse aumentada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e uso da monensina

Os ionóforos carboxílicos foram isolados em 1951 (BERGER et al., 1951), mas foi apenas em 1967 que a primeira estrutura do ácido monênico, posteriormente conhecido como monensina, foi descrita (AGTARAP et al., 1967). O nome ionóforo é um termo genérico aplicado ao grupo dos antibióticos denominados poliésteres contendo um radical carboxílico, grupo funcional carboxila ligado à cadeia carbônica (BERGEN; BATES, 1984). Dentre os ionóforos existentes no mercado, a monensina é o mais estudado, sendo referência para o entendimento do modo de ação desse grupo de aditivos. Entretanto há diferenças entre a molécula de monensina, lasalocida, salinomicina, laidomicina, maduramicina, narasina, tetronasina, lisocelina, dianemicina, nigercina, gramicidina e semduramicina. Atualmente são conhecidos mais de 120 ionóforos produzidos principalmente por microrganismos do gênero *Streptomyces*. No Brasil, a monensina, lasalocida, salinomicina e a laidomicina são aprovadas para uso em dietas para ruminantes (MORAIS; BERCHIELLI, 2011).

A monensina foi comercialmente usada nos Estados Unidos em 1971 com o objetivo de controlar a coccidiose na avicultura de corte (CHAPMAN; JEFFERS; WILLIAMS, 2010). Em 1975 iniciou-se o uso de monensina em ruminantes de corte em fases de crescimento e terminação, com o objetivo de aumentar a eficiência alimentar. No ano de 1980, a monensina foi aprovada para uso em vacas em lactação em vários países, incluindo Austrália, Argentina, Nova Zelândia e África do Sul, almejando melhorar a eficiência alimentar e o controle de cetose subclínica nesses animais. Em 1997 foi aprovado no Canadá o uso de monensina em cápsula de liberação controlada para vacas leiteiras, com o objetivo de prevenir a cetose subclínica (DUFFIELD; BAGG, 2000). A utilização de antibióticos como aditivos na alimentação animal foi proibida na União Europeia no ano de 2006, exceto a monensina em cápsula de liberação controlada sob prescrição veterinária para vacas leiteiras com excesso de peso no periparto (DRONG et al., 2016a). Contudo, apenas em 2004 o uso da monensina para vacas leiteiras foi oficialmente regulamentado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (MULLER; BARGO; IPHARRAGUERRE, 2006).

2.2 Mecanismo de ação da monensina

Os ionóforos translocam íons através das membranas celulares e afetam o gradiente iônico da célula. Os ionóforos são moléculas com uma camada externa hidrofóbica e uma interna hidrofílica onde átomos de hidrogênio ligam-se a diferentes cátions como o Na^+ , K^+ e Ca^{++} , agindo como transportadores destes íons através da membrana celular (PRESSMAN, 1968). A troca de cátions e prótons mediado pelo ionóforo inicia-se quando a forma aniônica do ionóforo liga-se à superfície da membrana celular. Como ânion, o ionóforo é capaz de ligar-se a um metal catiônico, ambos com terminação de ácido carboxílico. Essa ligação inicia a formação de um complexo lipofílico cátion-ionóforo que pode difundir-se para o interior da célula (MORAIS; BERCHIELLI, 2011).

A monensina tem afinidade 10 vezes maior pelo Na^+ do que pelo K^+ e H^+ . A sensibilidade dos microrganismos do rúmen a esse ionóforo pode ser manipulada por alteração na concentração iônica do meio ou dieta, sendo essa sensibilidade aumentada por íons de maior afinidade (NEWBOLD; WALLACE; WALKER, 2013). O fluxo de prótons é sempre oposto ao de íons, mas a direção do movimento é determinada pela concentração de prótons e íons intra e extracelular. O ionóforo livre liga-se primeiro a um próton e esse complexo atravessa a membrana e o próton é liberado. O ionóforo livre novamente, pode então ligar-se a um íon e os movimentos através da membrana podem ocorrer no sentido oposto (PRESSMAN, 1976).

O colapso de gradientes de íons transmembrana não é o que torna os ionóforos letais às bactérias ruminais intactas, mas sim o gasto de energia necessário para manter a homeostase e os mecanismos de gradientes (CHEN; RUSSELL, 1989). A atividade antibacteriana dos ionóforos pode diferir quando cátions adicionais estão presentes, e dependendo do gradiente de íons em diferentes espécies de bactérias ruminais (CHEN; RUSSELL, 1989). A adição de Na^+ em dietas de bovinos de corte aumentou a eficácia da monensina e reduziu CH_4 , enquanto a adição de K^+ aumentou CH_4 (RUMPLER; JOHNSON; BATES, 1986). O aumento na concentração de K^+ no meio extracelular reduz a magnitude do gradiente transmembrana e impede o efluxo do meio intracelular para o extracelular de K^+ e consequentemente reduz o influxo de H^+ , diminuindo a sensibilidade das bactérias ruminais aos ionóforos (DAWSON; BOLING, 1987).

Segundo Russell e Strobel (1989) a concentração de K^+ intracelular pode ser até 70 vezes maior do que no meio extracelular e o gradiente de concentração de K^+ através da membrana celular pode ser 25 vezes maior do que o Na^+ , que é maior intracelular, ou H^+ que

é maior extracelular. Os gradientes de K^+ são utilizados como meio de tamponamento do pH intracelular por meio de mecanismos anti- K^+/H^+ (BOOTH, 1985). Portanto, quando a monensina se liga à membrana celular, a primeira reação que ocorre é a rápida saída de K^+ e entrada de H^+ na célula, provocada pela mudança do gradiente iônico externo. O acúmulo de H^+ no interior da célula reduz o pH, a célula responde a essa queda de pH exportando H^+ para fora e permitindo a entrada de Na^+ para o interior da célula. Outra forma de exportar o H^+ é por meio da bomba de próton ATPase (RUSSELL; STROBEL, 1990). Assim, grande parte da energia produzida pela célula é utilizada pelas bombas de Na^+/K^+ e de próton ATPase na tentativa de manter o pH e o balanço iônico celular. Logo, a energia na forma de ATP que poderia ser usada para o crescimento e reprodução microbiana é desviada para o gasto energético das bombas para reestabelecer o gradiente iônico (RUSSELL, 1987; RUSSELL; STROBEL, 1989).

2.3 Sensibilidade das bactérias ruminais à monensina

A sensibilidade das bactérias à uma classe de antibióticos é determinada pela capacidade da droga inibir as funções metabólicas, o crescimento e a reprodução dos microrganismos (APUA, 2002). Na literatura é comum encontrar afirmações de que bactérias Gram-positivas tem maior sensibilidade aos ionóforos comparado às bactérias Gram-negativas, entretanto alguns fatores precisam ser considerados. Algumas bactérias ruminais podem apresentar coloração Gram variável (HUNGATE, 1947; SCHÄREN et al., 2017) e apesar do RNA ribossômico fornecer uma base filogenética para a diferenciação de bactérias, poucas bactérias ruminais têm sido sequenciadas (KRAUSE; RUSSELL, 1996). A coloração de Gram é uma técnica microbiológica para identificação de microrganismos (FREITAS; PICOLI, 2007). Com base no perfil tintorial, as bactérias coram-se de roxo ou de rosa e são classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, respectivamente. Entretanto existem variações na técnica de coloração, considerando os tempos de exposição aos corantes Cristal Violeta e Fucsina de Gram e o emprego ou não de lavagens com água entre as etapas, que podem interferir na visualização das estruturas coradas (FREITAS; PICOLI, 2007).

Portanto o mais adequado é afirmar que no rúmen existem grupos de bactérias pouco sensíveis (PSI) e sensíveis (SI) aos ionóforos, isso é atribuído parcialmente às características inerentes às membranas celulares e não há coloração de Gram. As bactérias PSI possuem uma membrana interna com camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa formada por proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e porinas, que são proteínas de canais com

tamanho limite de 600 Dalton. A maioria dos ionóforos tem tamanho superior a 600 Dalton e não passam por entre as porinas, o que torna a célula impermeável ao ionóforo (NAGARAJA et al., 1997). Por outro lado, as bactérias SI possuem apenas uma camada espessa de peptidoglicano que por ser porosa não impede a ação dos ionóforos na membrana interna (RUSSELL, 1987; RUSSELL; STROBEL, 1988).

Embora a hipótese de que a membrana externa bacteriana forneça um padrão geral de resistência aos ionóforos, outros fatores precisam ser considerados. Algumas bactérias PSI não são resistentes à altas concentrações de ionóforos e nesse caso, ocorre aumento do fluxo de íons transmembrana, como na bactéria *Fibrobacter succinogenes* (CALLAWAY; RUSSELL, 2000). Protozoários e fungos também são pouco sensíveis à monensina. Assim a membrana externa não é um critério absoluto para a sensibilidade ao ionóforo (McGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001). Outro fator importante é a composição lipídica da membrana celular do microrganismo. Smith e Strout (1980b) observaram que a sensibilidade de bactérias aos ionóforos foi influenciada pela composição da membrana celular. Maior proporção de ácidos graxos insaturados (AGI) aumentou a fluidez da membrana e potencializou a capacidade do ionóforo de atuar como um transportador transmembrana. Lewis et al. (1994) relataram que *Bacillus subtilis* na presença de antibióticos não ionóforos, tiveram mutação na enzima desaturase, aumentando o teor de ácidos graxos saturados (AGS) na membrana deixando-as mais sólidas e reduzindo a permeabilidade, além da redução da ação das enzimas translocases, que são responsáveis pela remoção de estruturas que aderem à membrana celular. Existem variações entre microrganismos quanto à capacidade de mutação das enzimas que são responsáveis pela composição lipídica da membrana celular, explicando a diferença entre microrganismos quanto à sensibilidade aos antibióticos (ALPER; DUNCAN; LOSICK, 1994).

Alguns trabalhos têm mostrado que o transporte de glicose do meio extracelular para o intracelular é estimulado por Na^+ e inibido por monensina e lasalocida (FRANKLUND; GLASS, 1987), entretanto pode diferir dependendo da concentração de Na^+ extracelular e o sistema de transporte de glicose que cada microrganismo utiliza. A máxima taxa de transporte de glicose foi observada quando a concentração de Na^+ extracelular foi 80 mM e houve redução no transporte de glicose quando a concentração de Na^+ excedeu a 100 mM (CHOW; RUSSELL, 1992).

A bactéria ruminal celulolítica *Fibrobacter succinogenes* foi isolada pela primeira vez por Hungate (1947). Trabalhos subsequentes indicaram que esta bactéria é uma das principais bactérias degradadoras de celulose no rúmen (BRYANT, 1954; HALLIWELL; BRYANT,

1963). Bactérias ruminais celulolíticas são sensíveis à quedas modestas no pH e nessas condições não conseguem manter um potencial de membrana (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; RUSSELL, 1987).

Chow e Russell (1992) demonstraram *in vitro* o efeito do pH, da monensina e da lasalocida, sobre o transporte de glicose por *Fibrobacter succinogenes* S85. O máximo transporte de glicose ocorreu em pH 6,7 e houve crescimento lento quando cultivada em pH 5,6, além da redução de ATP intracelular. O crescimento microbiano cessou em pH 5,4, houve também redução de pH intracelular, as bactérias não foram capazes de metabolizar a glicose, além da redução do gradiente elétrico de membrana. A monensina (1 μM) ou lasalocida (5 μM) potencializaram a redução de ATP intracelular, o gradiente elétrico de membrana e o gradiente químico de Na^+ , reduzindo a força motriz para o transporte de glicose. Provavelmente estes efeitos ocorreram, pois a bactéria *Fibrobacter succinogenes* S85 utiliza o mecanismo de transporte simporte Na^+ , que é um tipo de sistema de transporte de glicose sensível ao pH. As vias da fermentação são bem elucidadas nas bactérias ruminais, mas a informação é limitada em relação aos mecanismos de transporte utilizados por esses microrganismos para fontes de carbono e N. Foram identificados cinco mecanismos de transporte de nutrientes em bactérias ruminais: difusão facilitada, sistemas choque sensíveis, simporte próton, simporte Na^+ e fosfotransferase (MARTIN, 1994). Na bactéria *Streptococcus bovis* a monensina reduziu de forma drástica a concentração de K^+ intracelular, o influxo de Na^+ e prótons e reduziu ATP intracelular. Embora o crescimento dos microrganismos tenha sido inibido, a monensina teve pouco efeito na taxa de utilização da glicose (RUSSELL, 1987). Nessa bactéria, a glicose é transportada pelo sistema fosfotransferase (MARTIN; RUSSELL, 1987) ou por difusão facilitada (RUSSELL, 1990) e nenhum desses mecanismos são dependentes de gradientes de íons na membrana celular.

Chow e Russell (1990) avaliaram *in vitro* o efeito da monensina, lasalocida e do pH no crescimento de *Streptococcus bovis*. Os microrganismos foram tolerantes à 10 e 20 (μM) de lasalocida e monensina, respectivamente. Embora tenham crescido em altas concentrações de ionóforos, a produção de proteína bacteriana e lactato reduziram cerca de 10 vezes nestas condições. Quando o pH foi reduzido de 6,7 para 5,7 o efeito de ambos os ionóforos aumentou, a lasalocida reduziu mais a produção de proteína bacteriana e a concentração de lactato foi similar para ambos os ionóforos. O aumento da atividade da lasalocida em pH 5,7 pode ser explicado por um aumento da ligação do ionóforo na membrana celular, pois a lasalocida é mais lipofílica que a monensina, portanto pode ligar-se mais facilmente a essa estrutura. Segundo Chow e Russell (1992) a monensina e a lasalocida têm efeitos semelhantes

no fluxo de íons através da membrana celular, mas a potência pode diferir entre eles de acordo com a hidrofobicidade e a capacidade do ionóforo complexar ao cátion monovalente ou bivalente de afinidade. De acordo com Pressman (1976) a monensina é mais efetiva em ambientes com pH baixo, pois o seu grupamento carboxílico tem um pKa ligeiramente alcalino, favorecendo a ligação na membrana celular.

Chen e Wolin (1979) avaliaram *in vitro* a sensibilidade de bactérias ruminais sacarolíticas e *Archaeas* à monensina e à lasalocida. O crescimento das bactérias *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens* foi inibido com 2,5 µg/mL de monensina ou lasalocida e reduzido nas bactérias *Fibrobacter succinogenes* e *Prevotella ruminicola*. Em outro trabalho também foi observado que as bactérias ruminais celulolíticas *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens* foram inibidas com dose baixa (2,5 µg/mL) de monensina (DAWSON; BOLING, 1987). As espécies *Fibrobacter succinogenes* e *Prevotella ruminicola*, foram sensíveis em doses elevadas (20 µg/mL) dos ionóforos, mas estabeleceram novamente seu crescimento quando foi reduzida a concentração dos ionóforos para 5 (µg/mL) no meio de cultura. A espécie *Selenomonas ruminantium* não foi sensível mesmo em doses elevadas (40 µg/mL) dos ionóforos. Os dois ionóforos na concentração de 10 (µg/mL) inibiram *Methanobacterium*, *Methanobacterium formicicum* e *Methanosarcina barkeri*. A *Methanobacterium ruminantium* não foi sensível à 40 (µg/mL) de monensina ou à 20 (µg/mL) de lasalocida. A monensina ou lasalocida selecionaram *Prevotella ruminicola* e *Selenomona ruminantium*, sendo esta última a bactéria do rúmen mais importante envolvida na descarboxilação de succinato em propionato (WOLIN; MILLER, 1988). A seleção contra as bactérias *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, produtoras de acetato, butirato e formato, leva a provável redução da produção de CH₄ no rúmen, ao invés do efeito direto dos ionóforos sobre a população de *Archaea* que são menos sensíveis aos ionóforos do que as bactérias celulolíticas que fornecem precursores para metanogênese. Hook et al. (2009) observaram que em 20, 90 e 180 dias de suplementação com monensina, não houve efeito da suplementação sobre qualquer grupo de *Archaea* no rúmen de vacas leiteiras. As bactérias celulolíticas tem maior sensibilidade à monensina do que as bactérias amilolíticas (CHEN; WOLIN, 1979; SCHÄREN et al., 2017) e isso é atribuído parcialmente às diferenças na estrutura e composição lipídica da membrana celular (SMITH; STROUT, 1980b; BERGEN; BATES, 1984).

2.4 Adaptação das bactérias ruminais à monensina

O uso de ionóforos na alimentação animal teve um crescimento significativo nas últimas décadas e algumas considerações têm sido levantadas em relação aos antibióticos utilizados na medicina animal, como o desenvolvimento e transferência de genes responsáveis por resistência cruzada a várias classes de antibióticos utilizados na medicina humana (APUA, 2002).

As bactérias desenvolveram vários mecanismos para combater os efeitos letais dos antibióticos, como a adaptação ou resistência, que é a capacidade da bactéria resistir aos efeitos de uma droga que normalmente, era sensível. Bactérias resistentes à vancomicina, antibiótico muito usado na medicina humana, têm a camada de peptidoglicano alterada para impedir a ligação do antibiótico à membrana celular (WOODFORD, 1998). Outra hipótese levantada embora ainda não confirmada, é a inativação das bombas iônicas na presença de ionóforos em bactérias SI (CALLAWAY et al., 2003). As bactérias resistentes à fluroquinona são capazes de fazer mutação das enzimas alvo, como DNA girasse e topoisomerase IV, mas também ativam bombas iônicas que neutralizam o antibiótico ligado à membrana celular (HOOPER, 2002).

As bactérias PSI podem ter sensibilidade da mesma forma que as bactérias SI mas ambas podem ser capazes de adaptar-se à monensina (CALLAWAY; RUSSELL, 2000; RYCHLIK; RUSSELL, 2002). Segundo Lewis et al. (1994) mesmo que não demonstrado em experimentos, a presença de enzimas translocases responsáveis pela remoção de ionóforos da membrana celular, parece ser um mecanismo plausível para a explicação da adaptação à monensina. O sistema translocase para ser induzido precisa ser exposto ao ionóforo e isso pode explicar a sensibilidade inicial e a rápida adaptação observada em algumas bactérias ruminais. Na avaliação da adaptação de microrganismos ruminais aos ionóforos é importante verificar se o que é identificado é a seleção de microrganismos insensíveis à monensina ou se são novas cepas que adaptaram (CALLAWAY et al., 2003). Uma alternativa sugerida nas décadas de 70 e 80 para reduzir os efeitos de adaptação dos microrganismos ruminais aos ionóforos foi a rotação diária ou semanal do tipo de ionóforo fornecido, contudo não foram evidenciados resultados satisfatórios com a adoção dessa prática (GALYEAN; OWENS, 1988).

A bactéria *Prevotella ruminicola* é considerada PSI, mas apenas imediatamente quando exposta à monensina é sensível, entretanto, foi observada rápida adaptação (NEWBOLD; WALLACE, 1988; NEWBOLD; WALKER, 1993). *Prevotella ruminicola*

parece reduzir o tamanho das porinas como mecanismo de defesa contra os ionóforos (NEWBOLD; WALLACE, 1988). Outra bactéria que tem a habilidade de adaptar-se rapidamente aos ionóforos é a *Prevotella bryantii*, a qual seleciona subpopulações com modificações na conformação morfológica da membrana externa (CALLAWAY; RUSSELL, 1999). A bactéria *Streptococcus bovis* e algumas cepas *Clostridium aminophilum* são sensíveis à monensina, mas também podem se adaptar (CALLAWAY; ADAMS; RUSSELL, 1999). A adaptação de *Clostridium aminophilum* é mediada pelo aumento de polissacarídeos extracelulares que dificultam a ligação da monensina à membrana celular (RYCHLIK; RUSSELL, 2002).

A perda de potássio intracelular (DP-K) também pode ser correlacionada com adaptação (LANA; RUSSELL, 1996). Algumas cepas de *Prevotella* quando transferidas repetidamente em doses subletais de monensina (0,001 a 20 μM), toleraram mais do que cepas não adaptadas. A máxima proporção de DP-K e menor relação Kd/Kmax foram observadas em culturas de bactérias não adaptadas à monensina, onde Kd é a concentração mínima de monensina para a máxima DP-K e Kmax é a máxima DP-K. Algumas cepas que cresceram apenas em concentrações menores que 1 μM , passaram eventualmente a tolerar 10 μM (CALLAWAY; RUSSELL, 1999). Lana e Russell (1996) em trabalho *in vitro* avaliaram o Kd em bactérias do fluido ruminal de novilhos recebendo 350 mg/d de monensina. Observaram que o Kd foi 8 vezes maior do que culturas provenientes de novilhos que não foram suplementados com monensina. O aumento no Kd pode ser consequência da rápida reposição de bactérias sensíveis à monensina por bactérias insensíveis a este ionóforo. O aumento observado no Kd ocorreu imediatamente após o fornecimento de monensina e o Kd máximo foi observado 4 dias após o início da suplementação. A monensina teve efeito mínimo sobre o Kmax e dobrou o Kd quando comparado à lasalocida. Quando a monensina foi retirada da dieta o Kd reduziu drasticamente voltando aos valores pré-tratamento em 14 dias.

Chen e Wolin (1979) observaram que *Prevotella brevis* GA33 cresceu em concentrações 3,6 μM de monensina. Entretanto, o tempo para o início do crescimento foi maior que 24 h e em subseqüentes transferências o tempo reduziu para 12 h. Callaway e Russell (2000) avaliaram culturas de *Prevotella bryantii* e constataram que a redução na concentração de K^+ intracelular foi diretamente correlacionada à concentração de monensina. Nesse mesmo estudo as cepas de *Prevotella bryantii* apresentaram a maior relação Kd/Kmax e dentre as 15 cepas de *Prevotella* avaliadas, a *Prevotella bryantii* foi a cepa menos sensível à monensina. Um ponto importante é que a mensuração do influxo de Na^+ pode ser confundido

com a alta concentração extracelular de Na^+ e com o Na^+ ligado às bactérias ruminais. Entretanto, a DP-K bacteriana pode ser facilmente mensurada e pode ser um bom indicador de sensibilidade e adaptação das bactérias ruminais à monensina (RUSSELL; STROBEL, 1989; LANA; RUSSELL, 1996).

Alguns trabalhos têm mostrado que os ionóforos não se ligam com tanta facilidade à membrana celular de bactérias (adaptadas) que tiveram uma pré-exposição aos ionóforos comparadas às bactérias não adaptadas (NEWBOLD; WALLACE, 1988). Duff, Galyean e Branine (1994) observaram que o fornecimento de monensina para novilhos doadores de fluido ruminal como inóculo, não afetou a digestibilidade *in vitro* da MS em uma dieta com 90 % de concentrado. Além disso, o uso do inóculo de animais que receberam monensina (adaptados) teve efeito mínimo sobre as proporções molares de AGV em comparação ao inóculo oriundo dos animais não adaptados, os quais não receberam monensina. Segundo Davies et al. (1982) e Rumpler, Johnson, Bates (1986) a adaptação dos microrganismos ruminais pode ter interação com o tipo de dieta. Quando os animais foram alimentados com dietas à base de concentrado, a produção de CH_4 retornou aos valores pré-tratamento 16 dias após o início da suplementação com monensina (RUMPLER; JOHNSON; BATES, 1986). Em comparação, bezerras suplementadas com monensina recebendo feno de alfafa, a produção de CH_4 foi 25,6 % menor que o controle mesmo após 54 dias de suplementação, sugerindo menor adaptação dos microrganismos quando monensina foi fornecida em dietas à base de forragem, embora sejam animais jovens (O'KELLY; SPIERS, 1992).

Debasis e Singh (2005) avaliaram o efeito de diferentes doses de monensina *in vitro* utilizando um mix de grãos de cereais e palha de trigo como substrato. O fluido ruminal foi obtido de novilhos adaptados que receberam 50 mg/d ou não adaptados à monensina, durante quatro períodos: antes da suplementação (P I), 14 dias após a suplementação (P II), 21 dias (P III) e 35 dias (P IV). As doses de monensina foram 0, 35, 70, 100, 150 e 200 mg/novilho/d. No P II quando os animais foram adaptados à monensina a DMS foi igual ao controle até a dose de 100 mg, mas doses mais altas de monensina reduziram a DMS. Nos P III e P IV quando os animais foram adaptados à monensina não houve diferença na DMS. A digestibilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) foi similar ao tratamento controle na dose 35 mg/monensina, no entanto, em doses maiores, a DFDN foi reduzida no tratamento monensina no P II. Com base nos dados de digestibilidade sugere-se que houve adaptação dos microrganismos ruminais à monensina. Contudo, o perfil de fermentação ruminal caracterizado pelo aumento na proporção molar de propionato, na redução de butirato e no

CH₄ só foi evidenciado à partir de 21 dias de suplementação com monensina quando utilizaram doses acima de 70 mg.

Rogers et al. (1997) utilizaram oito ovinos com cânulas no rúmen e no duodeno, divididos em dois tratamentos, monensina e controle, e em quatro períodos. No P I (adaptação) os animais receberam dieta. No P II os animais suplementados receberam dieta com 33 mg/kg/MS de monensina durante 19 dias. No P III 96 dias após a adição da monensina e no P IV foi retirada a monensina após 146 dias de suplementação. A monensina aumentou a DMS e a digestibilidade da matéria orgânica (DMO) e esses efeitos desapareceram após a retirada da monensina. Os efeitos de redução das proporções molares de acetato e butirato e aumento de propionato foram observados sete dias após o início da suplementação. Após 24 h da retirada da monensina, as proporções molares de AGV retornaram à valores semelhantes ao controle. Suda et al. (1989) observaram que os efeitos da suplementação com monensina sobre a eficiência alimentar mantiveram-se por 410 dias.

Em outros estudos, os efeitos positivos da suplementação com monensina sobre a fermentação ruminal reduziram com o passar do tempo (POOS; HANSON; KLOPFENSTEIN, 1979; PERRY et al., 1983; RUMPLER; JOHNSON; BATES, 1986; LANA; RUSSELL, 1997). Segundo Hanson e Klopfenstein (1977) em dietas de ovinos, a suplementação com monensina reduziu as digestibilidades da matéria seca (DMS) e da fibra em detergente ácido (DFDA) 14 dias após o início da suplementação, mas esses valores aproximaram aos valores do tratamento controle após 46 dias de suplementação. Nos estudos de Perry et al. (1983) e Johnson et al. (1991) os efeitos da suplementação com monensina sobre o perfil de AGV no rúmen desapareceram entre os dias 56 e 140 em novilhos de corte, e a redução de CH₄ limitou-se aos primeiros dias. Em outros estudos observaram-se que os efeitos da monensina desapareceram em duas semanas após o início da suplementação (JOHNSON et al., 1994; KIRCHGESSNER; WINDISCH; MULLER, 1995).

Poos, Hanson e Klopfenstein (1979) observaram que a monensina reduziu a proporção de cinzas bacterianas e após sua remoção essa proporção aumentou, fato que provavelmente reflete mecanismos compensatórios utilizados pelas bactérias ruminais, indicando adaptação dos microrganismos, já que a curto prazo (11 a 17 dias) a suplementação (22 ou 38 mg/kg/MS) de monensina reduziu a DMS (68,4 vs. 62,4 %, $P < 0,05$) e a DFDA (61,9 vs. 55,6 %, $P < 0,05$). Entretanto, a longo prazo (40 a 46 dias) não houve diferença na DMS (65,5 vs. 63,6 %, $P > 0,10$) e na DFDA (54,9 vs. 52,2 %, $P > 0,10$).

O aumento observado *in vivo* na resistência à monensina medida pela DP-K, pode ser explicado pelo aumento da resistência fisiológica de muitas espécies bacterianas, mas não

necessariamente condiz com a completa insensibilidade da população microbiana ruminal à monensina (CALLAWAY et al., 2003). O conhecimento sobre o mecanismo de ação dos ionóforos e a adaptação dos microrganismos ruminais, ainda não são questões bem elucidadas. Não há dados que comprovem resistência de bactérias ao uso de ionóforos. A ideia de que a resistência aos ionóforos é uma seleção fenotípica, sustentada por medições do fluxo de potássio monensina dependente, é mais aceita do que a mutação ou aquisição de genes externos. Genes responsáveis pela resistência das bactérias ruminais aos ionóforos não têm sido identificados e há uma pequena evidência de que a resistência aos ionóforos possa ser transferida de uma bactéria para outra (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

2.5 Metabolismo de vacas leiteiras suplementadas com monensina

2.5.1 Concentração de D-lactato no plasma e pH ruminal

A definição de acidose ruminal subclínica é inconsistente na literatura e ao mencionar os valores de pH é necessário considerar que cada sistema biológico é dinâmico por natureza, sem limiares claros (ASCHENBACH et al., 2011). Entretanto, a acidose ruminal subclínica pode ser entendida como períodos de moderada queda no pH ruminal, em que ele atinge valores entre 5,2 e 5,6 (OETZEL, 2000) decorrente de um desequilíbrio entre a produção de ácidos no rúmen à partir da fermentação de carboidratos e a remoção desses ácidos orgânicos por absorção pelo epitélio ruminal, passagem para o omaso ou neutralização por agentes tamponantes (SANTOS, 2006; PLAIZIER et al., 2009). A depressão do pH durante a acidose ruminal subclínica em vacas em lactação, é aparentemente em razão ao acúmulo de AGV e não de ácido láctico (OETZEL; NORLUND; GARRET, 1999; KRAUSE; DHUYVETTER; OETZEL, 2009), pois as concentrações de D e L-Lactato são baixas e a quantidade desses isômeros que são absorvidos e que chegam à veia porta são pouco relevantes (HARMON et al., 1985).

A acidose ruminal láctica/clínica normalmente ocorre quando o pH está abaixo de 5,2 e há um aumento significativo na concentração de ácido láctico (> 40 mM) (OWENS et al., 1998). O piruvato é um intermediário central nas bactérias ruminais e pode ser convertido em vários produtos finais e eliminar os equivalentes reduzidos, é o principal fator que determina seu destino. Durante a glicólise, o NAD é convertido em NADH que deve ser re-oxidado para que a fermentação possa continuar. Os mecanismos mais simples de re-oxidação do NADH são a formação de lactato ou etanol (RUSSELL, 2002). A acidose na forma láctica/clínica

ocorre o aumento na osmolaridade ruminal, acúmulo de glicose e lactato nas suas duas formas de isômeros, o D-Lactato e o L-Lactato, no fluido ruminal e no plasma (DUNLOP; HAMMOND, 1965; MACKENZIE, 1967). O L-Lactato é produzido durante o metabolismo da glicose por células da pele, encéfalo, medula renal, músculo esquelético, tecido adiposo, eritrócitos e leucócitos. No metabolismo anaeróbico da glicose, o piruvato é convertido em L-Lactato pela enzima L-Lactato desidrogenase. O L-Lactato, então, sai da célula na qual foi produzido e é metabolizado em outros tecidos como músculo cardíaco, tecido hepático e córtex renal. Nessas células, o L-Lactato é, novamente, convertido pela enzima L-Lactato desidrogenase em piruvato, usado no ciclo de Krebs e na fosforilação oxidativa para produção de energia. Já o D-Lactato é produzido, majoritariamente, pelo metabolismo da glicose pelos microrganismos no rúmen (ALLEM; HOLM, 2008; VERNON; LeTOURNEAU, 2010). Normalmente, o D-Lactato representa de 10 a 20 % da concentração total de ácido láctico no rúmen quando o pH ruminal apresenta valores acima de 5,5. Com a queda no pH ruminal, há uma redução na concentração de L-Lactato e um aumento de D-Lactato o qual passa a representar 40 a 50 % do total de ácido láctico no fluido ruminal (DUNLOP; HAMMOND, 1965; SANTOS, 2006). Quando absorvido, o D-lactato é eliminado por oxidação, gliconeogênese e excreção renal (OWENS et al., 1998). Uma das características do D-Lactato é que ele é metabolizado mais lentamente que o L-Lactato (PRINS et al., 1973; DUNLOP; HAMMOND, 1965). Essa diferença é atribuída à localização das enzimas que convertem o L e o D-Lactato à piruvato na célula. No caso do L-Lactato, a enzima L-Lactato desidrogenase está localizada no citoplasma da célula, enquanto, para o D-lactato, as enzimas D-lactato desidrogenase e D-2-hidroxi ácido desidrogenase estão localizadas nas mitocôndrias das células. Portanto o D-Lactato tem que se translocar para dentro da mitocôndria para que seja convertido em piruvato. Além disso, a atividade da D-2-hidroxi ácido desidrogenase é inibida na presença de piruvato e de oxaloacetato, retardando a utilização do D-Lactato, facilitando assim, seu acúmulo e o risco de acidose metabólica (HORN et al., 1979; SANTOS, 2006).

Alguns mecanismos diretos têm sido descritos para explicar o efeito positivo da monensina sobre o pH ruminal e sobre o controle do risco de acidose. O primeiro, é a ação da monensina na redução da população dos principais microrganismos produtores de lactato no rúmen, como *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus sp.*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospira múltiparus* e protozoários do gênero *Holotriqueo* (MACKENZIE, 1967; RUSSELL; HINO, 1985). E o segundo mecanismo é a pouca ação da monensina em bactérias utilizadoras de lactato no rúmen, tais como *Megasphaera elsdenii*, *Anaerovibrio lipoyitica* e *Selenomonas ruminantium* (NAGARAJA et al., 1982; CALLAWAY; MARTIN, 1997). Um outro efeito da

monensina, no entanto, menos evidenciado na literatura é a capacidade em alterar a morfologia e o crescimento das papilas no rúmen. Pereira et al. (2014) não observaram nenhum efeito da monensina no número de papilas, área média de papilas, área de papilas como porcentagem de superfície absorptiva em dietas de bovinos para corte com 84 % de concentrado (% MS). Contudo, à medida que aumentaram a dose de monensina (0, 9, 18, 27 ou 36 mg/kg), a área de superfície absorptiva, a área de superfície das papilas e o índice mitótico aumentaram ($P < 0,05$), com a dose 36 mg/kg. Provavelmente, devido à monensina reduzir a proporção molar de butirato (ELLIS et al., 2012) o qual tem efeito direto no epitélio ruminal como inibidor de mitose e indutor de queratinização (STAIANO-COICO et al., 1990; COSTA et al., 2008b) e devido ao aumento da proporção molar de propionato (ELLIS et al., 2012) o que pode aumentar as concentrações de glicose e de insulina no sangue, a insulina estimula a mitose e a proliferação das células epiteliais do rúmen (SAKATA et al., 1980) e consequentemente, levando a maior capacidade de remoção dos ácidos (MELO et al., 2013).

Dennis, Nagaraja e Bartley (1981) aferiram *in vitro* a sensibilidade e os efeitos da lasalocida e da monensina na produção e no uso de lactato por bactérias ruminais. Foram utilizadas as concentrações 0, 6 e 12 ($\mu\text{g/mL}$) de lasalocida ou monensina. Ambos os ionóforos inibiram a maior parte das bactérias produtoras de lactato no rúmen (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium*, *Lachnospira múltiparus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus vitulinus* e *Streptococcus bovis*), mas não inibiram espécies produtoras de lactato que produzem succinato como produto final (*Prevotella ruminicola*, *Selenomona ruminantium*, *Succinimona amylolytica* e *Succinivibrio dextrinosolvens*). Além disso, nenhuma espécie importante que utiliza lactato foi inibida (*Anaerovibrio lipoyitica*, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*).

Segundo Wolin (1964) a atividade catalítica da enzima lactato desidrogenase em algumas bactérias produtoras de lactato no rúmen, tais como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus casei*, é regulada pela concentração intracelular de frutose 1,6 difosfato. Em experimento utilizando cultura contínua, em condições limitadas de glicose, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus bovis* produziram, principalmente, formato, etanol e acetato. Na bactéria *Streptococcus bovis*, a conversão do piruvato em acetil-CoA e em formato foi catalisada pela enzima piruvato formato liase, que é muito sensível ao pH baixo (ABBE; TAKAHASHI; YAMADA, 1982). Uma redução do pH de 7,5 para 6,5 diminuiu a atividade da enzima em 60 %. A redução do pH intracelular e extracelular pode inibir a enzima piruvato formato liase, desviar o metabolismo do piruvato e não produzir acetato e formato (TAKAHASHI; ABBE;

YAMADA,1982). A alteração na conversão do piruvato em formato e acetato em vez de lactato proporciona ATP para as bactérias (CARLSSON; GRIFFITH, 1974).

Outro ponto importante é que a enzima lactato desidrogenase, em *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus casei*, tem a sua atividade reduzida quando essas bactérias são cultivadas em condições não acidóticas (RUSSELL; HINO, 1985). Resultados semelhantes foram relatados por Wolin (1964) onde a enzima lactato desidrogenase, em *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus casei*, foi rapidamente inativada por exposição a pH 7,0. E quando o pH reduziu para 5,5, houve a máxima atividade da enzima. Russell e Hino (1985) observaram em *Streptococcus bovis*, após 3 h de cultivo, que o pH extracelular tinha reduzido para 4,7 e o crescimento cessou mesmo quando havia glicose disponível. Em um pH extracelular de 4,7, o pH intracelular da bactéria foi 5,4 e esse pH intracelular coincidiu com o pH ótimo para atividade da enzima lactato desidrogenase. Portanto, em situações de acidose ruminal clínica, além do efeito direto da monensina na redução da população de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus casei*, pode haver um efeito indireto que é o aumento no pH ruminal reduzindo a atividade e a produção de lactato por essas bactérias.

Nagaraja et al. (1981) compararam o efeito da monensina e da lasalocida na prevenção de acidose láctica em vacas de corte. A monensina e a lasalocida foram fornecidas via cânula ruminal na dose de 1,3 mg/kg/peso, um dia antes do experimento e novamente no dia em que a acidose foi induzida administrando 12,5 g/kg/peso de glicose diluída. Doze horas após a indução da acidose, houve redução no pH ruminal (4,15; 5,66 e 4,83), acompanhada por aumento nas concentrações de L-Lactato (351; 14 e 108 mg/dL) e D-Lactato (167; 1,4 e 109, mg/dL), nos tratamentos controle, lasalocida e monensina, respectivamente. O pH sanguíneo no tratamento controle reduziu (7,29; 7,41 e 7,36) e houve aumento das concentrações de L-Lactato (11; 9 e 9 mg/dL) e D-Lactato no plasma (8; 2; 5 mg/dL), comparado com lasalocida e monensina, respectivamente.

Os mesmos autores em um segundo experimento Nagaraja et al. (1981) avaliaram o efeito da monensina e da lasalocida na prevenção de acidose láctica, também em vacas de corte. A dose e a forma de administrar os ionóforos e de indução de acidose foram as mesmas do experimento 1, mas os ionóforos foram fornecidos durante sete dias antes da indução da acidose. Doze horas após a indução da acidose, o pH ruminal foi 4,79; 5,18 e 5,41, com um pico simultâneo nas concentrações de L-Lactato (380; 202 e 56 mg/dL) e D-Lactato (201; 120 e 34 mg/dL) no tratamento controle, lasalocida e monensina, respectivamente. Trinta e seis horas após a indução da acidose, o pH no sangue reduziu no tratamento controle (7,29 vs. 7,41) comparado aos ionóforos. A concentração de bicarbonato no sangue reduziu (17,9 vs.

26,9 mEq/L), aumentou o excesso de bases (+2,75 vs. -6,7 mEq/L) e a concentração total de CO₂, no tratamento controle comparado aos ionóforos. Em adição, Safaei, Tahmasbi e Moghaddam (2014) utilizaram 20 cordeiros que foram alimentados com dietas contendo (20 % forragem e 80 % concentrado (% MS), e diferentes concentrações de monensina (0, 10, 20 e 30 mg/kg/MS). A monensina na dose de (30 mg/kg/MS) aumentou o pH ruminal (6,38 vs. 5,72) comparado ao controle.

Newbold e Wallace (1988) avaliaram o efeito da monensina (0,5 µg/mL) e tetronasina (0,5 µg/mL) em simulação *in vitro* de acidose láctica. As bactérias *Megasphaera elsdenii* J1 e *Selenomonas ruminantium* Z108 foram utilizadas, representando as principais utilizadoras de lactato, e as bactérias *Streptococcus bovis* C277 e *Lactobacillus sp.* LB17 sendo as principais produtoras de lactato. Em condições limitadas de glicose, as bactérias formaram rapidamente co-culturas típicas, sendo cerca de 40 % de *Selenomonas ruminantium*, 20 a 30 % de *Streptococcus bovis* e *Megasphaera elsdenii* e 2 a 5 % de *Lactobacillus* e não foi detectado lactato. Quando a glicose foi adicionada, na ausência de ionóforos, a proteína bacteriana total subiu e o pH reduziu 6 h após a adição. O crescimento de todas as espécies bacterianas foi inicialmente estimulado pela adição de glicose. No entanto, *Streptococcus bovis* superou rapidamente as outras espécies, e foi observado aumento das concentrações de lactato e AGV, particularmente, o propionato. A adição de tetronasina reduziu a queda do pH com um valor mínimo de pH 5,05 em 12 h após a adição de glicose. Embora houvesse um acúmulo transitório de lactato após a adição de glicose, a concentração permaneceu baixa. A monensina foi menos eficaz no controle da redução do pH ou no acúmulo de lactato comparado à tetronasina. O *Streptococcus bovis* atingiu o pico de crescimento 2 a 4 h, após a adição de glicose e reduziu em seguida, com predominância das espécies *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*. A monensina em concentração mais elevada (1,0 µg/mL), teve efeitos semelhantes aos relatados para tetronasina (0,5 µg/mL), embora a monensina não tenha conseguido controlar o aumento de *Lactobacillus*. Houve uma estimulação inicial de *Selenomonas ruminantium* quando a monensina foi adicionada, mas, após a incubação de 72 h, *Lactobacillus* foi a espécie predominante e a monensina não foi capaz de reduzir a concentração de lactato. Isso sugere que o aumento na concentração de monensina pode ter inibido o crescimento e a atividade da *Megasphaera elsdenii*, que é considerada responsável por até 75 % do catabolismo de lactato no rúmen (COUNOTTE et al., 1981; MAROUNEK; BARTOS, 1987).

A estratégia nutricional da bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* é baseada na utilização de lactato e de produtos solúveis da hidrólise de polímeros de açúcares fornecidos

por outras bactérias (MAROUNEK; BARTOS, 1987). No rúmen, essa bactéria ocupa um nicho de microrganismos utilizadores de lactato e é uma importante espécie que produz propionato a partir de lactato (RUSSELL; COTTA; DOMBROWSKI, 1981). Uma vez que *Megasphaera elsdenii* não está sujeito à repressão por catabólitos da glicose ou maltose, sua contribuição para o catabolismo de lactato é alta em situações de pH ruminal muito baixo, principalmente, em dietas com carboidratos de alta fermentabilidade, que reprimem a utilização de lactato por espécies como *Selenomonas* e outras utilizadoras (HINO; KURODA, 1993).

Mutsvangwa et al. (2002) avaliaram o efeito da monensina sobre o controle de acidose ruminal subclínica em vacas leiteiras. Utilizaram seis vacas Holandês em lactação (150 ± 53 dias) em delineamento de reversão simples, com dois tratamentos (Premix-Monensina) 22mg/kg/MS ou controle (Premix-Placebo), em dois períodos de 6 semanas cada. A monensina não teve efeito no pH ruminal médio e o tempo por dia de pH abaixo de 6,0 e 5,6. A monensina reduziu a relação A:P (3,18 vs. 2,72). A monensina aumentou o CMS (1,5 kg/d) e a produção de leite (27,0 vs. 31,0 kg/d), no período de indução da acidose e no período de recuperação CMS (2,8 kg/d) e a produção de leite (25,9 vs. 29,5 kg/d), comparados ao controle. A monensina reduziu o teor de gordura no leite (3,18 vs. 3,38 %), aumentou as produções de proteína (1,04 vs. 0,91 kg/d) e lactose (1,44 vs. 1,25 kg/d), durante a indução da acidose. No período de recuperação, a monensina aumentou as produções de proteína (0,90 vs. 0,99 kg/d) e de lactose no leite (1,20 vs. 1,37 kg/d). A monensina aumentou a proporção de AG de cadeia curta na gordura do leite (C:4 até C:15). Mas reduziu a proporção do AG linolênico (C18:3 n-3) no leite. Apesar da monensina não ter influência sobre o pH ruminal, durante a indução da acidose, é concebível que as vacas suplementadas com monensina adaptaram-se mais rápido à adição de grãos na dieta, tendo melhor desempenho produtivo.

2.5.2 Perfil da fermentação ruminal

Os AGV os quais incluem os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, 2-metilbutírico, hexanoico e heptanoico, são produzidos junto com outros compostos, como CH₄, CO₂, hidrogênio (H₂), lactato e o etanol durante a fermentação ruminal. Os ácidos acético, propiônico e butírico são os AGV predominantes e são produzidos durante fermentação ruminal de carboidratos de plantas, tais como celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares (BERGMAN, 1990; KOZLOSKI, 2011).

A monensina age no rúmen selecionando as bactérias produtoras de succinato e as utilizadoras de lactato e inibe as bactérias produtoras de acetato, butirato, lactato, formato e H₂ (RUSSELL; WALLACE, 1997). A concentração total de AGV é pouco afetada (WOOD et al., 2016), mas a proporção relativa é modificada, e a intensidade desses efeitos é dependente da composição da dieta e da dose de monensina. Os efeitos observados pelo uso da monensina são a redução da proporção molar de acetato e butirato (McGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001; ELLIS et al., 2012), com consequente redução das produções dos gases CH₄, CO₂ e H₂ (BAGG, 1997; BAKER, 1999) e o aumento da proporção molar de propionato (ARMENTANO; YOUNG, 1983; BADAWY et al., 1996) e os teores de glicose sanguínea (MAAS et al., 2001; ARIELI et al., 2008; McCARTHY et al., 2015b).

Richardson et al. (1976) avaliaram *in vitro* e *in vivo* os efeitos da monensina sobre a fermentação ruminal. No experimento *in vitro*, utilizaram fluido ruminal de ovinos recebendo dieta à base de concentrado incubado durante 24 h, em diferentes concentrações de monensina (0; 0,25; 0,5; 1; 5 e 25 mg/L). A monensina reduziu a proporção de acetato na dose de 25 mg/L, aumentou a proporção de propionato, à partir da dose de 0,25 mg/L, reduziu a proporção de butirato, à partir da dose de 5 mg/L e, também, foi observada redução em isovalerato e valerato com doses de 5 e 25 mg/L. Posteriormente, foi realizado um experimento de curto prazo (28 dias), com seis novilhos de corte com cânula no rúmen. Para avaliar diferentes doses de monensina (0, 25, 50, 100, 200 e 500 mg/d), os animais receberam dieta com alta proporção de concentrado (90 %, MS). Para as doses 0, 100 e 500 (mg/d) os tratamentos permaneceram até 148 dias, com coleta de fluido ruminal de 14 em 14 dias. No experimento de curto prazo, a monensina reduziu a proporção molar de acetato, nas doses igual ou superior a 100 mg/d, aumentou a proporção molar de propionato e reduziu o butirato nas doses igual ou superior a 25 mg/d. No experimento de longo prazo, a monensina reduziu a proporção molar de acetato, butirato e valerato e aumentou a proporção molar de propionato, nas doses igual ou superior a 100 mg/d e também foi observada redução em isovalerato na dose de 500 mg/d.

Ellis et al. (2012) reportaram em uma meta-análise os efeitos da monensina na concentração total e nas proporções de AGV em bovinos de corte recebendo dietas de alto grão. A dose média de monensina foi de $30,9 \pm 3,70$ mg/kg/MS, variando de 0 a 88,0 mg/kg/MS. A média de CMS foi $7,8 \pm 0,26$ kg/MS/d e a proporção de concentrado nas dietas foi 87 % MS, variando de 80 a 100 % MS. Os experimentos tiveram duração média de $42 \pm 5,6$ dias. As análises produziram as seguintes equações: variação proporcional do acetato (mol/mol 100) = $1 - 0,0634 (\pm 0,0323) \times \text{monensina (mg/kg/MS)} / 100$ ($P = 0,06$), variação

proporcional do propionato (mol/mol 100) = $1 + 0,260 (\pm 0,0735) \times \text{monensina (mg/kg/MS)} / 100$ ($P < 0,01$) e variação proporcional de butirato (mol/mol 100) = $1 - 0,335 (\pm 0,0916) \times \text{monensina (mg/kg/MS)} / 100$ ($P < 0,01$). A concentração total de AGV não alterou, independentemente da dose de monensina. Mas as mudanças nas proporções de AGV foram doses dependentes, com aumento de 8,6 % de propionato, redução de 2,1 % de acetato e 11,1 % de butirato.

Rogers e Davis (1982) em experimentos utilizando dose de 33 mg/kg/MS de monensina observaram alterações semelhantes nas proporções de AGV, no entanto, em dietas com alta inclusão de forragem, 70 ou 50 % MS. As alterações nas proporções molares de AGV foram redução de 6 % de acetato, aumento de 29 % de propionato e redução de 14 % de butirato, na dieta com 70 % de forragem. Na dieta com 50 % de forragem, houve redução de 4 % de acetato, aumento de 15 % de propionato e redução de 25 % de butirato. Ramanzin et al. (1997) também reportaram alterações nas proporções molares de AGV em vacas em lactação (65 ± 15 dias), e com produção de leite de $24,2 \pm 3,0$ kg/d, canuladas no rúmen suplementadas com 300 mg/d de monensina, recebendo dietas com 50 e 70 (% MS) de forragem. Foi observado interação, pois a monensina aumentou a proporção de propionato e reduziu a de acetato mais na dieta com 50 % de forragem. A monensina reduziu a relação A:P nas duas dietas ($P < 0,01$).

Dentre os AGV apenas o propionato, o valerato e o isobutirato são precursores para a síntese de glicose (BERGMAN, 1990; REYNOLDS et al., 2003). O propionato é o principal precursor em vacas leiteiras, e contribui com cerca de 60 a 74 % de carbonos para gliconeogênese que, majoritariamente, ocorre no fígado (ASCHENBACH et al., 2010). Os demais carbonos são oriundos do glicerol, lactato e aminoácidos glicogênicos e aproximadamente 90 % da gliconeogênese à partir desses compostos, ocorre nos rins (BERGMAN; STARR; RUELEIN, 1968). A produção de glicose hepática em vacas leiteiras é proporcional ao suprimento de propionato (BAIRD et al., 1980) e à demanda de glicose para suprir o aumento drástico da síntese de leite na glândula mamária ao parto. A gliconeogênese no fígado é controlada pela atividade de várias enzimas, incluindo fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), glicose 6-fosfatase e piruvato carboxilase, que são sensíveis aos hormônios insulina (BROCKMAN; LAARVELD, 1986) e glucagon (BROCKMAN et al., 1975) e à regulação alostérica (PILKIS; GRANNER, 1992; ASCHENBACH et al., 2010). Duas isoformas da PEPCK estão presentes, a citosólica (PEPCK-C) e a mitocondrial (PEPCK-M). Em vacas leiteiras, a expressão gênica da PEPCK-C e a capacidade para gliconeogênese à partir de propionato, estão associadas à ingestão de alimentos e ao

suprimento de propionato. A expressão da PEPCK-C é alta, no início da lactação, quando o consumo de alimentos aumenta (GREENFIELD; CECAVA; DONKIN, 2000; AGCA et al., 2002) e com a suplementação de monensina no pré-parto associada ao aumento da concentração de propionato no rúmen (KARCHER et al., 2007).

Tomkins et al. (2015) compararam efeitos de diferentes doses de óleos essenciais (Crina) e monensina na fermentação ruminal em bovinos de corte, recebendo feno de gramínea tropical (87 % MS, 12,6 % PB, 68,8 % FDN e 40,3 % FDA). Foram utilizados 5 novilhos de corte distribuídos em um dos cinco tratamentos, controle, Crina1 (1 g/d), Crina 2 (2 g/d), monensina1 (60 mg/d) e monensina2 (250 mg/d). A monensina2 reduziu o CMS (4,4 vs. 5,4, kg/d) e aumentou a proporção molar de propionato (17,7 vs. 14,6 %) comparado aos demais tratamentos. Este tratamento reduziu a proporção molar de acetato (73,7 vs. 77,5 %) comparado ao controle e reduziu a proporção molar de butirato (4,8 vs. 5,8 %) comparado à crina1 e crina2. A monensina2 reduziu a relação A:P comparado ao controle, crina1 e crina2, e reduziu a produção de CH₄ total (g/d) ($P < 0,01$), g/CMS ($P = 0,03$), g/CMO ($P = 0,03$), g/Consumo de FDN ($P = 0,03$) comparado ao controle, crina1 e crina2. Esse tratamento reduziu a produção de CH₄ como % do consumo de EB ($P = 0,01$) comparado ao controle, crina1 e crina2, e reduziu 42 % da população relativa de Archaea 24 h após a suplementação comparado ao controle.

Smith et al. (2010) avaliaram o efeito da monensina sobre o desaparecimento *in vitro* da MS e a concentração de AGV. Os tratamentos foram 4 concentrações de monensina (0, 2, 4 e 6 mg/L). No experimento 1 os novilhos doadores do fluido ruminal não receberam monensina e grãos de destilaria. No experimento 2 incluíram na dieta dos novilhos doadores do fluido ruminal (22 mg/kg/MS) de monensina e 15 % de grãos de milho destilado. No experimento 1 a monensina não teve efeito na DMS. Nos dois experimentos as concentrações crescentes de monensina aumentaram linearmente a proporção molar de propionato e reduziram as proporções molares de acetato, butirato, isovalerato e a relação A:P. Houve tendência em reduzir a fermentação de hexoses e redução linear da produção de CH₄ e CO₂ por mol de hexose fermentada em concentrações crescentes de monensina.

Martineau et al. (2007) relataram efeitos da suplementação com monensina e lasalocida sobre a digestibilidade, fermentação ruminal, metabólitos sanguíneos e produção de leite. Foram utilizadas seis vacas em lactação (90 ± 30 dias) e produção (43,1 ± 6,4, kg/d), distribuídas nos tratamentos controle, lasalocida e monensina (24 mg/kg/MS). Os animais nos tratamentos ionóforos receberam a dose de 12 mg/kg/MS, do dia 1 ao 5 de cada período e após o quinto dia, receberam a dose de 24 mg/kg/MS. Não houve diferença no CMS (23,5

kg/d), produção de leite, proporções de AGV e concentrações séricas de glicose ($3,36 \pm 0,10$ mM), mas houve redução na relação A:P para os ionóforos comparado ao controle ($3,10$ vs. $2,80$). Os ionóforos aumentaram a DMS, a DMO e a digestibilidade da EB. Os ionóforos nem sempre reduzem o CMS, a retenção de energia adicional proporcionada pela monensina pode ser usada para melhorar o desempenho produtivo, reduzir perdas de reservas corporais, ou ambos, quando as vacas estão no início da lactação. Entretanto, no meio e no final da lactação podem reduzir o CMS, pois os animais estão em balanço energético positivo (TEDESCHI; FOX; TYLUTKI, 2003).

Maas et al. (2001) utilizaram 12 ovinos canulados no rúmen e alojados individualmente em gaiolas metabólicas e distribuídos nos tratamentos, controle ou monensina ($2,72$ mg/PV^{0,75}), dose equivalente à 300 mg/d/bovino. A dieta era à base de forragem. A monensina reduziu o CMS, as proporções molares de acetato e butirato e aumentou a proporção molar de propionato e a concentração de glicose no plasma. Duffield, Rabiee e Lean (2008a) reportaram em uma meta-análise que a monensina aumentou a concentração de glicose plasmática ($3,2$ %, $P < 0,01$) comparado ao controle. Em torno de 80 % do propionato absorvido no rúmen é convertido em glicose no fígado, sendo está utilizada pela glândula mamária para síntese de lactose, que direciona a produção de leite (BROCKMAN, 1990).

Armentano e Young (1983) conduziram um estudo para determinar os efeitos da monensina sobre as concentrações e interconversões de acetato, propionato e butirato no rúmen, glicose e acetato no plasma e CO₂ no sangue. Utilizaram a técnica de isótopos em quatro novilhos Holandês com cânula no rúmen e catéter bilateral nas veias jugulares, alimentados com uma dieta contendo 70 % feno de alfafa e 30 % de milho (% MS). A dose de monensina foi 150 mg/d. A monensina aumentou as concentrações de acetato no plasma ao mesmo tempo em que reduziu a proporção de acetato no rúmen. A conversão de propionato em glicose utilizada foi 33 % do propionato produzido e a maior parte do propionato restante foi oxidado à CO₂. Van Der Walt (1978) reportou dados de conversão de propionato em glicose utilizada em cerca de 34 % do propionato produzido ao trabalhar com ovelhas. Durante a conversão de propionato em glicose, aproximadamente 17 % foram perdidos pela descarboxilação do oxaloacetato. A monensina aumentou a proporção de propionato em relação ao acetato no rúmen ($2,5$ %, $P < 0,01$) comparado ao controle. A monensina tendeu aumentar a concentração de butirato indicando que a redução de acetato pode resultar em desvio de hexoses para as produções de propionato e butirato. Com base no calor gerado pela combustão de hexoses e CH₄ que foram calculados, a eficiência de fermentação para o

controle foi 79,1 e 84,1 % para monensina, mostrando uma melhoria na eficiência de fermentação em 6,3 % ao utilizar monensina.

Van Maanen et al. (1978) avaliaram o efeito da monensina sobre a concentração de propionato e a cinética de glicose no sangue por técnicas de isótopos. Utilizaram quatro novilhos canulados no rúmen, recebendo dieta com alta inclusão de forragem, 70 % feno de alfafa (% MS) ou alta inclusão de concentrado, 64 % milho moído grosso (% MS) distribuídos em quatro dietas: controle com alta forragem (CTL-AF), monensina com alta forragem (MON-AF), controle com alto concentrado (CTL-AC) e monensina com alto concentrado (MON-AC), a dose de monensina foi 150 mg/d durante seis semanas. A monensina aumentou o tamanho dos pools de propionato (32 vs. 57 g/d) MON-AF (37 vs. 66 g/d) MON-AC, e a concentração de propionato em ambas as dietas (441 vs. 659 g/d) MON-AF e (510 vs. 899 g/d) MON-AC. A proporção de propionato aumentou (27,2 e 21,3 %) para MON-AC e MON-AF, respectivamente. Não houve diferença no tamanho dos pools de glicose no sangue. A monensina aumentou a proporção de perdas irreversíveis de glicose na dieta MON-AC (677 vs. 582 g/d), provavelmente porque aumentou a produção de propionato. Entretanto, o efeito no aumento da cinética da glicose foi irrelevante, em contraste com o aumento da proporção de propionato ruminal nos animais suplementados com monensina. Arieli et al. (2001) destacaram o efeito glicogênico da monensina (300 mg/d) em vacas no pré-parto. No dia - 14 em relação ao parto, a monensina aumentou a distribuição e o tamanho dos pools de glicose sem afetar a concentração sanguínea. Vacas leiteiras no final da gestação e suplementadas com monensina podem aumentar o fluxo glicogênico sem afetar a concentração de glicose no sangue estimulada pela liberação de insulina e pela partição da glicose em tecidos com alta demanda de energia, como o feto em crescimento. Da mesma forma, a monensina pode aumentar a disponibilidade de glicose durante o início da lactação, mas os mecanismos homeostáticos priorizam o uso da glicose pela glândula mamária e mantiveram sua concentração sanguínea relativamente constante (STEPHENSON et al., 1997).

Appuhamy et al. (2013) reportaram em uma meta-análise que a monensina reduziu a porcentagem de energia bruta (EB) da dieta perdida na forma de CH₄ (5,9 vs. 5,4 %). Nas dietas de bovinos de corte com maior teor de FDN o efeito da monensina na redução da produção de CH₄ foi mais pronunciado do que em dietas com alto teor de amido. Quando foi ajustado para o efeito da FDN a suplementação com monensina (32 mg/kg/CMS) reduziu as emissões de CH₄ dos novilhos (19 ± 4 g/d). Quando ajustaram as diferenças no CMS, a

monensina reduziu a porcentagem de EB da dieta perdida na forma de CH₄ em vacas leiteiras (-0,23 ± 0,14 %) e em novilhos de corte (-0,33 ± 0,16 %).

Beauchemin et al. (2008) em uma revisão demonstraram que o efeito da monensina na produção de CH₄ pode ser dose dependente. Na análise, doses menores que 20 mg/kg/MS de monensina tiveram pouco efeito em g/d e não tiveram efeito g/CMS na redução de CH₄ em vacas leiteiras, enquanto que doses maiores 24 a 35 mg/kg/MS de monensina, reduziram a produção de CH₄ (g/d, 4 % a 10 % e em g/CMS, 3 % a 8 %), em bovinos de corte e em vacas leiteiras e reduções de curto prazo chegaram a 30 % em dietas de alta inclusão de forragens.

A estequiometria da conversão de um mol de glicose em AGV e a proporção que cada ácido é produzido depende da espécie bacteriana, que pode ser especializada em produzir um tipo ou outro de AGV, a concentração de nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e H₂ na célula (KOZLOSKI, 2011). O excesso de H₂ no rúmen é eliminado por microrganismos, principalmente, do gênero *Archaea* (BAKER, 1999), o qual utiliza H₂ para reduzir CO₂ e formar CH₄ (KOZLOSKI, 2011). Cerca de 2 a 12 % da energia consumida pelos ruminantes pode ser perdida na forma de CH₄, portanto qualquer estratégia que reduza a produção de CH₄ e as perdas de energia na urina têm o potencial de aumentar a conversão de energia digestível (ED) aparente em energia metabolizável (EM) (HERGATY, 1999).

Wedegaertner e Johnson (1983) determinaram o efeito da monensina sobre a partição da energia em novilhos de corte em crescimento alimentados com dieta contendo 70 % milho moído grosso e 30 % silagem de milho (% MS), e dose de monensina de 3 mg/PV^{0,75} ou controle. Utilizaram seis novilhos alojados e alimentados em câmara calorimétrica. A dieta foi oferecida *ad libitum* e reduzida para 90 % do CMS predito 3 dias antes e durante a primeira coleta, no dia 7. Durante o período 2 a dieta foi restrita para 60 % do CMS predito. A monensina aumentou a DMS (75,9 vs. 73,3 %), a ED aparente (74,8 vs. 71,8 %) e a DFDN (57,5 vs. 50,5 %). A produção de CH₄ como proporção da EB foi em média 5,7 % no controle e foi reduzida em 26 % com monensina. A monensina aumentou a EM (63,3 vs. 66,8 %) como proporção da EB resultando em aumento da energia retida (64,7 vs. 72,3 kcal/PV^{0,75}). Ao ajustar o consumo de EB, aproximadamente 33 % da melhor utilização de energia inerente à monensina foi explicado pela redução da metanogênese e 66 % pela redução da perda de energia fecal.

Os principais fatores que determinam a eficiência de como a energia dietética seja digerida e utilizada pelos ruminantes são as proporções de produção de acetato, propionato e butirato (ARMSTRONG; BLAXTER, 1957b; ORSKOV et al., 1979a). No rúmen, o H₂ produzido pode ser usado para as sínteses da matéria orgânica microbiana e AGV durante a

fermentação de hexoses. A produção de ATP no metabolismo de acetato gera um saldo líquido de equivalentes reduzidos de H_2 (+4), propionato (-2) e butirato (+2), à partir de uma molécula de glicose e, no metabolismo do lactato e etanol o saldo de equivalentes reduzidos de H_2 é nulo (RUSSELL, 2002; BAKER, 1999). As produções de acetato e de butirato promovem maior produção de CH_4 pela maior produção de H_2 (WOLIN, 1960; CHAUCHEYRAS et al., 1995). Simultaneamente, a maior concentração de NADH/NAD⁺ favorece a síntese de propionato pela re-oxidação do NADH, limitando o H_2 para a produção do acetato (HEGARTY, 1999; WOLIN, 1960). No caso de bactérias PSI, a enzima fumarato reductase permite a conversão do fumarato em succinato, e que posteriormente, será convertido em propionato (BERGEN; BATES, 1984). Os ionóforos têm ação em bactérias produtoras de propionato via lactato pela rota do acrilato e selecionam bactérias que produzem propionato pela rota do succinato (SCHELLING, 1984). A maior produção de propionato ocorre inversamente à produção de CH_4 , quanto maior a produção de propionato menor a produção de CH_4 (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Thornton e Owens (1981) reportaram resposta da suplementação com monensina sobre a metanogênese em novilhos de corte. Utilizaram 12 novilhos em câmara calorimétrica, distribuídos nos tratamentos controle ou monensina (200 mg/d) e em dietas com baixa FDN (24,3 %, MS), média FDN (46,7 %, MS) e alta FDN (60,5 %, MS), com substituição do milho grão laminado por casca de algodão e farelo de soja. A monensina reduziu a produção de CH_4 como proporção do CO_2 nas três dietas. A monensina não afetou a perda de energia fecal e urinária como proporção do consumo de EB, no entanto, reduziu a perda de energia na forma de CH_4 como proporção do consumo de EB nas três dietas. Não houve diferença nas digestibilidade da MS, da celulose e da hemicelulose. A monensina reduziu a proporção molar de acetato e aumentou a de propionato nas dietas de baixa e alta FDN.

O efeito da monensina na redução da metanogênese relaciona-se com o decréscimo de H_2 e de formato, substratos primários necessários para formação de CH_4 e não pelo efeito direto da monensina sobre os microrganismos metanogênicos (CHEN; WOLIN, 1979). As bactérias produtoras de acetato no rúmen são sensíveis à monensina, principalmente, as celulolíticas. A produção de acetato está ligada à eliminação de equivalentes reduzidos por meio da metanogênese, portanto a menor produção de acetato reduz a produção de CH_4 (HEGARTY, 1999). A redução na produção de CH_4 observada com a suplementação de monensina também pode estar relacionada à inibição do crescimento de protozoários que produzem H_2 e são colonizados por microrganismos metanogênicos (McALLISTER et al., 1996; DEBASIS; SINGH, 2003).

2.5.3 Digestibilidade de fibra

A monensina tem sido reportada em trabalhos *in vitro* como inibidora da população e das atividades das bactérias celulolíticas e da degradação da fibra (WHETSTONE; DAVIS; BRYANT, 1981; WALLACE; CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1981; ANASSORI et al., 2012). Entretanto, a magnitude das respostas *in vivo* é muito variável, mostrando que a digestão da fibra pode não ser afetada pelos ionóforos (MARTINEZ et al., 2009; McCARTHY et al., 2015a).

Várias bactérias celulolíticas já foram identificadas no rúmen, mas assume-se que a digestão de fibra é realizada principalmente por três bactérias: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, mas podem estar envolvidas bactérias secundárias: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium longisporium*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium locheadii*, *Clostridium cellobioparum* e *Eubacterium cellulosolvens* (WEIMER, 1996; KRAUSE et al., 2013; CHOUDHURY et al., 2015). Algumas interações foram observadas para a dominância da bactéria *Ruminococcus albus* entre as celulolíticas: a produção de bacterocinas que inibem o crescimento de *Ruminococcus flavefaciens*, maior capacidade de adesão à celulose, maior adaptabilidade para um crescimento rápido em baixas concentrações de celodextrinas e celobiose, melhor adesão nas partículas de alimento pela interação com a bactéria não fibrolítica *Selenomonas ruminantium* e maior capacidade de degradar hemicelulose (WEIMER et al., 1999; CHEN; WEIMER, 2001).

Alguns trabalhos com vacas leiteiras têm demonstrado redução na digestibilidade da fibra no rúmen em resposta à monensina, mas não no trato digestivo total (HAÏMOUD et al., 1995; REVENEAU et al., 2012a). Haïmoud et al. (1995) avaliaram os efeitos da monensina sobre a digestibilidade dos nutrientes e sobre a eficiência da síntese microbiana. Utilizaram três vacas em lactação (55 dias), canuladas no rúmen e no duodeno, em delineamento quadrado latino 3 x 3 com períodos de 21 dias de adaptação e 5 dias de coleta de fezes total. Os animais foram suplementados com 33 mg/kg/MS de monensina ou controle, recebendo dieta com 64,6 % de forragem e 35,4 % de concentrado (% MS). A monensina não afetou a produção de leite (33,0 kg/d) e nem o CMS (17,8 kg/d), mas reduziu as digestibilidades da MO (71,4 vs. 65,0 %), da FDA (45,9 vs. 37,1 %) e do amido (63,6 vs. 54,7 %) no rúmen. Entretanto as digestibilidades da MO (71,0 vs. 72,4 %), da FDA (54,1 vs. 54,3 %) e do amido (92,2 vs. 92,1 %) no trato total não diferiram entre os tratamentos. Reveneau et al. (2012a) observaram em vacas leiteiras recebendo dietas com 16,2 % feno de alfafa e 32,8 % de

silagem de milho (% MS) que a monensina reduziu a DFDN ruminal (32,5 vs. 24,3 %, $P = 0,04$) e a DFDN ruminal como proporção da DFDN no trato total (65,7 vs. 46,4 %, $P = 0,03$). Porém não foi observado redução na DFDN no trato total, tendo valor numérico maior para monensina (51,5 vs. 53,2 %), evidenciando uma mudança no local de digestão da FDN. A monensina tendeu reduzir o teor de MS da digesta ruminal ($P < 0,08$), mas não alterou as taxas de passagens (Kp) da fração líquida (10,3 %/h) e sólida (4,6 %/h). A DFDN no intestino grosso (ceco e cólon) pode reduzir a eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal, que pode representar até 60 % do *pool* de aminoácidos absorvidos no duodeno em vacas leiteiras (CLARK; KLUSMEYER; CAMERON, 1992), contudo os autores observaram apenas uma redução numérica no fluxo de N microbiano para o omaso (311 vs. 301 g/d) no tratamento com monensina, mas isso pode ser explicado pela redução no CMS (18,4 vs. 17,7 kg/d, $P = 0,08$).

As três bactérias celulolíticas *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, têm características comuns que as diferenciam de outras bactérias ruminais, sendo que a mais importante é a especialização nutricional (WEIMER 1996). A maioria das bactérias ruminais que degradam carboidratos são capazes de utilizar monossacáridos e dissacarídeos como substratos para crescimento (RUSSELL, 1985; WELLS; RUSSELL, 1994). Por outro lado, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* só utilizam celulose e seus produtos hidrolíticos como substratos para crescimento. A consequência dessa especialização nutricional é que o principal meio pelo qual essas espécies obtêm vantagem seletiva no rúmen é otimizando apenas as duas atividades catabólicas: a hidrólise da celulose (despolimerização) e a utilização eficiente dos produtos hidrolíticos (celodextrinas). Essas atividades são desafiadoras pela natureza da celulose, a qual é um polímero insolúvel bem ordenado e pela competição por celodextrinas com outras bactérias oportunistas não celulolíticas, tais como *Prevotella ruminicola*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella brevis* e *Selenomonas ruminantium* que são pouco sensíveis à monensina (RUSSELL, 1985; WEIMER 1996). Além disso, quando há privação de celodextrinas, essas bactérias celulolíticas utilizam as próprias reservas de energia, o que pode reduzir sua atividade (WELLS; RUSSELL, 1994). Do ponto de vista de competição isso é importante, porque bactérias do gênero *Prevotella* podem representar mais de 65 % da população de bactérias no rúmen, e tanto *Prevotella* como *Selenomonas* são tolerantes a pH ruminal menor que 6,0 (VAN GYLSWYK, 1990). Portanto, a redução na digestão da fibra no rúmen pode ser explicada por um efeito inibidor da monensina sobre a população de bactérias celulolíticas e de um efeito indireto que é a seleção de bactérias não celulolíticas que

competem pelo principal substrato que é a celodextrina. A compensação da digestão da fibra no intestino grosso pode ser parcialmente explicada, porque parte da monensina é absorvida e metabolizada pelos bovinos, sugerindo que a concentração de monensina no intestino grosso é menor do que no rúmen, afetando pouco a população de bactérias celulolíticas sensíveis (DONOHO et al., 1978).

Oelker, Reveneau e Firkins (2009) avaliaram efeito da monensina sobre o pH ruminal, a digestibilidade de nutrientes no trato digestivo total e a atividade de enzimas fibrolíticas. A monensina não teve efeito sobre a produção de leite, CMS, pH ruminal ($> 6,0$), DMS, DMO, DFDN, atividade da enzima xilanase, mas tendeu ($P = 0,08$) a aumentar a atividade de celulases, avaliada pela concentração do substrato carboximetil celulase (CAXC), em dietas com 56 % de concentrado e 44 % silagem de milho ou 44 % de feno de alfafa (% MS). A monensina aumentou a degradação ruminal *in situ* da FDN na dieta com silagem de milho e reduziu a degradação ruminal *in situ* da FDN na dieta com feno de alfafa. O aumento de CAXC pode ser esperado se bactérias celulolíticas pouco sensíveis à monensina, como *Fibrobacter succinogenes* produzirem mais celulases do que as bactérias celulolíticas, como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, sensíveis à monensina. As celulases podem ser produzidas por outras bactérias não celulolíticas, como a *Prevotella ruminicola*, que aumentou muito a concentração do CAXC quando cresceu em meio com celobiose comparado à sacarose (GARDNER et al., 1995). A degradação da celulose envolve um consórcio de bactérias celulolíticas primárias e não celulolíticas secundárias (WELLS et al., 1995). Segundo Huhtanen e Khalili (1992) as alterações na degradabilidade efetiva da FDN no rúmen foram associadas positivamente à atividade do CAXC ligada às partículas de fibra. A atividade das enzimas fibrolíticas associadas às partículas é mais elevada do que no fluido ruminal. Isto ocorre provavelmente, porque a fixação dos microrganismos às partículas fibrosas permite que as enzimas atuem diretamente no substrato, aumentando assim, a ação catalítica da enzima (RODE; BEAUCHEMIN, 1998).

Lemenager et al. (1978) avaliaram *in vitro* o fluido ruminal de animais adaptados à monensina ou não adaptados e ao adicionar a monensina no fermentador houve redução na DMS em ambos os tratamentos. Nos dados *in vivo* com os animais suplementados com monensina (0, 50, 100 e 200 mg/d), não houve diferença no desaparecimento em 24 h da celulose no rúmen, mas o desaparecimento foi numericamente menor quando os animais receberam 50 e 100 mg/d de monensina. Dinius, Simpson e Marsh (1976) observaram *in vitro* redução similar no desaparecimento da celulose em fluido ruminal de animais não adaptados à monensina, e menor DMS ($P < 0,05$) no fluido ruminal dos animais adaptados comparados ao

controle. Entretanto, não houve diferença na DMS entre os tratamentos quando foram adicionados 2 mg de monensina no fermentador, mas foi observado efeito da monensina na digestão da celulose *in vivo*. Martínez et al. (2006) compararam *in vitro* o efeito da monensina (7,5 µg/mL), carvacrol (1,35 µL/mL) e thymol (1,35 µL/mL) sobre a DMS e a DFDN. Os tratamentos controle e monensina tiveram maior degradação efetiva da MS quando comparados ao carvacrol e thymol (40; 39; 34; 34 %). Entretanto, não houve diferença na degradação efetiva da FDN entre os tratamentos controle, monensina e thymol.

Faulkner et al. (1985) observaram em dois experimentos o efeito da monensina sobre a digestibilidade da fibra no rúmen e no trato digestivo total. No experimento 1 utilizaram seis novilhos canulados no rúmen distribuídos em quatro tratamentos, em delineamento quadrado latino 4 x 4 com períodos de 10 dias de adaptação e 7 dias de coleta total de fezes. As doses de monensina foram 0, 6, 18 e 36 mg/kg/MS. As quatro dietas continham 80 % de forragem - palha de milho e 20 % de concentrado (% MS). No experimento 2 utilizaram cinco novilhos canulados no rúmen e no duodeno distribuídos em cinco tratamentos, em delineamento quadrado latino 5 x 5 com períodos de 10 dias de adaptação e 7 dias de coleta total de fezes. As doses de monensina foram 0, 6, 12, 18 e 36 mg/kg/MS. As cinco dietas continham 84,5 % de forragem - palha de milho e 15,5 % de concentrado (% MS). No experimento 1 a resposta foi quadrática para as doses de monensina na DMS ($P = 0,07$) e na DFDN no trato total ($P = 0,08$), digestibilidade maior para a monensina comparado ao controle. No experimento 2 não houve diferença na DFDN ruminal, apesar da diferença numérica entre o controle e a maior dose de monensina (37,1 vs. 33,2, % consumo) e houve resposta quadrática na DMS ($P = 0,04$) e a DFDN no trato total ($P = 0,07$) similar ao experimento 1, digestibilidade maior para a monensina comparado ao controle.

Martinez et al. (2009) avaliaram em dois experimentos o efeito da monensina em dietas com duas inclusões de forragens, 50 ou 60 % da MS. No experimento 1 a dieta continha 55 % de silagem de alfafa e 45 % de silagem de milho. No experimento 2 a dieta continha 70 % de silagem de milho e 30 % de feno de alfafa. Foram utilizadas 16 vacas Holandês com 104 e 139 dias em lactação, nos experimentos 1 e 2, respectivamente, em delineamento quadrado latino 4 x 4, com períodos de 28 dias, sendo 21 dias de adaptação e 7 dias de coleta, em arranjo fatorial 2 x 2, controle ou monensina (300 mg/d). No experimento 1 a dieta com 60 % de forragem reduziu o CMS (27,3 vs. 29,6 kg/d) e houve uma diferença numérica na produção de leite (45,8 vs. 47,0 kg/d). Houve maior DFDN na dieta com 60 % de forragem (49,1 vs. 43,0 %) e não houve efeito para monensina ($P > 0,10$). No experimento 2, a dieta com 60 % de forragem reduziu o CMS (28,2 vs. 29,6 kg/d), mas não teve efeito na

produção de leite (41,1 vs. 40,8 kg/d). Houve apenas diferença numérica na DFDN para inclusão de forragem (38,2 vs. 35,6 %) e monensina (37,7 vs. 35,9 %) comparado ao controle.

Osborne et al. (2004) avaliaram o efeito da monensina sobre a degradabilidade ruminal *in situ* da forragem e sobre a digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras submetidas à acidose ruminal subclínica. Utilizaram seis vacas Holandês múltíparas com 135 ± 36 dias em lactação, canuladas no rúmen, em delineamento de reversão simples com 2 tratamentos, controle ou monensina (22 mg/kg/MS) e 2 períodos de 35 dias. A acidose foi induzida entre o 29º e 35º dia de cada período. Nos primeiros 7 dias de cada período, as vacas receberam a dieta controle. Os animais foram distribuídos nos tratamentos durante 3 semanas de adaptação (8º ao 28º dia) e a mensuração foi feita em 7 dias (29º ao 35º dia). Não houve diferença na produção de leite (25,4 kg/d) e no CMS (17,2 kg/d). A monensina não afetou a degradabilidade ruminal *in situ* no período de 24 ou 48 h da MS e da FDN da silagem de milho e do pré-secado de alfafa, durante o período de acidose. O pH ruminal não diferiu entre os tratamentos (6,07 vs. 6,11). No entanto, *in vivo*, a monensina aumentou a DFDA (51,4 vs. 41,1 %) e houve tendência em aumentar a DFDN (54,8 vs. 45,8 %) no trato digestivo total.

A variação nos resultados *in vivo* de digestão da fibra em animais suplementados com monensina, pode ser parcialmente explicada por uma alteração na proporção de bactérias celulolíticas pouco sensíveis aos ionóforos, como *Fibrobacter succinogenes*, que podem compensar a menor proporção de *Ruminococcus sp.* sensíveis aos ionóforos (CHEN; WOLIN, 1979). Zinn (1987) não observou diferença nas digestibilidades da MO, do amido e da FDA ruminal, mas houve tendência da monensina (33 mg/kg/MS) em reduzir a DFDA (43,1 vs. 38,6 %) no trato digestivo total comparado ao controle em dietas de bovinos de corte contendo 20 % de forragem e 80 % de concentrado (% MS). Segundo Lemenager et al. (1978) e Deswysen et al. (1989) pode haver um efeito compensatório pelo maior tempo de retenção da digesta no rúmen provocado pelo menor consumo quando os animais são suplementados com monensina, Kp da fração líquida (6,53 vs. 4,52 %/h) e Kp da fração sólida (2,73 vs. 1,54 %/h), contribuindo para a digestão da fibra. Já o aumento da dose de monensina (28 vs. 48 mg/kg/MS) reduziu ($P < 0,03$) os fluxos duodenais de MO, FDN e amido, decorrentes da redução do CMS ($P < 0,05$) e houve maior digestibilidade ruminal ($P < 0,05$) desses nutrientes em dietas de bovinos de corte com 90 % de concentrado (XU et al., 2013). Pomar et al. (1989) reportaram interação entre monensina e inclusão de forragem na dieta de bezerras. Quando a inclusão de forragem foi 40 ou 60 % da MS, a monensina aumentou as digestibilidades da FDA e da FDN, provavelmente, por causa da maior retenção da forragem

no rúmen em resposta ao menor consumo. Quando a inclusão de forragem foi 20 % da MS, a monensina reduziu essas digestibilidades. Nessa última situação, o ambiente ruminal está mais ácido, desfavorável ao crescimento e à atividade de bactérias celulolíticas (GRANT; MERTENS, 1992; WEIMER et al., 2011), além de menor proporção relativa desses microrganismos que são sensíveis à monensina, aumentando a magnitude dos efeitos na redução da digestibilidade da fibra.

As informações na literatura de trabalhos *in vitro* e *in vivo* de digestão de nutrientes no rúmen e pós-ruminal de bovinos e ovinos suplementados com monensina são inconsistentes. Alguns trabalhos mostram redução na digestibilidade de nutrientes (OWENS et al., 1978; MUNTIFERING; THEURER; NOON, 1981) e outros não (MORRIS et al., 1990; ROGERS; THIVENDL; FONTENOT, 1991; XU et al., 2013; YANG et al., 2014).

2.5.4 Proteólise e desaminação no rúmen

A proteína microbiana é a principal fonte de proteína metabolizável para vacas leiteiras (NRC, 2001). A captação de N alimentar e N microbiano é um fator importante a fim de evitar o excesso de formação de amônia (NH_3) no rúmen, levando à síntese de ureia e à excreção na urina (HRISTOV; JOUANY, 2005).

Os esforços para melhorar em ruminantes a eficiência na utilização de N, sincronizando energia digestível e a disponibilidade de N, têm geralmente sucesso limitado em relação às respostas de produção. O NH_3 produzido por bactérias pela degradação da ureia, dos aminoácidos (AA) dietéticos e dos endógenos, é utilizado pelos microrganismos durante a fermentação ruminal, ou absorvida pela parede ruminal e convertida em ureia no fígado. Por seguinte, o crescimento microbiano e a fermentação de carboidratos no rúmen afetam a extensão de absorção do NH_3 , a reciclagem e a excreção de N (REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008). Uma forma importante para melhorar a captação do N dietético é reduzir a proteólise e a desaminação de AA ruminal (FIRKINS; YU; MORRISON, 2007).

A monensina diminui a concentração de NH_3 ruminal em decorrência da menor degradação de peptídeos e AA, os quais, posteriormente são digeridos e absorvidos no duodeno (HAIMOUD et al., 1996; HEGAZY; ELIAS, 1997; RUSSELL; WALLACE, 1997). Outro efeito benéfico do uso de monensina está associado à menor exigência de AA para a gliconeogênese, pois há uma maior disponibilidade de propionato para a síntese de glicose (VAN DER WERF; JONKER; OLDENBROEK, 1998). As bactérias *Prevotella albensis*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis* e *Butyrivibrio fibrisolvens* são as principais

bactérias responsáveis pela atividade proteolítica no rúmen (RUSSELL; BOTTJE; COTTA, 1981; STEWART; FLINT; BRYANT, 1997; WALLACE; ONODERA; COTTA, 1997), e *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium aminophilum*, *Clostridium sticklandii* e *Peptostreptococcus anaerobius* são bactérias com alta capacidade de desaminação (RYCHLIK; RUSSELL, 2002).

McCarthy et al. (2015a) observaram que a monensina aumentou o N ureico no leite (NUL) entre a 1ª e 9ª semanas pós-parto (11,0 vs. 12,2 mg/dL). O aumento de NUL também foi verificado por Recktenwald et al. (2014) em vacas leiteiras suplementadas com monensina e em dietas com alto teor de proteína bruta (16,7 % MS), entretanto houve redução do NH₃ no rúmen. Raun et al. (1976) relataram aumento do N ureico no plasma (NUP) em vacas de corte suplementadas com monensina (44 mg/kg/MS). O aumento do NUP que está relacionado ao NUL parece ser consistente entre diferentes estudos quando a monensina foi suplementada (HAYES; PFEIFFER; WILLIAMSON, 1996). Kauffman e St-Pierre (2001) relataram relação linear entre N excretado na urina, NUP e NUL. Duffield, Rabiee e Lean (2008a) reportaram em uma meta-análise, que a monensina aumentou a concentração de NUP (6 %) em vacas leiteiras comparado ao controle. O aumento no NUP pode resultar pela menor reciclagem da ureia no trato gastrointestinal (HARMON, GROSS; AVERY, 1989).

O aumento de propionato ruminal com o uso de monensina reduz a mobilização de gordura corporal e o fluxo de AG para o fígado. Os efeitos do beta-hidroxibutirato (BHBA) e dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) com o uso de monensina foram correlacionados ($r^2 = 0,45$), e a redução de AGNE reduzem concomitante às concentrações de BHBA no sangue. A menor quantidade de AG chegando ao fígado e a conversão do propionato em glicose proporcionam tanto um aumento na oxidação dos AG como a redução parcial na oxidação, levando a menores concentrações de BHBA e acetoacetato. Uma menor infiltração de gordura nos hepatócitos pode melhorar a função hepática.

Parte da explicação do aumento observado no NUP com o uso de monensina pode ser em virtude de melhor capacidade do fígado em sintetizar ureia (DUFFIELD et al., 2008a). Entretanto, esses resultados são contraditórios, pois normalmente vacas suplementadas com monensina apresentam menores concentrações de NH₃ ruminal (RECKTENWALD et al., 2014). Em teoria o padrão da concentração de NUP ao longo do tempo deve refletir a concentração de NH₃ ruminal, pois o fígado remove essencialmente todo o N-NH₃ da veia porta o que pode representar 70 a 80 % do N-ureia liberada pelo fígado (HUNTINGTON, 1990). Outros autores explicam que o resultado de maior concentração de NUP é devido a maior quantidade N oriundo de AA dietéticos chegando ao duodeno (ZINN et al., 1991;

HAYES, PFEIFFER; WILLIAMSON, 1996). Haïmoud et al. (1995) observaram em vacas leiteiras que o fluxo de N microbiano para o duodeno não foi afetado pela monensina, mas o fluxo (1997,1 vs. 1704,5 g/d) e a absorção aparente de AA totais no duodeno (1381,1 vs. 1046,7 g/d) e (69,1 vs. 61,3 %) foram maiores comparados ao controle.

Recktenwald et al. (2014) reportaram que o aumento do NUP deveria ser correspondente à maior excreção de N na urina, contudo eles encontraram uma relação inconsistente entre os dois parâmetros. A monensina aumentou a excreção urinária de N nas dietas com alto teor de amido e não teve efeito em dietas com baixo teor de amido. Esse efeito pode estar relacionado com as concentrações de NUP, mas também pode ser função da excreção fecal e urinária do N-ureia. O aumento do NUP nem sempre resulta em uma excreção de ureia na urina, os autores ressaltam que a monensina facilita o transporte de NH_3 do rúmen para o plasma, direta ou indiretamente, levando à maior concentração de NUP, mas sem afetar a excreção urinária de N-ureia.

Yang e Russell (1993a) avaliaram os efeitos da monensina sobre o crescimento de bactérias ruminais com alta capacidade de produzir NH_3 . Os animais receberam uma dieta basal (feno de Timóteo), com adição de 0, 1 ou 2 kg/d de farelo de soja e 350 mg/d de monensina ou controle. A monensina reduziu a concentração de NH_3 ruminal cerca de 30 % ($P < 0,01$), independentemente da quantidade de farelo de soja fornecida. A monensina reduziu a população de bactérias proteolíticas cerca de 10 vezes ($P < 0,01$) comparado ao controle. Rodriguez, Craig e Hembry (1986) constataram em novilhos de corte os efeitos da monensina (33 mg/kg/MS) na concentração de NH_3 nas frações fluida e sólida no rúmen. A monensina reduziu a concentração de NH_3 no rúmen (8,3 vs. 12,1 $\mu\text{M}/\text{mL}$, $P < 0,05$), mas não teve influência no volume do fluido ruminal (41 vs. 40 L) e nem na taxa de passagem (8 vs. 9 %/h), o que poderia ter influenciado a concentração de NH_3 ruminal.

Whetstone, Davis e Bryant (1981) avaliaram *in vitro* o efeito da monensina sobre a proteólise, além de identificar em quais etapas a monensina age na degradação de caseína. Houve redução linear na proteólise (277, 261, 231, mg/100 mL) e na concentração de NH_3 (31,0, 30,6, 25,4 mg/100 mL), com a adição de (0, 1 e 4 mg/kg) de monensina, respectivamente. A monensina tendeu a aumentar alfa-amino N (47,1, 57,3, 51,5 mg/100mL), indicando que a taxa de proteólise excedeu a taxa de desaminação. A fração peptídica aumentou linearmente com monensina (41, 69, 73 mg/100mL). Yang e Russell (1993b) relataram em trabalho *in vitro* que houve aumento na concentração de NH_3 , quando bactérias receberam proteína hidrolisada. Entretanto, quando 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de monensina foi adicionado no meio de cultura, houve uma redução na concentração de NH_3 . Em trabalho *in vivo* conduzido

pelos mesmos autores, foi observado que vacas suplementadas com monensina reduziram cerca de 50 % a concentração de NH_3 ruminal. Eles ressaltam que o efeito da monensina em poupar o catabolismo de AA se deve à redução do número de algumas bactérias que utilizam AA e peptídeos como única fonte de energia para o seu crescimento. As últimas bactérias identificadas foram *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum*.

Hagen, Martin e Shaver (2015) avaliaram os efeitos da monensina e do balanceamento de AA sobre o desempenho de vacas leiteiras. Utilizaram 128 vacas com 104 ± 39 dias em lactação, blocadas por raça, paridade e dias em lactação, distribuídas em 16 baias, com oito vacas em cada. As baias foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: controle, aminoácido (AA), monensina (540 mg/vaca/d) e aminoácido + monensina (540 mg/vaca/d) (AAMON). Todas as dietas continham 16,4 % PB e nos tratamentos AA e AAMON foi suplementado farinha de sangue e metionina protegida para atingir uma relação 3:1 de lisina/metionina na proteína metabolizável. Não foi observada diferença na produção de leite (48,5 kg/d), mas a monensina reduziu o CMS (26,9 vs. 27,6 kg/d), aumentou a eficiência alimentar (1,81 vs. 1,75) e a eficiência de leite corrigido para sólidos (1,53 vs. 1,49). A monensina aumentou o NUL (14,25 vs. 13,85 mg/dL) comparado aos tratamentos sem monensina. Houve também aumento no NUL quando a monensina foi associada à aminoácidos (14,5 vs. 14,0 mg/dL). O tratamento AA aumentou o teor (3,15 vs. 3,08 %) e a produção de proteína no leite (1,53 vs. 1,49 kg/d). O fornecimento de monensina juntamente com uma fonte exógena de AA, pode ser mais benéfico do que quando esses são fornecidos separadamente, porque a monensina pode reduzir a desaminação de AA no rúmen e possivelmente aumentar o fluxo de AA dietéticos para o duodeno. Além disso, a redução da desaminação pode favorecer a utilização e a conversão de peptídeos e aminoácidos em proteína microbiana, já que os microrganismos ruminais também têm exigência por esses compostos (YANG; RUSSELL, 1993a).

Poos, Hanson e Klopfenstein (1979) demonstraram em experimento com ovinos que a monensina reduziu a concentração de NH_3 ruminal independente da fonte de N dietético, ureia ou grão seco de cevada (28,5 vs. 16,2 mg/100mL). Apesar da menor concentração de NH_3 ruminal, os animais suplementados com monensina tiveram maior concentração de NUP (15,8 vs. 12,8 mg/100mL). Os mesmos autores em um segundo experimento com ovinos reportaram resultados semelhantes ao primeiro. A monensina reduziu a concentração de NH_3 ruminal ($P < 0,01$) e aumentou o NUP ($P < 0,01$). Russell, Strobel e Chen (1988) concluíram que a capacidade de produção de NH_3 *in vivo* de *Peptostreptococcus sp.* e *Clostridium sp.* foi

de 10 a 39 vezes maior do que a obtida com outras bactérias produtoras de NH_3 . Krause e Russell (1996) relataram que (5 μM) monensina reduziu a produção de NH_3 *in vitro* e esse decréscimo foi associado à redução na quantidade de rRNA de *Peptostreptococcus anaerobius* e *Clostridium sticklandii*.

Wang et al. (2015) avaliaram o efeito da monensina e hainamicina no metabolismo de proteína no rúmen e a população de bactérias proteolíticas. Utilizaram três novilhas Holandês canuladas no rúmen. Os tratamentos foram monensina (350 mg/d), hainamicina (20 mg/d) e controle. Os ionóforos reduziram a proporção molar de isovalerato no rúmen ($P < 0,05$) comparado ao controle. A redução desse isoácido de cadeia ramificada indica que houve redução no catabolismo de AA, em especial a leucina (MACKIE; WHITE, 1990). Nesse mesmo trabalho houve redução na quantidade de bactérias ruminais proteolíticas (3,7, 0,69, 0,69 x $10^6/\text{mL}$) para os tratamentos controle, monensina e hainamicina, respectivamente. A suplementação de ionóforos reduziu a atividade de peptidases e deaminases ($P < 0,05$) observada pelo aumento da concentração de peptídeos e AA no fluido ruminal ($P < 0,05$), além da redução de NH_3 ruminal ($P < 0,05$).

Beede et al. (1986) relataram que novilhos de corte suplementados com monensina (27 mg/kg/MS), tiveram maior retenção de N comparado ao controle (9,0 vs. 13,2 g/N/d). A monensina aumentou a porcentagem do N absorvido que foi retido (40,8 vs. 31,8 %), aumentou o N retido como porcentagem do N ingerido (20,1 vs. 13,6 %) e reduziu o N excretado na urina como porcentagem do N absorvido (59,1 vs. 68,2 %). Os mesmos autores em um segundo experimento, mas com caprinos, reportaram que a monensina aumentou a absorção aparente do N (3,7 vs. 3,1 g/N/d), mas aumentou a excreção de N na urina (2,5 vs. 1,7 g/N/d).

Ruiz et al. (2001) avaliaram o efeito da monensina sobre o desempenho e a utilização do N em dietas à base de forragem fresca (cortada e fornecida no cocho). Utilizaram 30 vacas Holandês com 126 dias em lactação, distribuídas em dois tratamentos monensina (350 mg/d) ou controle. A monensina aumentou a produção de leite (1,85 kg/d). Não foram observadas diferenças em NUL e NUP, mas a monensina reduziu a concentração de NH_3 ruminal (5,03 vs. 6,07 mM) e o N fecal (135,8 vs. 156,9 g/d). Sem que houvesse diferença da excreção de N na urina entre os tratamentos. Em contraste, Gehman et al. (2008) identificaram em estudo com vacas em lactação que a monensina (300 mg/d) reduziu os isoácidos de cadeias ramificada e linear no rúmen (isobutirato e valerato), mas não reduziu a concentração de NH_3 no rúmen (8,43 vs. 7,99 mg/dL) e não teve efeito sobre o consumo de N, sobre as excreções de N fecal, urinário e no leite, conseqüentemente, não afetou a quantidade de N retido.

Bergen e Bates (1984) resumiram vários trabalhos relacionados à monensina e observaram que este ionóforo aumentou o escape de proteína verdadeira do rúmen, variando de 22 a 55 % da degradação ruminal. A redução da desaminação resultou em menor perda de N-ureia por excreção urinária, aumentou a retenção de N e melhorou a eficiência de utilização do N. Logo, o aumento da eficiência alimentar em animais suplementados com monensina está associado ao aumento da proporção molar do propionato no rúmen, que reduz a dependência de aminoácidos para gliconeogênese, e o efeito da eficiência da utilização do N atribuído à ação da monensina na redução da população das bactérias capazes de realizar proteólise e desaminação no rúmen, consequentemente mais AA dietéticos atingem o duodeno (RUSSELL; STROBEL, 1989).

2.5.5 Bio-hidrogenação no rúmen e perfil de ácidos graxos na gordura do leite

A bio-hidrogenação é um mecanismo de defesa para os microrganismos ruminais contra os efeitos tóxicos da gordura, especialmente, os AGI e para suprir a sua exigência nutricional por ácido vacênico C18:1 *trans*-11 utilizado na composição lipídica das membranas celulares (JENKINS, 1993). Os microrganismos ruminais realizam extensa alteração nos AG dietéticos, oriundos de forragens e grãos, que estão na forma de triglicerídeos com perfil predominantemente insaturados (JENSEN et al., 2002). A hidrogenação ruminal dos AG linoleico e linolênico da dieta pode atingir cerca de 70 a 95 % e 85 a 100 %, respectivamente (LOCK et al., 2006). A inclusão de AG (ONETTI et al., 2001) e/ou o grau de insaturação dos AG, podem reduzir a população de microrganismos no rúmen (OLDICK; FIRKINS, 2000). Os AG de cadeia curta, insaturados e livres são mais tóxicos para as bactérias ruminais do que os AG de cadeia longa, saturados e esterificados (PALMQUIST; JENKINS, 1980), necessitando ter um grupo carboxil livre para que a toxicidade ocorra (YABUUCHI et al., 2006). Os microrganismos mais susceptíveis ao efeito tóxico da gordura são as bactérias, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus spp.*, *Archaeas* e os protozoários (PALMQUIST; JENKINS, 1980; RUSSELL; RYCHLICK, 2001).

As bactérias que realizam a bio-hidrogenação dos AGI são divididas em dois grupos, A e B. As bactérias do grupo A são capazes de transformar ácido linoleico em C18:1 *trans*-10 e, à partir desse AG intermediário transformar em AG esteárico. Já as bactérias do grupo B são capazes de hidrogenar uma grande diversidade de AG com uma única dupla ligação em ácido esteárico (JENKINS et al., 2008). A monensina inibe majoritariamente, bactérias do grupo A, podendo inibir algumas bactérias do grupo B (VAN NEVEL; DEMEYER, 1995).

As bactérias *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus albus* que pertencem ao grupo A são inibidas pela monensina, podendo aumentar o fluxo de AG intermediários para o duodeno (NAGARAJA et al., 1997; CALLAWAY; ADAMS; RUSSELL, 1999). Em alguns estudos foi observado que bactérias do grupo B, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, podem converter C18:2 em intermediários *trans*-10 (WALLACE et al., 2005). A *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* são insensíveis ou pouco sensíveis à monensina (RYCHLIK; LAVERA; RUSSELL, 2002).

A bio-hidrogenação do ácido linolênico e linoleico são realizadas por bactérias do grupo A e B (BAUMAN; GRIINARI, 2001; DESTAILLATS et al., 2005). A bio-hidrogenação pode ser reduzida por baixo pH ruminal, presença de ionóforos e teor de AGI livres no fluido ruminal, favorecendo o acúmulo ruminal dos intermediários (JENKINS; HARVATINE, 2014). O aumento do fluxo para o duodeno de intermediários da bio-hidrogenação, foi associado à menor síntese de gordura na glândula mamária (BAUMAN; GRIINARI, 2001). Griinari et al. (1998) reportaram que o isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12 é um potente inibidor da síntese de gordura do leite. Baumgard, Sangster e Bauman (2001) ressaltaram que a infusão abomasal de doses variando de 3,5 a 14 g/d de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 reduziu 25 a 50 % a secreção de gordura no leite, no entanto esse isômero ocorre em concentrações muito baixas na gordura do leite. As associações mais fortes são observadas com o ácido C18:1 *trans*-10 e, recentemente, outros pesquisadores (SAEBO et al., 2005; PERFIELD et al., 2007) apontaram que os isômeros C18:2 *cis*-10, *trans*-12 e C18:2 *trans*-9, *cis*-11, também são capazes de reduzir a síntese de gordura no leite.

A monensina tem sido associada à redução do teor e da produção (BRODERICK, 2004; ALZAHAL et al., 2008) e às mudanças nas proporções de AG na gordura do leite (BELL; GRIINARI; KENNELLY, 2006; HE et al., 2012). Mas a magnitude da depressão de gordura no leite está pelo menos em parte, relacionada à concentração de ionóforo suplementado. Pode estar também associada à fibra fisicamente efetiva da dieta e ao efeito de diluição, já que, em alguns trabalhos, animais suplementados com monensina aumentaram a produção de leite (DUFFIELD et al., 2003; IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003).

Nos trabalhos de Griinari et al. (1998) e Bauman e Griinari (2003) o aumento de C18:1 *trans*-10 foi associado à redução no teor da gordura no leite. Jenkins, Fellner e McGuffey (2003) em trabalhos *in vitro* demonstraram que os tratamentos com monensina aumentaram C18:1 *trans*-10 e reduziram C18:0, sugerindo que a monensina interfere na conversão final de AG *trans* em saturados. No trabalho de He et al. (2012) a monensina não afetou o teor e a produção de gordura no leite, entretanto reduziu as proporções dos AG de

cadeia curta e média ($C < 16:0$), aumentou a proporção e a produção de C18:1 *trans*-10 e a proporção de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 no leite. Além disso, as dietas ricas em C18:2 (AG linoleico) reduziram o teor e a produção de gordura no leite comparadas a dietas ricas em C18:1 (AG oleico), indicando que C18:2 é mais potente que C18:1 para reduzir a gordura no leite. Reveneau et al. (2012b) também não observaram redução no teor e na produção de gordura no leite, entretanto a monensina reduziu as proporções dos AG C6:0, 8:0 e 10:0 ($P < 0,05$) e tendeu a aumentar as proporções dos isômeros C18:1 *trans*-10 e C18:1 *trans*-11 no leite ($P = 0,07$). Em contraste, Lock et al. (2007) não verificaram redução na síntese de gordura no leite, quando infundiram C18:1 *trans*-10 no abomaso de vacas de leiteiras. Embora o C18:1 *trans*-10 esteja altamente correlacionado com depressão da gordura no leite, ele pode não ser um AG bioativo.

Nas décadas de 80 e 90 a explicação para a redução do teor de gordura no leite com o uso da monensina era baseada na redução dos AG de cadeia curta, acetato e butirato. Esses AG são precursores da síntese de *novo* da gordura no leite (VAN DER WERF; JONKER; OLDENBROEK, 1998). No entanto alguns autores reportaram em estudos utilizando radioisótopos, que a concentração de acetato não reduz em dietas depressoras de gordura no leite, geralmente o que ocorre é o aumento da concentração de propionato, reduzindo assim a relação entre acetato e propionato no rúmen (JENKINS; HARVATINE, 2014). A maior concentração de glicose no sangue (NTAMBI; MIYAZAKI, 2004), maiores proporções de propionato no rúmen ou maior absorção de glicose duodenal podem aumentar a atividade da enzima esteroil-CoA Δ 9-desaturase, e aumentar AG intermediários na glândula mamária (NOCEK; TAMMINGA, 1991; VLAEMINCK et al., 2004b).

Outra explicação para redução na concentração de gordura no leite e a mais aceita atualmente é que a monensina inibe etapas da bio-hidrogenação no rúmen (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997), e assim aumenta o fluxo de AG intermediários para o duodeno principalmente C18:2 *trans*-10, *cis*-12, C18:1 *trans*-10, C18:2 *cis*-10, *trans*-12 e C18:2 *trans*-9, *cis*-11 (BAUMAN; GRIINARI, 2001). Esses intermediários podem inibir a expressão gênica de enzimas como esteroil-CoA Δ 9-desaturase e acetil-CoA carboxilase, as quais estão envolvidas na síntese de AG na glândula mamária (PIPEROVA et al., 2000; PERFIELD et al., 2006).

Fellner, Sauer e Kramer (1997) demonstraram *in vitro* que monensina reduz a bio-hidrogenação dificultando a formação do ácido esteárico C18:0 e aumentando a concentração do C18:1. A monensina alterou a bio-hidrogenação do AG C18:2 n-6. Antes da adição de C18:2 n-6, 47 % dos AG eram C18:0 no tratamento controle, a adição de monensina reduziu

essa proporção de C18:0 para 36 %. Após a adição de C18:2 n-6, a redução de C18:0 foi de 3 % no controle e 15 % para monensina. As alterações na concentração de C18:0 após a adição de C18:2 n-6, também refletiram na taxa de produção de C18:0, a qual foi de 7,5 mg/L/h no controle e 1,4 mg/L/h na presença de monensina. Em torno de 90 % dos CLA acumulados na presença de monensina os quais consistiam em dois isômeros, C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12. As bactérias responsáveis pela formação de ácido oleico à partir da bio-hidrogenação do ácido linoleico, são bactérias sensíveis à monensina (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* e *Eubacterium sp.*), já as bactérias responsáveis pela formação de ácido esteárico, à partir de ácido oleico são bactérias menos sensíveis à monensina (FUJIMOTO et al., 2003).

Odongo et al. (2007) avaliaram o efeito a longo prazo da monensina sobre o perfil de AG no leite. Os animais foram distribuídos em dois tratamentos, controle ou monensina (24 mg/kg/MS). A monensina reduziu o teor de gordura (3,90 vs. 3,53 %, $P < 0,01$) e de proteína no leite (3,37 vs. 3,23 %, $P < 0,01$) e também reduziu as proporções dos AG de cadeia curta e média no leite (C7:0; C9:0, C12:0, C14:0, C15:0 e C16:0, $P < 0,05$) comparado ao controle. Isto pode ser explicado pelo aumento da proporção do CLA *trans*-9, *cis*-11 com monensina (0,052 vs. 0,060 %, $P = 0,01$), já que a concentração de C18:1 *trans*-10 foi menor para este ionóforo (0,985 vs. 0,758 %, $P < 0,01$). Fairfield et al. (2007) reportaram que o CLA *trans*-9, *cis*-12 têm efeito depressor no teor da gordura no leite. A monensina aumentou as proporções de AGS de cadeia longa (12,3 vs. 13,3 %, $P < 0,01$), os AG monoinsaturados totais (26,0 vs. 27,4 %, $P = 0,07$), os AG polinsaturados n-3 (0,51 vs. 0,59 %, $P < 0,01$) e n-6 (2,21 vs. 2,62 %, $P < 0,01$), além dos CLAs totais (0,562 vs. 0,806 %, $P < 0,01$) na gordura do leite.

Do Prado et al. (2015) avaliaram o efeito da monensina associada à óleo de girassol, sobre o perfil de AG na gordura do leite. Os animais foram distribuídos em 4 tratamentos, controle, monensina (16 mg/kg/MS), óleo de girassol (OG 4,2 % MS) ou Mix (monensina 16 mg/kg/MS + OG, 4,2 % MS). Não houve diferença na produção de leite (32,5 kg/d), mas houve diferença numérica no teor (3,27; 3,16; 3,79 e 2,86 %) e na produção de gordura no leite (1,16; 1,02; 1,38 e 0,82 kg/d), e menor proporção do AG C18:0 (10,77, 15,02, 9,59 e 12,93 %) para controle, OG, monensina e Mix, respectivamente. As proporções dos isômeros C18:1 *trans*-10 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12 aumentaram quando a monensina foi associada à AGI (1,2, 5,94, 1,1 e 9,92 %), para controle, OG, monensina e Mix. É necessário cautela na interpretação da concentração de C18:0 no leite, uma vez que C18:0 é dessaturado em uma taxa elevada para C18:1 *cis*-9 na glândula mamária (RICO; HOLLOWAY; HARVATINE, 2014). A monensina age primariamente inibindo a lipólise, ou seja, inibe a formação de ácido

carboxílico livre, necessário para que ocorra hidrogenação das ligações duplas (VAN NEVEL; DEMEYER, 1995). A associação de monensina, AGI e amido de alta digestibilidade pode intensificar a redução da lipólise e da bio-hidrogenação dos AG no rúmen (GERSON; JOHN; KING, 1985). A presença de uma ligação dupla *trans*-10 nos isômeros de CLA parece ser necessária para que ocorra a depressão na síntese da gordura no leite. Baumgard et al. (2000) quando infundiram C18:2 *trans*-10, *cis*-12 no abomaso de vacas leiteiras, observaram redução em 44 % na gordura do leite, mas a infusão de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 não afetou o teor de gordura no leite.

Há um interesse crescente na composição dos AG na gordura do leite como marcadores da função ruminal. Os AG de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) no leite são de interesse, porque estão associados à concentração de populações de bactérias específicas no rúmen (ante-iso C15:0, ante-iso C17:0 - bactérias amilolíticas), (iso C15:0, iso C17:0 - celulolíticas) e conseqüentemente ao padrão da fermentação ruminal (VLAEMINCK et al., 2006c). Todos os AGCIR são oriundos de bactérias do rúmen, isso é evidenciado pelo fluxo duodenal desses AGCIR que é igual à secreção no leite, ou seja, não há síntese de *novo* na glândula mamária desses compostos. Os AGCIR são formados, com base em um carbono “primer”, oriundo de isoácidos de cadeia ramificada, isobutirato, isovalerato e 2 metilbutirato, que são produtos da desaminação dos aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina (KANEDA, 1991). Os AGCIR fazem parte da composição lipídica da membrana celular das bactérias do rúmen e quando chegam ao duodeno, esses lipídeos são absorvidos, e posteriormente, chegam ao sangue e são incorporados à gordura do tecido adiposo e à gordura do leite (VLAEMINCK et al., 2006a; CABRITA et al., 2007).

Colman et al. (2010) identificaram aumento nas concentrações de ante-iso C17:0 e ante-iso C15:0 e redução iso C14:0 e iso C16:0, em vacas leiteiras, durante a indução de acidose ruminal subclínica. Após retornar a uma dieta padrão, apenas ante-iso C15:0 voltou à concentração pré-indução, enquanto os outros AGCIR no leite continuaram com concentrações semelhantes ao período de indução de acidose. As proporções dos AGCIR do leite, iso C14:0, iso C15:0 foram correlacionadas, positivamente, com a proporção molar de acetato e pH do rúmen. Em adição, Vlaeminck et al. (2006b) constataram uma correlação positiva entre a proporção molar de acetato no rúmen e as concentrações iso C14:0 e C15:0 na gordura do leite; e entre ante-iso C15:0, C17:0 e a proporção molar de propionato no rúmen, e correlação negativa entre a proporção de forragem na dieta e ante-iso C15:0 no leite ($r^2 = -0,77$, $P < 0,01$). O AGCIR iso C17:0 correlacionou, positivamente, com AG intermediários da rota padrão da bio-hidrogenação, C18:2 *cis*-9 *trans*-11 e C18:1 *trans*-11 no leite. Esses

intermediários são prevalentes em situações nas quais o ambiente ruminal está menos acidogênico. O AGCIR iso C17:0, também, tem sido utilizado como um marcador da eficiência de síntese relativa microbiana no rúmen, tendo correlação positiva entre adenina e o fluxo duodenal de N microbiano.

2.5.6 Consumo de matéria seca

A maior fermentabilidade do amido dietético aumenta a produção de AGV por unidade de matéria orgânica fermentada no rúmen e a proporção molar de propionato (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009). O propionato e os AGNE são substratos utilizados pelo fígado dos ruminantes (EMERY; LIESMAN; HERDT, 1992). A oxidação desses substratos regula a ingestão de alimentos por meio de sinais enviados do fígado para o cérebro (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009). Se o fluxo de propionato para o fígado ultrapassa a capacidade de gliconeogênese, o propionato pode ser oxidado no ciclo de Krebs (AIELLO; ARMENTANO, 1987; BRADFORD; ALLEN, 2007b), bem como estimular a oxidação de acetil-CoA derivado de outros metabólitos (ALLEN, 2000). A oxidação do propionato durante a ingestão, aumenta o *status* energético hepático, gerando um sinal de saciedade para terminar a refeição (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

O aumento na proporção de propionato que chega ao fígado pode ter diferentes efeitos no CMS, dependendo do estágio de lactação dos animais (OBA; ALLEN, 2003b; DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008b). Os animais com grande necessidade de nutrientes para glândula mamária (BELL; BURHANS; OVERTON, 2000; AGUILAR, 2005), como início da lactação, aumentam a demanda de propionato para a síntese de glicose em vez de oxidá-lo. Assim, o propionato parece não ser tão hipofágico nesse estágio da lactação (OBA; ALLEN, 2003b; REYNOLDS et al., 2003). McCarthy et al. (2015a) observaram que vacas leiteiras suplementadas com monensina consumiram mais (20,0 vs. 18,9 kg/d/MS, $P = 0,02$) que o controle durante as nove primeiras semanas pós-parto, embora o aumento do CMS normalmente não é observado em animais suplementados com monensina. Em contraste, Van Der Werf, Jonker e Oldenbroek (1998) observaram apenas diferenças numéricas no CMS (25,6; 25,6; 25,3 e 25,0 kg/d) em vacas leiteiras suplementadas com monensina (0, 150, 300 e 450 mg/d) no pós-parto. O aumento do CMS de vacas no pós-parto geralmente resulta em menor concentração de AGNE circulantes e tem sido associado à melhor saúde hepática, desempenho produtivo e balanço negativo de nutrientes menos acentuado (INGVARTSEN; ANDERSON, 2000).

O aumento da proporção ou da absorção de propionato também tem efeito no tamanho e frequência das refeições. De acordo com essa teoria, a maior quantidade de propionato que chega ao fígado reduz o tamanho das refeições e aumenta a frequência (OBA; ALLEN, 2003a). A suplementação com monensina aumenta a proporção molar de propionato no rúmen, portanto pode alterar o comportamento ingestivo. O comportamento ingestivo de novilhos de corte recebendo dietas com alto teor de concentrado (85 % MS) suplementados com monensina foi caracterizado por refeições mais frequentes (7,1 vs. 6,2, refeições/d) e menores (2,2 vs. 3,7, kg/refeição) (ERICKSON et al., 2003). Burrin e Britton (1986) afirmaram que a monensina reduziu a variação de ingestão, aumentou a frequência das refeições e o pH ruminal em novilhos recém-aloçados no confinamento com dietas contendo 75 % de concentrado, nos primeiros seis dias de adaptação e 95 % de concentrado à partir do sétimo dia. Além disso, a monensina tendeu a reduzir o tamanho da primeira refeição do dia (4,5 vs. 5,4 kg), embora não tenha afetado o CMS diário em vacas leiteiras (FANNING et al., 1999). Lunn et al (2005) também relataram alterações no padrão ingestivo de vacas leiteiras, onde os animais suplementados com monensina aumentaram o número e reduziram o tamanho das refeições/d durante o período de indução de acidose ruminal subclínica e recuperação. O aumento da frequência alimentar reduz o consumo de amido por refeição e isso pode reduzir o risco de acidose ruminal (YANG; VARGA, 1989). Durante períodos de acidose ruminal, vacas leiteiras também alteram a seleção de alimentos. Animais com maior risco de acidose ruminal subclínica selecionam a favor de partículas longas na dieta (> 8 mm). Em um trabalho com indução de acidose ruminal subclínica, substituição da dieta por uma mistura de grãos moídos de trigo e cevada (6,5 kg/d) resultou em aumento da seleção a favor de feno de alfafa picado longo, comparado ao feno de alfafa peletizado (KEUNEN et al., 2002). Vacas alimentadas com dieta com baixa inclusão de forragem selecionaram contra partículas retidas na peneira do fundo (Penn State) e a favor de partículas acima de 8 mm (DEVRIES; DOHME; BEAUCHEMIN, 2008).

Em uma meta-análise, Duffield, Rabiee e Lean (2008b) utilizando 9.677 dados de vacas em lactação, reportaram que a monensina reduziu o CMS (0,30 kg/d, $P < 0,01$). Em outra meta-análise, Duffield, Merrill e Bagg (2012) observaram que a monensina reduziu o CMS (0,268 kg/d, $P < 0,01$) em bovinos de corte nas fases de crescimento e terminação. Houve interação dieta e monensina, já que em dietas com silagem de milho, a monensina reduziu ainda mais o CMS (0,328 kg/d, $P < 0,01$). Symanowski et al. (1999) utilizando 858 dados de vacas leiteiras, afirmaram que a suplementação com monensina (16 a 24 mg/kg/MS) reduziu 4 % o CMS durante toda lactação (305 dias) comparado ao controle. Burrin, Stock e

Britton (1988) utilizaram novilhos recém-alocados no confinamento recebendo dietas contendo 75 % de concentrado nos primeiros seis dias de adaptação e 95 % de concentrado à partir do sétimo dia, com doses 0, 11 ou 33 mg/kg/MS de monensina. A monensina na dose 11mg/kg/MS aumentou o CMS nos primeiros 28 dias, enquanto a dose de 33 mg/kg/MS reduziu o CMS em 10 %. De acordo com Ipharraguerre e Clark (2003) quando a monensina foi suplementada nas dosagens de 300 a 400 mg/d, o CMS em vacas leiteiras tendeu reduzir ou não alterar.

Em uma revisão, Muller, Bargo e Ipharraguerre (2006) observaram dados de 9 experimentos, com 818 vacas em lactação, realizados para regulamentação do uso da monensina em vacas leiteiras nos USA. Os tratamentos foram 0, 11, 15 e 22 g/tonelada/MS de monensina. A monensina reduziu o CMS (20,0; 19,7 e 19,2 kg/d, $P < 0,05$ e $P < 0,01$) nas doses 15 e 22 g/tonelada/MS, comparado ao controle. Xu et al. (2014) relataram redução no CMS ($P < 0,01$) em bovinos de corte, quando aumentaram a dose de monensina (28 vs. 44 mg/Kg/MS), sem que houvesse diferença no ganho de peso e eficiência alimentar. Bagg et al. (2005) forneceram diferentes doses de monensina para vacas leiteiras, em concentrações até 10 vezes maior do que o recomendado (240 mg ou 4.865 mg/d). O CMS reduziu cerca de 50 % (22,7 vs. 10,4 kg/d) nos animais que receberam a dose mais alta de monensina e os animais que receberam menores doses (72 e 144 mg/d) também reduziram o CMS, mas em menor magnitude.

2.5.7 Produção e composição do leite

A mudança do perfil da fermentação ruminal com o uso de monensina favorece o aumento de propionato e pode aumentar a produção de leite. Dentre 32 estudos avaliados, 18 não tiveram resposta positiva à suplementação com monensina e os outros 14 aumentaram significativamente a produção de leite (2,6 a 11,2 %), variando de 0,4 a 2,8 kg/d (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003).

O efeito da monensina sobre a produção de leite pode estar relacionado ao escore de condição corporal (ECC) no início da suplementação. Duffield et al. (1999a) avaliaram 1.010 vacas e novilhas em 25 diferentes fazendas. Os animais foram suplementados com monensina (335 mg/d) ou controle (placebo), antes da data prevista do parto (-21 d) e foram classificados como magro (ECC < 3,25), adequado (3,25-3,75) ou gordo (ECC > 3,75). Não houve diferença na produção de leite nos animais classificados como magros. Entretanto, a monensina aumentou a produção de leite (0,85 e 1,25 kg/d, $P < 0,05$) nos animais

classificados como adequados e gordos, respectivamente. Não houve diferença nos teores de gordura e proteína no leite. A melhoria relacionada à monensina na redução das concentrações de BHBA no sangue e aumento nas concentrações plasmáticas de glicose e aspartato aminotransferase, suporta a hipótese de que o aumento na produção de leite foi decorrente de um melhor *status* energético e hepático das vacas com ECC adequado e gordo.

A suplementação com ionóforos normalmente tem efeito negativo sobre o teor e/ou produção de gordura no leite (SAUER; KRAMER; CANTWELL, 1989; LOWE et al., 1991). Esse efeito pode estar relacionado com a bio-hidrogenação dos AGI no rúmen ou com o efeito de diluição, uma vez que animais suplementados com monensina podem aumentar a produção de leite (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003; DUFFIELD; RABIEEE; LEAN, 2008b).

Duffield, Rabiee e Lean (2008b) utilizando dados de 9.677 vacas em lactação, observaram em uma meta-análise que a monensina aumentou a produção de leite (0,7 kg/d, $P < 0,01$) e reduziu o teor de gordura no leite em 2,5 % ($P < 0,01$), entretanto, não houve efeito na produção de gordura. A monensina reduziu os AG de cadeia curta, e o C18:0 e aumentou significativamente os CLA no leite. O efeito da monensina foi influenciado por diferentes fatores, entre eles, a forma com que a monensina foi suplementada, o estágio da lactação, a dose e a composição da dieta. Animais que receberam dietas com maior proporção de C18:1 associado à monensina tiveram depressão mais pronunciada da produção de gordura no leite. A produção de leite aumentou em vacas suplementadas em *top dress* e em vacas à pasto. Houve também aumento das produções de gordura e proteína no leite. Vacas suplementadas com monensina com cápsulas de liberação controlada foram associadas à menor redução do teor de gordura no leite.

Phipps et al. (2000) avaliaram os efeitos da monensina no desempenho produtivo de vacas em lactação durante 13 semanas. Utilizaram 60 vacas Holandês Frísio distribuídas em quatro tratamentos: controle e diferentes doses de monensina (150, 300 e 450 mg/d). As dietas continham 50,4 % silagem de milho, 13,4 % silagem de gramínea e 36,2 % de concentrado (% MS). Não houve diferença no CMS (19,1 kg/d), mas monensina aumentou a produção de leite (27,8; 27,5 e 25,0 kg/d, $P < 0,01$) nas doses 150 ou 300 mg/d, quando comparado ao controle. A monensina reduziu os teores de gordura (3,90; 3,58; 3,44 e 3,44 %, $P < 0,01$) e de proteína no leite (3,39; 3,24; 3,25 e 3,23 %) nos tratamentos controle, 150, 300 e 450 mg/d, respectivamente.

Van Der Werf, Jonker e Oldenbroek (1998) reportaram que a suplementação com monensina (0, 150, 300 ou 450 mg/d) aumentou a produção de leite (35,3; 36,7; 36,4; 37,1 kg/d) entre as semanas 5 e 24 pós-parto. O teor de gordura no leite reduziu com a maior dose

de monensina comparada ao controle (4,56 vs. 4,15 %), resultado atribuído ao efeito de diluição, já que os animais produziram 1,8 kg de leite a mais. Em uma revisão, Muller, Bargo e Ipharraguerre (2006) relataram dados de 14 experimentos realizados nos EUA para regulamentação pelo FDA o uso de monensina para vacas leiteiras à pasto, totalizando 2.472 vacas suplementadas com monensina (335 mg/d). A monensina aumentou a produção de leite (0,9 kg/d) comparado ao controle. Em contraste, Muller, Bargo e Ipharraguerre (2006) em uma outra revisão com dados de 9 experimentos com o mesmo objetivo em vacas leiteiras confinadas, totalizando 818 vacas suplementadas com monensina (0, 11, 15 e 22 g/tonelada). Não houve diferença na produção de leite (28,6 kg/d), mas houve redução no teor de gordura (3,65 vs. 3,59 %) e (3,49 vs. 3,38 %) para as doses 15 e 22 g/tonelada de monensina, respectivamente, comparado ao controle.

A preocupação do uso de antibióticos na produção de leite está relacionada à possibilidade de resíduos no produto final. Entretanto resíduos de monensina parecem não ser um problema na indústria leiteira, já que Bagg et al. (2005) ao fornecerem doses de monensina até 10 vezes maior do que o recomendado (240 mg ou 4.865 mg/d), não encontraram resíduos no leite mesmo utilizando testes altamente sensíveis (0,005 µg/mL ou 1 g de monensina em 200.000 litros de leite). Entretanto, a produção de leite reduziu cerca de 30 % nos animais que receberam a dose mais alta de monensina (4.865 vs. 240 mg/d).

Dubuc et al. (2010) avaliaram dados de 3.577 vacas leiteiras em 47 diferentes rebanhos e observaram que a monensina (16 mg/kg/MS) aumentou a produção de leite em animais abaixo de 150 dias em lactação (34,7 vs. 35,6 kg/d) e não diferiu (24,5 vs. 24,6 kg/d) nos animais acima de 150 dias em lactação. A monensina reduziu o teor (3,91 vs. 3,73 %) e a produção de gordura no leite (1,29 vs. 1,26 kg/d), tendeu a reduzir o teor de proteína (3,14 vs. 3,11 %), mas sem diferença na produção de proteína no leite. A forma como a monensina foi administrada teve impacto na magnitude da redução do teor de gordura no leite, pois quando administrada fora da dieta total, a redução foi mais pronunciada (3,95 vs. 3,69 %), enquanto quando foi fornecida na TMR, a redução foi apenas numérica (3,89 vs. 3,77 %).

Arieli et al. (2008) aferiram o efeito da monensina sobre o desempenho produtivo em vacas leiteiras. Foram utilizadas 168 vacas Holandês distribuídas em dois tratamentos, controle ou monensina (335 mg/d) em cápsulas de liberação controlada, 30 dias antes da data prevista do parto, e outra cápsula com 95 dias em lactação. A dieta pós-parto continha 25,8 % silagem de trigo, 6,9 % feno de trigo e 67,3 % de concentrado (% MS). A monensina aumentou a produção de leite (37,6 vs. 35,2 kg/d, $P < 0,01$) comparada ao controle, mas não houve diferenças nos teores de proteína, gordura e lactose. Contudo, animais que receberam

monensina tiveram maior produção desses componentes ($P = 0,01$) atribuída a maior produção de leite.

Gallardo et al. (2005) avaliaram o efeito da monensina em vacas leiteiras recebendo dieta total e pastejando alfafa. Utilizaram 58 vacas Holandês bloqueadas 30 dias antes da data prevista do parto e distribuídas em dois tratamentos, controle ou monensina. Os animais do tratamento monensina receberam 30 dias antes do parto, uma cápsula de liberação controlada com dose de 335 mg/d e outra cápsula 60 dias pós-parto. No período pré-parto e uma semana pós-parto os animais receberam dieta completa e após esse período os animais foram gradualmente liberados para o pastejo de alfafa. O desempenho das vacas foi avaliado até os 150 dias em lactação. Apesar de não ter efeito sobre o CMS, monensina aumentou a produção de leite (27,7 vs. 26,6 kg/d), assim como a produção de proteína no leite (0,890 vs. 0,860 kg/d), mas reduziu o teor de gordura (3,60 vs. 3,51 %). O aumento na produção de leite pode ter sido consequência do melhor *status* energético das vacas, levando a menor mobilização corporal e menor risco de cetose. A monensina reduziu a perda de ECC (2,92 vs. 2,82, $P < 0,01$) e a concentração de AGNE no plasma (470 vs. 540 $\mu\text{Eq/L}$, $P = 0,05$). Vallimont et al. (2001) em um estudo com vacas confinadas de alta produção (45,6 kg/d), observaram que a monensina reduziu a concentração de AGNE no plasma na primeira semana pós-parto (345 vs. 530 $\mu\text{Eq/L}$, $P = 0,02$) comparado ao controle. Duffield, Rabiee e Lean (2008a) reportaram em uma meta-análise com dados de 1.496 vacas em lactação para AGNE e 4.272 vacas lactação para BHBA, que a monensina também reduziu as concentrações de AGNE e BHBA no sangue em 7,1 e 13,4 % ($P < 0,01$) respectivamente, comparado ao controle.

No início da lactação a ingestão de matéria seca é menor do que a quantidade necessária para atender as demandas de nutrientes para a produção de leite, o que pode resultar em um balanço negativo de nutrientes (HERDT, 2000). Para suprir o déficit de energia, os AG de cadeia longa são mobilizados à partir do tecido adiposo, transportados no plasma como AGNE, absorvidos e oxidados pelo fígado (DRACKLEY; OVERTON; DOUGLAS, 2001). No entanto, quando a mobilização lipídica é excessiva, pode ocorrer uma falha nesses mecanismos adaptativos e, em consequência há aumento dos AGNE circulantes e BHBA (HERDT, 2000).

O aumento de glicose na circulação pode promover a secreção de insulina e diminuir a mobilização lipídica, reduzindo a captação de AGNE pelo fígado (DUFFIELD et al., 1998b). A redução do fluxo de AGNE para o fígado juntamente com a atividade deprimida da enzima carnitina palmitoiltransferase I pela maior disponibilidade de propionato e insulina circulante (DRACKLEY, 1999), podem reduzir a entrada de AG nas mitocôndrias hepáticas e

consequentemente diminuir a oxidação de AG e aumentar a cetogênese (DUFFIELD et al., 1998b). O aumento da circulação de AGNE e BHBA durante o início da lactação está associado à redução no CMS, produção de leite e resposta imune (DRACKLEY, 1999). Com base no potencial dos ionóforos aumentar os precursores gliconeogênicos, vários pesquisadores postularam que esses compostos podem aumentar a síntese hepática de glicose melhorando o balanço energético de vacas no início da lactação. Segundo Ipharraguerre e Clark (2003) dentre os 15 estudos analisados, em 13 deles a concentração de glicose no sangue foi maior com a suplementação de ionóforos, embora o aumento desse metabólito tenha sido relativamente pequeno 5,9 %.

Rico, Holloway e Harvatine (2014) avaliaram o efeito da monensina e AGI sobre a redução da gordura no leite. Utilizaram 16 vacas Holandês com (183 ± 21 dias em lactação), delineamento de reversão simples em três períodos. O primeiro, nos 21 dias de adaptação, todas as vacas receberam 280 mg/d de monensina. No segundo período, do 22º ao 32º dia todas as vacas receberam 450 mg/d de monensina e no terceiro período, do 33º ao 43º dia 50 % das vacas receberam 450 mg/d de monensina e os outros 50 % das vacas foi retirada a monensina (controle). No primeiro período, as vacas foram alimentadas com dieta considerada depressora da gordura do leite, baixo FDN (25,3 %, MS), alto extrato etéreo EE (6,9 %) e AGI (3,24 % C18:2). No segundo período, a composição da dieta também mudou, sendo alta em FDN (31,2 %, MS), menores quantidades de EE (4,3 %) e AGI (1,7 % C18:2). Não houve diferença no CMS (27,2 kg/d), nas produções de leite (40,1 kg/d), proteína e lactose. Ambos os tratamentos aumentaram gradativamente o teor e a produção de gordura durante a fase de recuperação (terceiro período). Porém, vacas que receberam monensina durante a fase de recuperação tiveram menores teores (3,15 vs. 3,01 %) e produção de gordura no leite (1,26 vs. 1,17 kg/d).

Alzahal et al. (2008) observaram os efeitos da monensina associados aos AGI, sendo seis tratamentos: 0 ou 22 mg/kg/MS de monensina e 0; 1,7 e 3,4 % MS de óleo de soja. A monensina não teve efeito no CMS, na produção de leite, no teor e produção de proteína no leite. Entretanto, reduziu a produção (1,00 vs. 0,833 kg/d) e o teor de gordura no leite (3,50 vs. 3,13 %), e a produção de leite corrigido para 4 % de gordura (26,5 vs. 24,6 kg/d) comparado ao controle. As dietas com óleo e sem monensina reduziram o teor de gordura no leite em 4,5 e 14,2 %, mas quando monensina foi associada ao óleo, as reduções no teor de gordura foram mais pronunciadas. Na dieta com 1,7 % de óleo, a redução foi de 16,5 %, e na dieta com 3,4 % de óleo, a redução foi de 35,1 %. A monensina também reduziu AGCIR iso C15:0 no leite (0,23 vs. 0,20 % total AG, $P < 0,05$), marcador de bactérias celulolíticas no rúmen, tais como

Butyrivibrio fibrisolvens, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* que são responsáveis pelo processo de isomerização durante a bio-hidrogenação e não houve diferença para o AGCIR anteiso C17:0.

Durante a redução da gordura no leite induzida pela dieta, a redução na síntese de *novo* é maior do que a redução na secreção de AG pré-formados (HARVATINE; BOISCLAIR; BAUMAN, 2009). Estudos sobre o tempo de recuperação da gordura no leite induzida pela dieta mostraram aumentos progressivos na síntese de gordura no leite, principalmente, relacionados à recuperação da síntese de *novo*, mas também uma menor recuperação de gorduras pré-formadas (RICO; HARVATINE, 2013). Espera-se que a suplementação com monensina resulte num padrão de fermentação mais gliconeogênico (McGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001), o que pode aumentar a secreção de insulina e a absorção adiposa de AG pré-formados e reduzir a mobilização de AG à partir do tecido adiposo (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008a). Isso pode diminuir a disponibilidade de AG circulante para a glândula mamária (GRINARI et al., 1997; MACKLE et al., 1999). Em uma meta-análise Maxin, Rulquin e Glasser (2011) verificaram uma associação negativa entre a produção de gordura de leite, propionato e infusões de glicose, em vacas leiteiras no pós-parto causadas principalmente, por reduções na gordura do leite pré-formada.

2.5.8 Eficiência alimentar

O custo com alimentação representa grande parte dos custos na produção de ruminantes. Dessa forma, estratégias que aumentam eficiência alimentar são de suma importância para maximizar os lucros (BRITT et al., 2003). A melhoria no metabolismo energético em animais suplementados com monensina, é atribuída ao aumento da proporção de propionato e à redução da produção de CH₄. O aumento da eficiência observado está relacionado com o aumento da eficiência de conversão da energia digestível em energia metabolizável (MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001).

Ipharraguerre e Clark (2003) concluíram em uma meta-análise que vacas leiteiras suplementadas com ionóforos tiveram maior eficiência alimentar (leite/CMS). Entretanto, vacas suplementadas com doses de até 350 mg ionóforo/d e em dietas com alta forragem (> 60 % MS) tiveram melhores respostas (11,4 % vs. 3,6 %) do que em dietas com baixa forragem (< 60 % MS). Phipps et al. (2000) observaram que a monensina aumentou a eficiência alimentar (leite/CMS) (1,24; 1,44; 1,45 e 1,42) para as doses 0, 150, 300 ou 450 mg/d de monensina, respectivamente. Duffield, Rabiee e Lean (2008b) avaliaram em uma meta-análise

com dados de 9.677 vacas em lactação e demonstraram que a monensina aumentou a eficiência alimentar (leite/CMS) em 2,5 % ($P < 0,01$).

Goodrich et al. (1984) relataram em uma meta-análise dados de 228 experimentos e, aproximadamente 16.000 bovinos de corte em fases de crescimento e terminação, que a monensina (31,8 mg/kg/MS) aumentou a eficiência alimentar em 7,5 % ($P < 0,01$), houve redução no CMS em 6,4 % ($P < 0,01$) e aumentou o ganho de peso (0,241 kg/d, $P < 0,01$). Van Amburgh (1997) relatou em uma revisão dados de 137 experimentos com bovinos recebendo 30 mg/kg/MS de monensina, aumento de ganho de peso diário em 0,6 %, redução de CMS em 5,6 % e melhora da eficiência alimentar em 6,4 %. Duffield, Merrill e Bagg (2012) em uma meta-análise com dados de 64 experimentos, observaram que bovinos de corte em fases de crescimento e terminação, recebendo 28 mg/kg/MS de monensina, aumentaram o ganho de peso diário cerca de 0,029 kg/d ($P < 0,01$). A eficiência alimentar foi afetada positivamente com monensina, visto que animais suplementados necessitaram de 0,530 kg/MS a menos para o ganho de um kg de peso comparados ao controle ($P < 0,01$). Na análise detalhada, notaram que a dose e a forma com que monensina foi fornecida, dieta total ou *top dress* afetaram a resposta. Nos estudos em que as dietas foram à base de silagem de milho, os animais necessitaram de 0,608 kg/MS a menos para o ganho de um kg de peso, comparados ao controle ($P < 0,01$).

De acordo com DiLorenzo e Galyean (2010) dietas com alta densidade energética podem reduzir o limiar de resposta à suplementação com monensina. A redução da resposta à monensina tem sido atribuída a uma redução das mudanças nos produtos finais da fermentação ruminal, decorrente do aumento da proporção de grãos, maior extensão de processamento dos grãos e adição de gordura dietética. Cada uma dessas práticas alimentares fisiologicamente já reduz a proporção molar de acetato em relação ao propionato, e reduz também a produção de metano, dessa maneira reduz o potencial dos efeitos da adição de monensina. Na meta-análise Duffield, Merrill e Bagg (2012) observaram redução de 0,008 kg de CMS/kg de ganho de peso a cada 1 mg/kg/MS de monensina adicional. Isso se traduz em melhorias estimadas da eficiência alimentar de -0,55, -0,64 e -0,73 kg CMS/kg de ganho de peso para doses a 22, 33 e 44 mg/kg/MS.

2.5.9 Suplementação de vacas leiteiras em lactação com monensina em dietas diferindo na capacidade acidogênica ruminal

McCarthy et al. (2015a) avaliaram os efeitos da monensina em dietas diferindo no teor de amido sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras no periparto. Utilizaram 70 vacas Holandês em delineamento contínuo, inteiramente casualizado e em arranjo fatorial 2×2 . Foi realizada a aleatorização para ajustar a data prevista do parto de primíparas e múltiparas. A composição da dieta no pré-parto foi 13,0 % PB, 42,9 % FDN, 17,4 % amido (MS %), mas um grupo recebeu monensina *top dress* (400 mg/d) ou controle e todas as vacas receberam a monensina no mínimo 25 dias antes do parto. Do 1º ao 21º dia pós-parto as vacas foram distribuídas em quatro dietas com baixo (BA) (MS %) 15,4 % PB, 36,9 % FDN, 21,5 % amido e alto teores de amido (AA) 15,5 % PB, 34,3 % FDN, 26,2 % amido, com monensina *top dress* (450 mg/d) ou controle. A partir do 22º até o dia 63º dia todas as vacas receberam apenas a dieta AA, nos seus respectivos tratamentos. A monensina não teve efeito no CMS, no peso e no ECC no pré-parto. Não houve interações do teor de amido e monensina no pós-parto. A monensina tendeu aumentar as produções de leite (1,2 kg/d, $P = 0,06$) e lactose (20 g/d, $P = 0,07$) nas três primeiras semanas comparada ao controle. A monensina aumentou a produção de leite (37,3 vs. 35,1 kg/d, $P = 0,05$), na avaliação da semana (1 a 9) pós-parto, comparado ao controle, e tendeu reduzir o teor de gordura no leite (4,90 vs. 4,48 %, $P = 0,10$), durante as três semanas pós-parto, mas não teve efeito na produção de gordura e proteína no leite. Durante as semanas 1 a 9, a monensina reduziu o teor de lactose no leite (4,93 vs. 4,82 %, $P = 0,03$), e aumentou o NUL nas três semanas pós-parto (11,9 vs. 10,5 mg/dL, $P < 0,01$) e nas semanas 1 a 9 (12,2 vs. 11,0 mg/dL, $P = 0,02$). A monensina aumentou o CMS (16,1 vs. 14,3 kg/d, $P < 0,01$) nas três semanas pós-parto e nas semanas 1 a 9 (20,0 vs. 18,9 kg/d, $P = 0,02$). Não houve efeito da monensina na eficiência alimentar (leite/CMS), contudo reduziu a eficiência do leite corrigido para energia (LCE/CMS) (2,26 vs. 2,45, $P = 0,05$). Não houve efeito do teor de amido nas DMS ou Damido no trato digestivo total. A dieta BA aumentou a DFDN no trato digestivo total (47,8 vs. 37,0 %, $P < 0,01$) comparado à dieta AA. A monensina não teve efeito nas DMS, DFDN e DAmido no trato digestivo total.

McCarthy et al. (2015b) avaliaram os efeitos da monensina em dietas diferindo no teor de amido sobre o metabolismo das vacas no periparto. A monensina não teve efeito nas concentrações de glicose, de AGNE, de BHBA, de insulina e da sensibilidade à insulina no pré-parto. A dieta BA aumentou as concentrações de BHBA (12,2 vs. 10,5 mg/dL, $P = 0,03$) comparada à dieta AA nas três semanas pós-parto. A dieta AA aumentou a resistência à insulina ($P < 0,01$) e aumentou haptoglobina no plasma ($P = 0,04$). A monensina não teve efeito na concentração de AGNE no plasma nas três semanas pós-parto, mas aumentou a concentração de glicose no plasma, nas três semanas pós-parto (58,1 vs. 53,3 mg/dL, $P <$

0,01) e durante as semanas 1 a 9 (59,9 vs. 56,4 mg/dL, $P < 0,01$). A monensina reduziu a concentração de BHBA, nas três semanas pós-parto (10,0 vs. 12,6 mg/dL, $P < 0,01$) e houve tendência durante as semanas 1 a 9 (8,8 vs. 10,0 mg/dL, $P = 0,06$). Houve interação monensina e paridade ($P = 0,05$) para concentração de triglicerídeos no fígado. A monensina aumentou a concentração de triglicerídeos no fígado em vacas primíparas e nas multíparas, e reduziu a concentração de triglicerídeos no fígado. A monensina na dieta BA aumentou a concentração de glicogênio no fígado em vacas multíparas, comparada à dieta BA-controle. Não teve efeito do teor de amido ou da monensina sobre a capacidade do fígado em oxidar propionato. Os autores observaram no estudo *in vitro* do metabolismo do fígado que a monensina aumentou a relação glicose:CO₂ ($P = 0,05$), indicando que as vacas tiveram maior capacidade em converter propionato em glicose.

Akins et al. (2014) avaliaram o efeito da monensina em dietas diferindo no teor de amido sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras no meio da lactação. Utilizaram 128 vacas Holandês e Holandês x Jersey com (90 ± 33 dias em lactação), blocadas por produção de leite, raça e paridade e distribuídas em 16 baias com oito vacas/baia. As baias foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos, em arranjo fatorial 2×2 e dois teores de amido, baixo (BA) (MS %, 20,4 % amido) e alto amido (AA) (26,9 % amido). A dieta na covariável foi AA com 18 g de monensina/tonelada/MS. Durante as 12 semanas experimentais, as vacas receberam as dietas AA-monensina (18 g tonelada/MS), AA sem monensina (AA-controle), BA-monensina (18 g /tonelada/MS) e BA sem monensina (BA-controle). Não teve diferença no CMS (27,0 kg/d, $P > 0,10$). A monensina vs. controle e a dieta AA vs. BA aumentaram a produção de leite (1,3 e 1,5 kg/d, $P = 0,01$), respectivamente, mas não houve interação monensina e amido. A dieta AA aumentou as produções de lactose ($P = 0,02$), de proteína ($P < 0,01$), o teor de proteína no leite ($P = 0,01$), o NUL reduziu ($P < 0,01$), comparado à dieta BA. A monensina aumentou a eficiência da produção de leite corrigido para sólidos/CMS (1,49 vs. 1,43, $P = 0,05$), a produção de lactose no leite (2,03 vs. 2,09 kg/d, $P = 0,02$) e houve tendência em aumentar o NUL (12,6 vs. 12,2 mg/dL, $P = 0,06$), comparado ao controle. Os teores de gordura, de lactose e as produções de gordura e proteína não foram afetados pela monensina. Houve tendência na interação monensina e amido para a eficiência alimentar (leite/CMS, $P = 0,08$), a monensina tendeu ser mais eficiente na dieta AA comparada à dieta BA. O teor de amido e a monensina tiveram efeitos mínimos sobre a composição e a produção de AG no leite.

Recktenwald et al. (2014) avaliaram os efeitos da monensina sobre a reciclagem de N-ureia, em dietas diferindo nos teores de proteína bruta e amido. Utilizaram 12 vacas Holandês

com (107 ± 21 dias em lactação) canuladas no rúmen, em delineamento de reversão simples com períodos de 28 dias, sendo 21 dias de adaptação e 7 dias de coleta. As dietas continham 40 % silagem de milho, 20 % feno de alfafa e 40 % de concentrado (% MS) formuladas para ter baixa BP (15,3 % PB) ou alta proteína AP (16,7 % PB), baixo BA (23,0 % amido) ou alto amido AA (29,0 % amido), controle ou monensina (400 mg/d). Os animais foram distribuídos nas dietas com alta proteína AP-AA-monensina, AP-AA-controle, AP-BA-monensina e AP-BA-controle, e as dietas com baixa proteína BP-AA-monensina, BP-AA-controle, BP-BA-monensina e BP-BA-controle. Para evitar efeito residual uma vez que as vacas foram atribuídas aos tratamentos monensina, elas permaneceram até o final do experimento. As vacas também foram mantidas nas dietas AP ou BP para evitar possíveis ajustes em longo prazo no *status* de N ruminal e no corpo. Portanto cada vaca participou de dois tratamentos e foi trocada apenas entre os dois teores de amido. As dietas AP foram formuladas para serem adequadas na proteína metabolizável (PM) e proteína degradável no rúmen (PDR), e as dietas de BP foram formuladas para serem ligeiramente deficientes na PDR, mas para terem PM adequada. Os teores de amido foram aumentados nas dietas AA com a adição de milho floculado, proporcionando mais amido digestível no rúmen. Portanto, os autores hipotetizaram que aumentariam os requisitos ruminais de N para o crescimento microbiano e a reciclagem de N-ureia. O CMS foi maior para as vacas nas dietas AP (25,7 vs. 22,9 kg/d, $P < 0,01$) e a monensina tendeu aumentar o CMS (24,9 vs. 24,1 kg/d, $P = 0,06$). A produção de leite foi maior nas dietas AP e AA (7,7 e 3,4 %, $P < 0,05$) comparadas à BP e BA, respectivamente. A monensina aumentou a produção de leite na dieta AP e BP (1,5 e 1,8 kg/d, $P < 0,01$), respectivamente, comparada ao controle. Não houve diferença no teor e na produção de gordura no leite. Nas dietas AA houve aumento do teor ($P < 0,01$) e da produção de proteína no leite ($P = 0,03$). A monensina aumentou a produção de lactose no leite nas dietas AP (2,13 vs. 2,01 kg/d, $P = 0,05$) e nas dietas BP (1,93 vs. 1,71 kg/d, $P = 0,05$). O NUL, NUP e concentrações ruminais de NH_3 foram significativamente aumentados nas dietas AP ($P < 0,01$). As dietas AP aumentaram a excreção de N (82 g/N/d) nas fezes e urina. A monensina reduziu NH_3 ruminal nas dietas AP (9,21 vs. 12,65 mg/dL, $P = 0,03$) e nas dietas BP (5,34 vs. 6,34 mg/dL, $P = 0,03$), mas não reduziu a produção de ureia ou reciclagem N-ureia e as taxas de entrada no trato gastrointestinal. Neste estudo a monensina deslocou o N à partir do NH_3 ruminal para o plasma, mas sem aumento concomitante no N que retornava ao ciclo da ornitina. Portanto estes dados sugerem alterações da ureia no animal, mas uma explicação do efeito da monensina nos transportadores de ureia ou função renal, ainda não foi elucidada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBE, K.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate-formate lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 152, n. 1, p. 168-175, Aug. 1982.
- AGCA, C. et al. Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation. **Physiological Genomics**, v. 11, n. 1, p. 53-63. Jun. 2002.
- AGTARAP, A. et al. The structure of monensin acid, a new biologically active compound. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 2, p. 5737-5739, Feb. 1967.
- AGUILAR, A. A. Milk production efficiency in dairy cows fed monensin. **Proceeding South West Nutrition Conference**, n. 1, p. 192-196, Sep. 2005.
- AIELLO, R. J.; ARMENTANO, L. E. Gluconeogenesis in goat hepatocytes is affected by calcium, ammonia and other key metabolites but not primarily through cytosolic redox state. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 1, p. 193-201, Feb. 1987.
- AKINS, M. S. et al. Effect of monensin in lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 917-929, Feb. 2014.
- ALLEM, S. E.; HOLM, J. L. Lactate: physiology and clinical utility. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 2, p. 123-132, Oct. 2008.
- ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3317-3334, Jul. 2009.
- ALPER, S.; DUNCAN, L.; LOSICK, R. An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *Bacillus subtilis*, **Cell**, v. 77, n. 2, p. 195-205, Apr. 1994.
- ALZAHAL, O. et al. Effects of monensin and dietary soybean oil on milk fat percentage and milk fatty acid profile in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1166-1174, Feb. 2008.
- ANASSORI, E. et al. In vitro assessment of the digestibility of forage based sheep diet, supplemented with raw garlic, garlic oil and monensin. **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 1, p. 5-11, Apr. 2012.
- APPUHAMY, J. A. D. R. N. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5161-5173, Jul. 2013.
- APUA, A. Facts about antibiotics in animals and their impact on resistance. Alliance for the prudent use of antibiotics. **Ecology**, Oct 2002.
- ARIELI, A. et al. Monensin and growth hormone effects on glucose metabolism in the prepartum cow. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 2770-2776, Apr. 2001.

ARIELI, A. et al. Production and health of cows given monensin prepartum and a high-energy diet postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1845-1851, Jan. 2008.

ARMENTANO, L. E.; YOUNG, J. W. Production and metabolism of volatile fatty acids, glucose and CO₂ in steers and the effects of monensin on volatile fatty acid kinetics. **The Journal of Nutrition**, v. 113, n. 6, p. 1265-1277, Jun. 1983.

ARMSTRONG, D. G.; BLAXTER, K. L. The utilization of acetic, propionic and butyric acids by fattening sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 413-426. Apr. 1957b.

ASCHENBACH, J. R. et al. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 62, n. 1, p. 869-877. Mar. 2010.

ASCHENBACH, J. R. et al. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 4, p. 1092-1107, Oct. 2011.

BADAWY, S. A. et al. Monensin effects on rumen metabolic profile, methane production and protozoa population in buffalo heifers. **Egyptian Journal of Veterinary Science**, v.30, n. 5, p.49-56, Sep. 1996.

BAGG, R. et al. Milk residues and performance of lactating dairy cows administered high doses of monensin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 180-185, May. 2005.

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of ionophores in lactating dairy cattle. **Ontario Veterinary College**, p.13-21, 1997.

BAIRD, G. D. et al. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. **Biochemistry Journal**, v. 186, n. 2, p. 47-57. Aug. 1980.

BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.8, p. 1293-1298, Aug. 1999.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 203-227, Feb. 2003.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, n. 70, n.2, p. 15-29, Apr. 2001.

BAUMGARD, L. H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. Regulatory, integrative and comparative physiology. **American Journal of Physiology**, v. 278, n. 1, p. R179-R184, Feb. 2000.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1764-1769, Dec. 2001.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, n. 2, p. 21-27, Feb. 2008.

BEEDE, D. K. et al. Nitrogen utilization and digestibility by growing steers and goats of diets that contain monensin and low crude protein. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 857-863, Sep. 1986.

BEL, A.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 119-126, Apr. 2000.

BELL, J. A; GRIINARI, J. M.; KENNELLY, J. J. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 733-748, Sep. 2006.

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

BERGER, J. et al. The isolation of three new crystalline antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 5295-5298, May. 1951.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, Apr. 1990.

BERGMAN, E. N.; STARR, D. J.; RUELEIN, S. S. Glycerol metabolism and gluconeogenesis in normal and hypoglycemic sheep. **American Journal of Physiology**, v. 215, n. 5, p. 874-880, Jul. 1968.

BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 49, n. 1, p. 351-359, Feb. 1985.

BRADFORD, B. J.; ALLEN, M. S. Short communication: rate of propionate infusion within meals does not influence feeding behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2305-2308, May 2007b.

BRITT, J. S. et al. Efficiency of converting nutrient dry matter to milk in Holstein herds. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3796-3801, Jun. 2003.

BROCKMAN, R. P. Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. **The British Journal of Nutrition**, v. 64, n. 1, p. 95-101, Jan. 1990.

BROCKMAN, R. P. et al. Effects of glucagon and insulin on net hepatic metabolism of glucose precursors in sheep. **American Journal of Physiology**, v. 229, n. 6, p. 1344-1350, May. 1975.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Effect of insulin on gluconeogenesis and the metabolism of lactate in sheep. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 1055-1059, Aug. 1986.

BRODERICK, G. A. Effect of low-level monensin supplementation on the production of dairy cows fed alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 359-368, Apr. 2004.

BRYANT, M. P.; DOETSCH, R. N. A Study of actively cellulolytic rod-shaped bacteria of the bovine rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 37, n. 2, p. 1176-1183, Apr. 1954.

BURRIN, D. G.; BRITTON, R. A. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 1, p. 888-893, Mar. 1986.

BURRIN, D. G.; STOCK, R. A.; BRITTON, R. A. Monensin level during grain adaption and finishing performance in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 1, p. 513-521, Jul. 1988.

CABRITA, A. R. J. et al. Effects of dietary protein and starch on intake, milk production, and milk fatty acid profiles of dairy cows fed corn silage based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 1429-1439. Jun. 2007.

CALLAWAY, T. et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 43-51, Mar. 2003.

CALLAWAY, T. R.; ADAMS, K. A.; RUSSELL, J. B. The ability of "low G + C Gram-positive" ruminal bacteria to resist monensin and counteract potassium depletion. **Current Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 226-230, Jan. 1999.

CALLAWAY, T. R.; MARTIN, S. A. Effects of cellobiose and monensin on in vitro fermentation of organic acids by mixed ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1126-1135, Apr. 1997.

CALLAWAY, T. R.; RUSSELL, J. B. Selection of a highly monensin-resistant *Prevotella bryantii* subpopulation with altered outer membrane characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4753-4759, Apr. 1999.

CALLAWAY, T. R.; RUSSELL, J. B. Variations in the ability of ruminal gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. **Current Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 185-189, Jul. 2000.

CARLSSON, J.; GRIFFITH, C. J. Fermentation products and bacterial yields in glucose limited and nitrogen limited cultures of *Streptococcus*. **Archives of Oral Biology**, v. 19, n. 3, p. 1105-1109, Nov. 1974.

CHAPMAN, H. D.; JEFFERS, T. K.; WILLIAMS, R. B. Invited review: Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. **Journal of Poultry Science**, v. 89, n. 1, p.1788-1801, Oct. 2010.

CHAUCHEYRAS, F. et al. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an *Archaea methanogen* is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3466-3467, Jun. 1995.

CHEN, G.; RUSSELL, J. B. Sodium-dependent transport of branched chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2658-2663, Jan. 1989.

CHEN, G.; RUSSELL, J. B. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2186-2192, Jul. 1990.

CHEN, J.; WEIMER, P. J. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 21-30, Aug. 2001.

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

CHOUDHURY, P. K. Rumen Microbiology: An Overview. **Springer India**, p. 1-14, Mar. 2015.

CHOW, J. M.; RUSSELL, J. B. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1588-1593, Jun. 1990.

CHOW, J. M.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and monensin on glucose transport by *Fibrobacter succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1115-1120, Apr. 1992.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, Jul. 1992.

COLMAN, E. et al. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4759-4773, May. 2010.

COSTA, S. F. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 10-18, Feb. 2008b.

COUNOTTE, G. H. M. et al. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-lactate in the rumen of dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 649-655. Jan. 1981.

DAVIES, A. et al. Properties of a novel series of inhibitors of rumen methanogenesis; *in vitro* and *in vivo* experiments including growth trials on 2, 4-bis (trichloromethyl)-benzo [1,3] dioxin-6-carboxylic acid. **British Journal of Nutrition**, v.47, n. 1, p. 565-571, Aug. 1982.

DAWSON, K. A.; BOLING, J. Effects of potassium ion concentrations on the antimicrobial activities of ionophores against ruminal anaerobes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2363-2367, Oct. 1987.

DEBASIS, D.; SINGH, G. P. Effect of different level of monensin supplemented with cold process urea molasses mineral block on in vitro rumen fermentation at different days of adaptation with monensin. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 3, p. 320-325, Jul. 2005.

DEBASIS, D.; SINGH, G. P. Effect of ionophore enriched cold processed mineral block supplemented with urea molasses on rumen fermentation and microbial growth in crossbred cattle. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 6, p. 852-862, Mar. 2003.

DENNIS, S. M.; NAGARAJA, T. G.; BARTLEY, E. E. Effects of lasalocid or monensin on lactate producing or using rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 418-427, Mar. 1981.

DESTAILLATS, F. et al. Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3231-3239, Feb. 2005.

DESWYSEN, A. G. et al. Effects of time of day and monensin on the size distribution of particles in digestive tract sites of heifers fed corn silage. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 7, p. 1773-1783, Feb. 1989.

DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed Sorting. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3958-3967, Jun. 2008.

DILORENZO, N.; GALYEAN, M. L. Applying technology with newer feed ingredients in feedlot diets: Do the old paradigms apply? **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. E123-E132, Jul. 2010.

DINIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, v. 2, n. 5, p. 224-228, May. 1976.

DO PRADO, R. M. et al. Interaction of sunflower oil with monensin on milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 85-92, Jun. 2015.

DONOHU, A. et al. 1978. Metabolism of monensin in the steer and rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 1090-1095. Apr. 1978.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 2259-2273. Apr. 1999.

DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T.R.; DOUGLAS, G. N. Adaptation of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (E.Suppl.), p. E100-E112. Jun. 2001.

DRONG, C. et al. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 537-551. May. 2016a.

DUBUC, J. et al. A field study on the effects of dietary monensin on milk production and milk composition in dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 375-379, Apr. 2010.

DUFF, G.; GALYEAN, M.; BRANINE, M. Effects of adaptation to lasalocid, monensin or a daily rotation of lasalocid and monensin on in vitro fermentation of a 90 % concentrate diet. **Canadian Journal of Animal**, v. 1, n. 1, p. 129-135, Oct. 1994.

DUFFIELD, T. F. et al. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1171-1176, Aug. 2003.

DUFFIELD, T. F. et al. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on milk production and milk components in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 272-279, Mar. 1999a.

DUFFIELD, T. F. et al. Efficacy of monensin on the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 2866-2873, Feb. 1998b.

DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 2, p. 388-394. Aug. 2000.

DUFFIELD, T. F.; MERRILL, J. K.; BAGG, R. N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 4583-4592, Aug. 2012.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1334-1346, Jan. 2008a.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1347-1360, Jan. 2008b.

DUNLOP, R. H.; HAMMOND, P. B. D-Lactic acidosis of ruminants. **Annals New York Academy of Sciences**, 1965.

ELLIS, J. L. et al. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 2717-2726, Mar. 2012.

EMERY, R. S.; LIESMAN, J. M.; HERDT, T. H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 832-837, Mar. 1992.

ERICKSON, G. E. et al. Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 2869-2879, Jun. 2003.

FAIRFIELD, A. M. et al. Effects of prepartum administration of a monensin controlled release capsule on rumen pH, feed intake, and milk production of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 937-945, May. 2007.

FANNING, K. C., et al. Effect of rumensin level and bunk management strategy on finishing steers. **Nebraska Beef Report**, 1999.

FAULKNER, D. B. et al. Monensin effects on digestibility, ruminal protein escape and microbial protein synthesis on high-fiber diets. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 3, p. 654-660, Apr. 1985.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 921-928, Mar. 1997.

FIRKINS, J. L.; YU, Z.; MORRISON, M. Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 90, Suppl. 1, p. E1-E16, Mar. 2007.

FRANKLUND, C. V.; GLASS, T. L. Glucose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 1, p. 500-506, Nov. 1987.

FREITAS, R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, v. 82, n. 1, p. 124-127, May. 2007.

FUJIMOTO, K. et al. Biohydrogenation of linoleic acid by anaerobic bacteria isolated from rumen. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 1019-1026. Sep. 1993.

GALLARDO, M. R. et al. Monensin for lactating dairy cows grazing mixed-alfalfa pasture and supplemented with partial mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 644-652, Feb. 2005.

GALYEAN, M. L.; OWENS, F. N. Effects of monensin on growth, reproduction, and lactation in ruminants. In: **Atlas of Science: Animal and Plant Sciences**, ed. 1, ISI Press, Philadelphia, PA. p. 71-75. 1988.

GARDNER, R. G. et al. The cellular location of *Prevotella ruminicola* β -1,4-D-endoglucanase and its occurrence in other strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 3288-3292. Aug. 1995.

GEHMAN, A. M. et al. Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy cows fed brown midrib corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 288-300, Feb. 2008.

GERSON, T.; JOHN, A.; KING, A. S. D. The effects of dietary starch and fiber on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. **The Journal of Agricultural Science**, v. 105, n. 3, p. 27-30, Aug. 1985.

GOODRICH, R. D. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1484-1498, Feb. 1984.

GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 10, p. 2762-2768, Oct. 1992.

GREENFIELD, R. B.; CECAVA, M. J.; DONKIN, S. S. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 1228-1236. Sep. 2000.

GRIINARI, J. M. et al. Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 1076-1084. Feb. 1997.

GRIINARI, J. M. et al. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, Apr. 1998.

GUAN, H et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, Feb. 2006.

HAGEN, A.; MARTIN, R.; SHAVER, R. D. Effect of dietary monensin supplementation and amino acid balancing on lactation performance by dairy cows. **The Professional Animal Scientist**, v. 31, n. 3, p. 278-283, Apr. 2015.

HAIMOUND, D. A. et al. Avoparcin and monensin effects on digestive function in cows fed a high forage diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 2, p. 181-189, Sep. 1996.

HAIMOUND, D. A. et al. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 379-385, Aug. 1995.

HALLIWELL, G.; BRYANT, M. P. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. **Journal of General Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 441-448, Mar. 1963.

HANEY, M.; HOEHN, M. Monensin, a new biologically active compound I: Discovery and isolation. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.1, n. 2, p. 349-349, Aug. 1967.

HANSON, T. L.; KLOPFENSTEIN, T. L. Adaptation of lambs fed monensin. **Journal of Animal Science**. v. 45, (Suppl.1), p. 238, Jul. 1977.

HARMON, D. L. et al. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70 % concentrate diet ad libitum. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 560-569, May. 1985.

HARMON, D. L.; GROSS, K. L.; AVERY, T. B. Influence of ionophore addition to a high-concentrate diet on net nutrient flux in steers. **Nutrition Reports International**, v. 40, n. 2, p. 1127-1135, Jul. 1989.

HARVATINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v. 3, n. 1, p. 40-54, May. 2009.

HAYES, D. P.; PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1000-1008, Jan. 1996.

HE, M. et al. Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1447-1461, Feb. 2012.

HEGARTY, R. S. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p. 1299-1305, Jan. 1999.

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

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 215-230. Jul. 2000.

HINO, T.; KURODA, S. Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 255-259, Jul. 1993.

HOOKE, S. E. et al. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 374-380, Jan. 2009.

HOOPER, D. C. Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n.1, p. 530-538. Feb. 2002.

HORN, G. W. et al. Dietary buffers and ruminal and blood parameters of subclinical lactic acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 683-691, Apr. 1979.

HRISTOV, A. N.; JOUANY, J. P. Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. In: **Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment**. CAB International, Wallingford, UK; p. 117-166, Apr. 2005.

HUHTANEN, P.; H. KHALILI. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethyl cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. **British Journal of Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 245-255. Apr. 1992.

HUNGATE, R. E. Studies on cellulose fermentation. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. **Journal of Bacteriology**, v. 53, n. 5, p. 631-645, May. 1947.

HUNTINGTON, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: Influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**, v. 30, n. 1, p. 35-47. Apr. 1990.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 1573-1597, Jul. 2000.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 4, p. 1052-1073, Fev. 2003.

JENKINS, T. C. et al. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 6, p. 397-412. Jul. 2008.

JENKINS, T. C. HARVATINE, K. J. Lipid feeding and milk fat depression. **Veterinary Clinics of Food Animals**, v. 30, n. 1, p. 623-642, Feb. 2014.

JENKINS, T. C. et al. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397-412, Apr. 2008.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. Advances in ruminant lipid metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851- 3863, May. 1993.

JENKINS, T. C.; FELLNER, V.; MCGUFFEY, R. K. Monensin by fat interactions on trans fatty acids in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 324-330, Apr. 2003.

JENSEN, R. G. Invited Review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 295-350, Aug. 2002.

JOHNSON, D. E. et al. New perspectives on ruminant methane emissions. **In: Proceedings 12th Symposium on Energy Metabolism of Farm Animals**. ed. Boessinger, Publ. 58, EAAP, ETH Zurich, Switzerland, p. 376-379. Jun. 1991.

JOHNSON, D. E. et al. Persistence of methane suppression by propionate enhancers in cattle diets. **In: Proceedings 13th Symposium on Energy Metabolism of Farm Animals**. ed. J. F. Aguilera, EAAP Pub 76, CSIC, Spain. p. 339-342, Jul. 1994.

JOHNSON, K. A; JOHNSON, D. E. Methane Emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n.3, p. 2483-2492, Mar. 1995.

KANEDA, T. Iso and anteiso fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 288-302, Jun. 1991.

KARCHER, E. L. et al. Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 690-699, Apr. 2007.

KAUFFMAN, A. J.; ST-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 2284-2294, Feb. 2001.

KEUNEN, J. E. et al. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3304-3313, Apr. 2002.

KIRCHGESSNER, M.; WINDISCH, W.; MULLER, H. L. Nutritional factors for the quantification of methane production. **In: Proceedings of the 7th International Symposium on Ruminant Physiology**. ed. Verlag, Stuttgart, p. 287-298, Germany. May. 1995.

KOZLOSKI, G. B. Metabolismo dos carboidratos e produção dos ácidos graxos voláteis. **Bioquímica dos Ruminantes**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 3ª ed., editora UFSM, p. 66-79, 2011.

KRAUSE, D. O. et al. Board-Invited Review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 1, p. 331-341, Jan. 2013.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 815-821. Jul. 1996.

KRAUSE, K. M.; DHUYVETTER, D. V; OETZEL, G. R. Effect of a low-moisture buffer block on ruminal pH in lactating dairy cattle induced with subacute ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 352-364, Jan. 2009.

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

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4499-4503, Sep. 1996.

LEMENAGER, R. P. et al. Monensin effects on rumen turnover rate, twenty-four hour VFA pattern, nitrogen components and cellulose disappearance. **Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 255-261, May. 1978.

LEWIS, K. et al. Bacterial resistance to uncouplers. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 20, n. 2, p. 639-646, Sep. 1994.

LOCK, A. L. et al. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. **In: Intermountain Nutrition Conference**, Oxford. Proceedings Oxford: University of Oxford, p. 85-100, 2006.

LOCK, A. L. et al. Trans-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 1, p. 71-76, Jun. 2007.

LOWE, L. B. et al. Monensin controlled-release intraruminal capsule for control of bloat in pastured dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 2, p. 17-20, Jul. 1991.

LUNN, D. E. et al. Effect of monensin on meal frequency during sub-acute ruminal acidosis in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 3, n.1, p. 5-8, Feb. 2005.

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

MACKENZIE, D. D. S. Production and utilization of lactic acid by the ruminant. A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 11, p. 1772-1786, May. 1967.

MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 2971-2995, Apr. 1990.

MACKINTOSH, E. D. et al. Effect of monensin on rumen fermentation and digestion and milk production in lactating dairy cows. **Journal Animal Feed Science**, v. 11, n. 2, p. 399-410, May. 2002.

MACKLE, T. R., et al. Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 1512-1524. Jun. 1999.

MAROUNEK, M.; BARTOS, S. Interactions between rumen amyolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. **Journal of Applied Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 233-238, Mar. 1987.

MARTIN, S. A. Nutrient transport by ruminal bacteria: A Review. **Journal Animal of Science**, v. 72, n. 2, p. 3019-3031, Mar.1994.

MARTIN, S. A.; RUSSELL, J. B.1987. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 2388-2393, Jan. 1987.

MARTINEAU, R. et al. Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5714-5725, Aug. 2007.

MARTINEZ, C. M. et al. Effects of dietary forage level and monensin on lactation performance, digestibility and fecal excretion of nutrients, and efficiency of feed nitrogen utilization of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3211-3221, Sep. 2009.

MARTÍNEZ, S. et al. Effect of thyme essential oils thymus hyemalis and thymus zygis and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6598-6602, Aug. 2006.

MAXIN, G., RULQUIN, H.; GLASSER, F. Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 1299-1310, Apr. 2011.

McALLISTER, E. K. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, n. 1, p. 231-243, Sep. 1996.

McCARTHY, M. M. et al. Metabolism of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3351-3365, Mar. 2015b.

McCARTHY, M. M. et al. Performance of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3335-3350, Jan. 2015a.

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

MELO, L. Q. et al. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1775-1783, Jan. 2013.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal - SP: FUNEP, v. 2, pag 566-567. 2011.

MORRIS, F. E. et al. Effect of rotating monensin plus tylosin and lasalocid on performance, ruminal fermentation, and site and extent of digestion in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 10, p. 3069-3078, Mar. 1990.

MULLER, L. D.; BARGO, F.; IPHARRAGUERRE, I. R. Review: Monensin for grazing dairy cows. **The Professional Animal Scientist**, v. 22, n. 2, p. 115-119, Feb. 2006.

MULLINS, C R et al. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1323-1336, Jan. 2012.

MUNTIFERING, R. B.; THEURER, B.; NOON, T. H. Effects of monensin on site and extent of whole corn digestion and bacterial protein synthesis in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1565-1573, Mar. 1981.

MUTSVANGWA, T. et al. Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3454-3461, Jul. 2002.

NAGARAJA, T. G. et al. Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 649-658, Jun. 1982.

NAGARAJA, T. G. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd Ed. Edited by Hobson, P. N.; Stewart, C. S. Blackie Academic & Professional, London, p. 10-72, 1997.

NAGARAJA, T. G. et al. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 206-216, May. 1981.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy of Sciences, 2001. 381 p.

NEWBOLD, C. J.; WALKER, N. D. B. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore resistant bacteria in the rumen. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 75, n. 1, p. 129-134, May. 1993.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Effects of the ionophores monensin and tetronasin on simulated development of ruminal lactic acidosis *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2981-2985, Dec. 1988.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER, N. D. B. Potentiation by metal ions of the efficacy of the ionophores, monensin and tetronasin, towards four species of ruminal bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, n. 2, p. 161–167, Feb. 2013.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3598-3629, Mar. 1991.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 91-104, Aug. 2004.

O'KELLY, J. C.; SPIERS, W. G. Effect of monensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay either ad libitum or at the rate of 250 g/h. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.43, n. 1, p. 1789-1798, Aug. 1992.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Dose-response effects of intraruminal infusion of propionate on feeding behavior of lactating cows in early or midlactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2922-2931, Sept. 2003a.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effect of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cow at two dietary starch concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 174-183, Jan. 2003b.

ODONGO, N. E. et al. Long-term effects of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5126–33, Jul. 2007.

OELKER, E. R.; REVENEAU, C.; FIRKINS, J. L. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay- or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 270-285, Feb. 2009.

OETZEL, G. R. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. **In: Proceedings of the 33rd Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioner**, Rapid City, p. 46-53, Jul. 2000.

OETZEL, G. R.; NORDLUND, K. V.; GARRETT, E. F. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentrations in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. (Suppl.1), p. 38, Sep. 1999.

OLDICK, B. S.; FIRKINS, J. L. Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 9, p. 2412-2420, May. 2000.

ONETTI, S. G., et al. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 8, p. 2751-2759. Apr. 2001.

ORSKOV, E. R. et al. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 41, n. 3, p. 541-551, Jan. 1979a.

OSBORNE, J. K. et al. Effects of monensin on ruminal forage degradability and total tract diet digestibility in lactating dairy cows during grain-induced subacute ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1840-1847, Jan. 2004.

OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: A Review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, Feb. 1998.

OWENS, F. N. et al. Monensin and abomasal protein passage of steers. **Journal of Animal Science**. v. 47 (Suppl.1) p. 114 (Abstr.), Jul. 1978.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: Review. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 1020-1025, Apr. 1980.

PEREIRA, M. C. S. et al. Effects of different doses of sodium monensin on rumen papillae and tissue histology of feedlot Nellore cattle. **Animal Production Science**, v. 54, n. 10, p. 1830-1833, Aug. 2014.

PERFIELD, J. W. et al. Trans-10, trans-12 conjugated linoleic acid does not affect milk fat yield but reduces Δ 9-desaturase index in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 2559-2566, Mar. 2006.

PERFIELD, J. W. et al. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2211-2218, Apr. 2007.

PERRY, T. W. et al. Protein levels and monensin for growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 5, p. 1067-1076, Apr. 1983.

PHILLIPS, I. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 4, p. 101-107, May. 2007.

PHIPPS, R. H. et al. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2789-2794, Jul. 2000.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 885-909. Aug. 1992.

PIPEROVA, L. S. et al. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **Journal of Dairy Science**, v. 13, n. 10, p. 2568-2574, Oct. 2000.

PLAIZIER, J. C. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, Mar. 2009.

POMAR, C. et al. Roughage rations with or without monensin for veal production. II Ration digestibility. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 69, n. 2, p. 403-410, Feb. 1989.

POOS, M. I.; HANSON, T. L.; KLOPFENSTEIN, T. J. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1516-1524, Nov. 1979.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501-530, Jul. 1976.

PRESSMAN, B. C. Ionophores antibiotics as models for biological transport. **Fed Proc Journal**, v. 27, n. 3, p. 1283-1288, Mar. 1968.

PRINS, R. A. et al. Metabolism of lactate isomers by rumen mucosa. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 5, p. 556-561, Mar. 1974.

RAMANZIN, M. et al. Effect of monensin on milk production and efficiency of dairy cows fed two diets differing in forage to concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1136-1142, Sep. 1997.

RAUN, A. P. et al. Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle. **Journal Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 670-677, May. 1976.

RECKTENWALD, E. B. et al. Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with two different levels of dietary crude protein and starch with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1611-1622, Feb. 2014.

REVENEAU, C. et al. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 2046-2060, Jan. 2012a.

REVENEAU, C. et al. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. II. Fatty acid flow to the omasum and milk fatty acid profile. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 2061-2069, Jan. 2012b.

REYNOLDS, C. K. et al. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1201-1217, Jul. 2003.

REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. **Journal of Animal Science**, v. 86, n.14, p. E293-E305, Jun. 2008.

RICHARDSON, L. F. et al. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 657-664, Apr. 1976.

RICO, D. E.; HAVARTINE, K. J. Induction of and recovery from milk fat depression occurs progressively in dairy cows switched between diets that differ in fiber and oil concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 6621-6630, Sep. 2013.

RICO, D. E.; HOLLOWAY, A. W.; HAVARTINE, K. J. Effect of monensin on recovery from diet-induced milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2376-2386, Mar. 2014.

RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Enzymes to enhance utilization of feed in dairy cows. **Lethbridge: Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada**, 1998. 336 p.

RODRIGUEZ, S. L.; CRAIG, W. M.; HEMBRY, F. G. Changes in ruminal concentrations of microbial ammonia and amino acids due to monensin and time. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 3, p. 1990-1995, Jul. 1986.

ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 944-952. May. 1982.

ROGERS, M. et al. The effect of short-term and long-term monensin supplementation, and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 65, n. 96, p. 113-127, Feb. 1997.

ROGERS, M.; THIVENDL, P.; FONTENOT, P. Comparative effects of feeding and duodenal infusion of monensin on digestion in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 1125-1133, Dec. 1991.

RUIZ, R. et al. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1717-1727, Apr. 2001.

RUMPLER, W. V.; JOHNSON, D. E.; BATES, D. B. The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 1737-1741, Jan. 1986.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. ATPase-dependent energy spilling by the ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. **Archives of Microbiology**, v. 153, p. 378-383, Feb. 1990.

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

RUSSELL J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminant bacterial growth: Effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519-1525, Mar. 1987.

RUSSELL, J. B. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 3304-3307, May, 1990.

RUSSELL, J. B. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 572-576, Mar. 1985.

RUSSELL, J. B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. **TextBook**, p. 1-120, Mar. 2002.

RUSSELL, J. B.; BOTTJE, W. G.; COTTA, M. A. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 242-252, Jan. 1981a.

RUSSELL, J. B.; COTTA, M. A.; DOMBROWSKI, D. B. Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* vs. *Megasphaera elsdenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 1394-1399, Aug. 1981b.

RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604-610, Mar. 1980.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65-74, May. 2003.

RUSSELL, J. B.; RYCHLICK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 29, n. 2, p. 11-19, Mar. 2001.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 552-558, Feb. 1988.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.; CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 872-877, Jul. 1988.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy consuming reactions. **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed., p. 267-268. 1997.

RUSSELL, J. R.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712-1721, May. 1985.

RYCHLICK, J. L.; LAVERA, R.; RUSSELL, J. B. Amino acid deamination by ruminal *Megasphaera elsdenii* strains. **Current Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 340-345, Feb. 2002.

RYCHLIK, J. L.; RUSSELL, J. B. The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyrylvibriocin-like substance of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and monensin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 1, p. 89-94, Aug. 2002.

SAEBO, A. et al. Effect of abomasal infusion of geometric isomers of cis-10, trans-12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. **Lipids**, v. 40, n. 1, p. 823-832. Aug. 2005.

SAFAEI, Kh.; TAHMASBIB, A. M.; MOGHADDAMC, Gh. Effects of high concentrate:forage ratio diets containing monensin on the management of ruminal acidosis in Gezhel lambs. **Small Ruminant Research**, v. 121, p. 183-187, Oct. 2014

SAKATA, T. et al. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 325-331. Jun. 1980.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios Metabólicos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal - SP: FUNEP, v. 1, p. 461-471, 2006.

SAUER, F. D.; KRAMER, J. K.; CANTWELL, W. J. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 2, p. 436-442, May. 1989.

SCHÄREN, M. et al. 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, Mar. 2017.

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

SCHELLING, G. T. et al. The effect of various antimicrobials on amino acid degradation rates by rumen microbes. **Fed Proc Journal**, v. 37, n. 4, p. 411-420, Jun. 1977.

SMITH, C. K.; STROUT, R. G. The influence of the fatty acid composition of *Acholeplasma laidlawii* membranes on the growth inhibitory activity of narasin, a polyether ionophorous antibiotic. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 6, n. 2, p. 585-589. Aug. 1980b.

SMITH, D. R. et al. Effects of sulfur and monensin concentrations on in vitro dry matter disappearance, hydrogen sulfide production, and volatile fatty acid concentrations in batch culture ruminal fermentations. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 1503-1512, Sep. 2010.

STAIANO-COICO, L. et al. TGF-alpha and TGF-beta expression during sodium-N-butyrate-induced differentiation of human keratinocytes: evidence for subpopulations-specific up-regulation of TGF-beta mRNA in suprabasal cells. **Experimental Cell Research**, v. 191, n. 2, p. 286-291. Dec. 1990.

STEPHENSON, K. A. et al. Effects of monensin on the metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 830-837, Aug. 1997.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd Ed. Edited by Hobson, P. N.; Stewart, C. S. Blackie Academic & Professional, London, p. 10-72, 1997.

STOCK, R. A. et al. Effects of grain type, roughage level and monensin level on finishing cattle performance. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 10, p. 3441-3455, Mar. 1990.

SUDA, K. et al. Effect of long-term treatment on the performance and ruminal fermentation in Holstein steers. **Asian Australas Journal of Animal Science**, v. 2, n. 1, p. 514-515, Apr. 1989.

SURBER, L. M. M; BOWMAN, J. G. P. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1945-1954, Mar. 1998.

SYMANOWSKI, J. T. et al. Milk production and efficiency of cows fed monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 82, (Suppl. 1), p. 75-87, May. 1999.

TAKAHASHI, S.; ABBE, K.; YAMADA, T. Purification of pyruvate-formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 3, p. 1028-1034. May. 1982.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal Environmental Quality**, v. 32, n. 7, p.1591-1602. May. 2003.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and *in vivo* methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 628-634, May. 1981.

TOMKINS, N. W. et al. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, n. 5, p. 25-34, Feb. 2015.

VALLIMONT, J. E. et al. Effects of prepartum somatotropin and monensin on metabolism and production of periparturient Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2607-2621, Aug. 2001.

VAN AMBURGH, M. E. Effect of ionophores on growth and lactation in cattle. **In: 59th Proceeding Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, Ithaca, New York, Cornell University, p. 93-103, Jul. 1997.

VAN DER WALT, J. G. Volatile fatty acid metabolism in sheep. Diurnal variation in the contribution of ruminal propionic acid production to the whole-body glucose turnover of merino sheep fed lucerne hay twice daily. **Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 125-132, Sep. 1978.

VAN DER WERF, J. H.; JONKER, L. J.; OLDENBROEK, J. K. Effect of monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 427-433, Sep. 1998.

VAN GYLSWYK, N. O. Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 3, p. 243-254 Jun. 1990.

VAN MAANEN, R. W. et al. Effects of monensin on in vivo rumen propionate production and blood glucose kinetics in cattle. **The Journal of Nutrition**, v. 108, n. 6, p. 1002-1007, Mar. 1978.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D. I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 12, p. 2797-2806, Jul. 1995.

VERNON, C.; LeTOURNEAU, J. Lactic acidosis: recognition, kinetics and associated prognosis. **Critical Care Clinics**, v. 6, n. 2, p. 255-283, Nov. 2010.

VLAEMINCK, B. et al. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 3954-3964. May. 2006a.

VLAEMINCK, B., FIEVEZ, V., DEWHURST, R. J. Effect of choice of microbial marker and variation in solid to liquid associated bacteria proportion in duodenal contents on the estimation of duodenal bacterial nitrogen flow. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 360 (abstract), Jul. 2006b.

VLAEMINCK, B. et al. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A Review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 5, p. 389-417. 2006c.

VLAEMINCK, B. et al. Prediction of rumen volatile fatty acid proportions produced in vitro using variations in rumen odd and branched chain fatty acids. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 12, p. 401-411, Feb. 2004b.

WALLACE, R. J. et al. Fatty acid metabolism, sensitivity and mechanism of butyrate formation are linked in different *Butyrivibrio* isolates. **In: Proceeding Conference Gastrointestinal Function**, Chicago, IL. (Abstract), p. 20, 2005.

WALLACE, R. J.; CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). **The British Journal of Nutrition**, v. 46, n. 1, p. 131-148, 1981.

WALLACE, R. J.; ONODERA, R.; COTTA, M. A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. **In: The Rumen Microbial Ecosystem**, 2nd Ed. Edited by Hobson, P. N.; Stewart, C. S. Blackie Academic & Professional, London, p. 283-328, 1997.

WANG, Z. B. et al. Effects of hainanmycin or monensin supplementation on ruminal protein metabolism and populations of proteolytic bacteria in Holstein heifers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, n. 9, p. 99-103, May. 2015.

WEDEGAERTNER, T. C.; JOHNSON, D. E. Monensin effects on digestibility, methanogenesis and heat increment of a cracked corn-silage diet fed to steers. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 168-177, Apr. 1983.

WEIMER, P. J. et al. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 122-134. Feb. 1999.

WEIMER, P. J. et al. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during *in vitro* ruminal fermentations of mixed rations by monensin adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 2, p. 68-78, Jun. 2011.

WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1496-1502, Mar. 1996.

WELLS, J. E. et al. Cellodextrin efflux by the cellulolytic ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* and its potential role in the growth of nonadherent bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1757-1762. Jul. 1995.

WELLS, J. E.; RUSSELL, J. B. The endogenous metabolism of *Fibrobacter succinogenes* and its relationship to cellobiose transport, viability and cellulose digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 471-476, Jun. 1994.

WHETSTONE, H. D.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 803-809, May. 1981.

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

WOLIN, M. J. Fructose-1,6-diphosphate requirement of *Streptococcus* lactic dehydrogenase. **Science**, v. 146, n. 4, p. 775-777, Jul. 1964.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Microbe-microbe interactions. **In: The Rumen Microbial Ecosystem**, 1st Ed. Edited by Hobson, P. N.; Stewart, C. S. Elsevier Applied Science, London, p. 343-359. 1988.

In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd Ed. Edited by Hobson, P. N.; Stewart, C. S. Blackie Academic & Professional, London, p. 283-328, 1997.

WOOD, K. M. et al. The effect of monensin concentration on dry matter intake, ruminal fermentation, short-chain fatty acid absorption, total tract digestibility, and total gastrointestinal barrier function in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p. 2471-2478, Apr. 2016.

WOODFORD, N. Glycopeptide resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 849-862, Sep. 1998.

XU, L. et al. Effects of grain source and monensin level on growth performance, carcass traits and fatty acid profile in feedlot beef steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 198, n.7, p. 141-150, Mar. 2014.

XU, L. et al. Effects of increasing levels of corn dried distillers grains with solubles and monensin on intake, digestion, and ruminal fermentation in beef heifers fed high-barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 5, p. 5390-5398, Aug. 2013.

YABUUCHI, Y. et al. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 5, p. 300-307. Jun. 2006.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 12, p. 3470-3476, Apr. 1993a.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3250-3254, Nov. 1993b.

YANG, C. M. J.; VARGA, G. A. 1989. Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 950-957, Sep. 1989.

YANG, W. Z. et al. Impact of hard vs. soft wheat and monensin level on rumen acidosis in feedlot heifers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 11, p. 5088-5098, Feb. 2014.

ZINN, R. A. et al. Influence of ardacin supplementation on feedlot performance and digestive function of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 7, p. 1389-1396. May. 1991.

ZINN, R. A. Influence of lasalocid and monensin plus tylosin on comparative feeding value of steam-flaked versus dry-rolled corn in diets for feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 1, p. 256-266, May. 1987.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 9, p. 2209-2215, Apr. 1994.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO**ARTIGO RESPONSE OF LACTATING DAIRY COWS TO MONENSIN
SUPPLEMENTATION OF DIETS DIFFERING IN RUMINAL
ACIDOGENIC CAPACITY**

Artigo formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico Journal of Dairy Science

Interpretative Summary: Response of lactating dairy cows to monensin supplementation of diets differing in ruminal acidogenic capacity. Barbosa et al. The supplementation of dairy cows with monensin decreased dry matter intake and increased feed efficiency and plasma glucose concentration only when a high acidogenic diet was fed. Monensin reduced total tract neutral detergent fiber digestibility and plasma D-lactate concentration and had had minor effect on milk fatty acid composition.

Running Head: *Monensin and starch for dairy cows*

Response of lactating dairy cows to monensin supplementation of diets differing in ruminal acidogenic capacity

E. F. Barbosa,* J. D. L. Dias,* L. P. Castro,* L. C. Resende,* W. R. Silva,* B. F. Carvalho,* C. L. S. Ávila,* M. M. Ladeira,* R. A. N. Pereira,† M. N. Pereira,*¹

*Department of Animal Sciences, University of Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil

†Minas Gerais Agricultural Research Enterprise (Epamig), Lavras, MG 37200-000, Brazil

¹Corresponding author: phone - +55 35 3829 1689. Email - mpereira@dzo.ufla.br

ABSTRACT

Monensin (MON) supplementation of dairy cows can interact with diet composition. The response of lactating dairy cows to MON supplementation of diets differing in ruminal acidogenic capacity was evaluated. Twenty-eight Holstein cows were individually fed a standard diet for 3 weeks and MON (300 mg/d) or control (CTL) for 9 weeks, in a covariate adjusted randomized block design. A low acidogenic diet (LOW, 25.8% starch) was offered from d 1 to 35 and a high acidogenic diet (HIGH, 30.0% starch) from d 36 to 63. Diet HIGH was formulated by replacing whole cottonseeds and finely ground corn by an iso-nitrogenous mixture of soybean meal and rehydrated and ensiled ground corn. Data were collected daily or after adaptation to LOW and HIGH and were analyzed as repeated measures. The mean square for cow nested within treatment was the error term for the treatment effect. Digestible organic matter intake was increased by HIGH (14.7 vs. 14.3 kg/d) and decreased by MON (14.2 vs. 15.2 kg/d) and milk yield was similar (32.3 kg/d). The MON reduced dry matter intake (DMI) and increased the ratios of milk to DMI, energy corrected milk to DMI, energy corrected milk to digestible organic matter intake and plasma glucose concentration only when HIGH was fed. The MON reduced the acetate to propionate ratio in ruminal fluid in both diets (2.43 vs. 1.81). The HIGH reduced ruminal pH. Plasma D-lactate concentration was increased by HIGH and decreased by MON. The HIGH increased total protozoa concentration in ruminal fluid. The MON reduced total tract neutral detergent fiber digestibility more in LOW (52.1 vs. 41.3% of intake) than in HIGH (57.0 vs. 52.0% of intake). Daily urinary allantoin excretion did not respond to MON, neither plasma urea-N at 0, 1.5, and 3 h post feeding. The MON induced lower degree of refusal of long feed particles and of preferential intake of short particles in the afternoon than CTL. Meal duration and interval was reduced by MON only when HIGH was fed. The HIGH tended to reduce jugular blood pH, increased the concentrations and yields of short-chain fatty acid (FA), and reduced

the concentrations of long chain FA in milk. The MON did not affect the concentrations and yields of short, medium, and long chain FA, but reduced yields of odd and branched-chain FA (C15:0 iso plus C17:0 iso) in milk fat. The positive effect of MON on feed efficiency occurred only when diet acidogenic capacity was increased.

Key words: feed efficiency, ionophore, glucose in plasma, starch

INTRODUCTION

Monensin (**MON**) is a carboxylic polyether ionophore produced by *Streptomyces cinnamomensis* (Haney and Hoehn, 1967), capable of selectively affecting ion transport across cell membranes and therefore inducing the futile use of energy by microorganisms and subsequent cell death (Russell, 1987). Monensin has been extensively used to manipulate ruminal fermentation (Ellis et al., 2012) and thoroughly meta-analysis on MON efficacy for lactating dairy cows are available (Ipharraguerre and Clark, 2003; Duffield et al., 2008b). Monensin can increase ruminal propionate production at the expense of acetate (Van Maanen et al., 1978; Armentano and Young, 1983) having positive impact on liver gluconeogenesis (Karcher et al., 2007). The supplementation of MON to dairy cows can promote gain in feed efficiency driven by increased milk yield and reduced DMI (Duffield et al., 2008b), can help in controlling ruminal acidosis (Nagaraja et al., 1981) and ketosis (Duffield et al., 2008a; Mullins et al., 2012), and is desirable environmentally since it can reduce methane production (Appuhamy et al., 2013) and urinary N loss (Bergen and Bates, 1984). Monensin can also increase the ruminal bypass of dietary protein (Zinn et al., 1994; Surber and Bowman, 1998) by inhibition of protein deamination (Chen and Russell, 1990) and can improve the nutritive value of dairy products by increasing the concentration of CLA in milk fat (Fellner et al., 1997; Duffield et al., 2008b). The supplementation of MON can reduce the concentration of fat in milk, but fat yield does not necessarily follow the same trend (Muller et al., 2006; Duffield et al., 2008b).

The response of ruminants to MON supplementation seems to be diet dependent (Ipharraguerre and Clark, 2003; Duffield et al., 2008a,b). Akins et al. (2014) observed a trend for greater increase in the ratio of milk to DMI in response to MON when a diet with 26.9% starch was fed for 12 weeks compared to a 20.4% starch diet. When MON was fed to beef steers for 16 weeks (Guan et al., 2006) the reduction in methane production was similar in diets formulated with 86% or 31% forage, however, the duration of the methane suppression was longer in the high forage diet and DMI was reduced and feed efficiency was improved only in the low forage diet. Zinn et al. (1994) observed that MON increased the molar proportion of ruminal propionate when steers were fed a 10% forage diet, but propionate proportion was reduced by MON when forage was 20% of the diet. Monensin had a greater effect on reducing the acetate to propionate ratio in continuous fermenters when the diet contained barley instead of corn (Jenkins et al., 2003).

Therefore, the objective of this study was to evaluate lactation performance, feed efficiency, and digestibility responses of dairy cows to MON supplementation of diets differing in ruminal acidogenic capacity. Our hypothesis was that MON supplementation would be more favorable to lactation performance and feed efficiency when diet acidogenic capacity was increased.

MATERIALS AND METHODS

The protocol was approved by the University of Lavras Bioethics Committee in Utilization of Animals. The experiment was conducted from April 28th to June 29th, 2014 in an open walled sand bedded tie stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center, located in Ijaci, Brazil (<http://www.holandesflamma.com.br>). Environmental temperature and humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals with a digital thermometer (EasyLog-USB-2-LCD, Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) at 2.5 m from the floor. The Temperature-Humidity Index (THI) was

calculated according to Yousef (1985): $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$; where T = Temperature ($^{\circ}$ C) and DP = Dew point ($^{\circ}$ C).

Twenty-eight Holstein cows (157 ± 76 DIM at the beginning of the experiment, 12 primiparous) were individually fed the same TMR (diet LOW, further described) for a 3-wk standardization period. On d 18 to 21 of the standardization period, DMI, milk yield, milk solids, feed efficiency, MUN, BW, BCS, and plasma glucose concentration were measured and used as covariate in the statistical model. Cows were paired blocked primarily by parity (1 vs. ≥ 2) and secondarily by milk yield. Within a block, each cow received a treatment for 63 d, in a covariate-adjusted randomized block design with repeated measures over time. Treatments were: Control (CTL) or MON (Rumenpac, MCassab Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brazil). Capsules containing 150 mg of MON were orally dosed to each cow twice daily at 0500 h and 1200 h and cows on CTL received a placebo. Mean \pm standard deviation at blocking were: Milk yield 33.4 ± 4.9 and DIM 161 ± 92 on CTL and 33.3 ± 4.6 kg/d and 153 ± 96 d on MON.

A low acidogenic diet (LOW) was fed from d 1 to 35 and a high acidogenic diet (HIGH) from d 36 to 63. Diet HIGH was formulated by replacing whole cottonseeds and finely ground mature corn (75.9% starch in DM) in diet LOW by an iso-nitrogenous mixture of soybean meal and mature ground corn rehydrated and ensiled for 142 days (76.6% starch in DM). The composition of the offered TMR in ingredients and of the consumed TMR in nutrients is reported in Table 1. The effect of diet acidogenic capacity is inherently confounded to stage of lactation/experimental week and was statistically treated as a repeated measurement on the experimental units. The interaction between treatment and diet was of major interest.

The TMR was mixed in a 1.2 m³ vertical stationary mixer (Unimix 1200, Casale Equipamentos Ltda, São Carlos, Brazil), offered 2x/d starting at 0600 and 1300 h, and pushed

at least 10x/d. Individual cow intake was assessed throughout the experiment by recording the amount of feed offered and orts daily. The TMR was offered to allow for 10 to 13% refusals. The DM concentration of forages was determined weekly (Koster Moisture Tester Inc., Brunswick, OH) and diets were adjusted as necessary. Samples of ingredients were collected daily and composite feed samples were made per week. Likewise, ort samples were collected daily and composited per cow per week. Composite samples were dried in a forced-air oven at 55 °C for 72 h and ground through a 1-mm Wiley mill screen (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. The CP was determined by micro-Kjeldahl analysis according to method 990.03 and ether extract (EE) was analyzed according to method 920.39 of AOAC International (2012). Ash was analyzed by incineration at 550 °C for 8 h. The ash free NDF was determined by filtration in porous crucibles with heat stable amylase and sodium sulfide (Van Soest et al., 1991). Starch was analyzed enzymatically according to Hall (2009). The NFC fraction was calculated as $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{Ash} + \text{NDF})$.

Cows were milked 3x/d starting at 0500, 1300, and 2000 h in an adjacent herringbone parlor and milk yield was recorded daily. Milk samples equivalent to 0.5% of the production of each milking were obtained on d 18 to 21 of the standardization period and on d 4 and 7 of each week during the comparison period. The proportional daily milk composite samples were stored under refrigeration in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol preservative until analysis within at most 3 d for solids and MUN concentrations by infrared spectrophotometry (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) in a commercial laboratory (Centralized Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association, Curitiba, Brazil). Yields (kg/d) of fat, protein, lactose, and total solids were calculated per cow per week. Milk energy secretion (**Milk E**; Mcal/d) was calculated (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM

(kg/d) was calculated as: Milk E/0.70 (assumes 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose). The 4% FCM (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001): $0.4 \times \text{kg of milk} + 15 \times \text{kg of fat}$. The BCS (scale of 1 to 5, Wildman et al., 1982) was measured by the same 3 evaluators on d 0, 14, 28, 42, and 56 and the average was used to describe the experimental units. The BW after the morning milking was measured on d 0, 14, 28, 42, and 56.

The total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, non-NDF OM, and starch were determined on d 19 to 21 and 61 to 63 by total collection of feces in buckets. Feces were collected concurrently to defecation during three 8-h sampling periods and weighed. The second and third sampling periods began 8 h later than the previous sampling to avoid a major disturbance to the animals, while still representing a 24-h collection period. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen during the collection period and a composite sample was formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55 °C in a forced air oven. Concentrations of NDF, ash, and starch were determined as described previously. Digestible OM intake (**DOMI**) over time was calculated based on the total tract apparent digestibility coefficients determined on weeks 3 (d 19 to 21) and 9 (d 61 to 63). The DOMI during the standardization period was OM intake \times 0.716 (the OM digestibility of treatment CTL on week 3) and the calculation of weekly DOMI per treatments used the OM digestibility coefficients determined in week 3 for weeks 1 to 5 and in week 9 for weeks 6 to 9.

Total urinary output was collected in buckets simultaneously to fecal sampling to estimate the relative ruminal microbial synthesis based on purine derivate excretion (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it during the collection period. At the end of the 3-d collection period, composite urine samples

were diluted 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen at - 20 °C. Allantoin was analyzed as described by Chen and Gomes (1992).

Chewing activity and particle size sorting behavior were measured on d 18, 19, and 20 and on d 60, 61, and 62. Feed particles sorting was evaluated according to Leonardi and Armentano (2003). The proportion of particles above the 19 mm and 8 mm mesh diameter screens and below the 8 mm screen of the Penn State Particle Separator was evaluated at 0600 h and 1300 h for the offered TMR and at 1200, 1900, and 0600 h for refusals. Feed refusals at 1200 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake of particles on each screen was: % TMR retained on screen \times kg of TMR consumed. The observed intake of particles on each screen was: % TMR retained on screen \times kg of TMR offered - % orts retained on screen \times kg of orts. The selection index was: $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted intake})$. For the calculation of starch and NDF sorting behavior the predicted intake of a nutrient was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of DMI. The observed intake was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of offered TMR DM - % of nutrient in orts DM \times kg of orts DM. The selection index was: $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted intake})$. Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection.

Chewing activity was evaluated by visual observation of the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for three 24-h periods, the mean of daily values was used per cow. Buccal activities evaluated were: feed ingestion, water ingestion, rumination, and idleness. Ingestion, rumination, and chewing per unit of DMI were calculated using the intake of the day in which chewing activity was evaluated. A meal was empirically defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination. To generate the meal pattern data, the minimum 10-min inter-meal interval was adopted based on the reasoning of Mullins et al. (2012) for a 12-min interval. Meal duration

was the ratio between ingestion time (min/d) and meals/d. Rumination duration was the ratio between rumination time (min/d) and ruminations/d. The intervals between meal and rumination events were: $(1440 \text{ min} - \text{event in min/d})/(\text{events/d} - 1)$. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer. Five evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal. The proportions of daily TMR intake between 0700 and 1300 h, 1300 and 1900 h, and 1900 and 0700 h were measured.

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on d 18 and 60 to determine plasma urea-N (**PUN**) concentration. Samples for PUN were obtained immediately before the first daily feeding and at 1.5 ± 0.2 h and 3.0 ± 0.2 h after morning feeding. The blood, collected in vacutainer tubes containing EDTA, was immediately refrigerated, centrifuged at $2,118 \times g$ for 10 min, and the plasma was stored at -20 °C until analysis. The PUN (mg/dL) was analyzed with a laboratory kit (Urea 500. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Plasma glucose concentration was measured at d 21 of the standardization period and at 7-d intervals during the comparison period on blood samples obtained 12.0 ± 0.5 h after the morning feeding. Blood was collected in vacutainer tubes containing EDTA and potassium fluoride, which were immediately centrifuged at $2,118 \times g$ for 10 min. The plasma was stored at -20 °C and analyzed with a laboratory kit (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Plasma D-lactate concentration was measured in d 21 and 63 of the comparison period on blood samples obtained as described for glucose (D-lactate Colorimetric Assay Kit, MAK058, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

The jugular blood acid-base balance was evaluated on d 20 and 62 on samples obtained 14 ± 0.4 h after morning feeding and analyzed with an AGS 22 blood gas analyzer (Drake Eletrônica e Comércio Ltda, São José do Rio Preto, Brazil) less than 1 h after sampling. Blood

samples were collected at random within block within a 30-min period in heparinized tubes and kept under refrigeration from sampling to analysis.

On d 21 and 63, ruminal fluid samples were collected through a flexible oro-gastric tube. Samples were collected 12 ± 1.1 h after morning feeding at random within block. Fluid pH was measured immediately with a glass electrode (HI 2210, Hanna Instruments, Woodsocket, RI). A sample was immediately frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation and was stored at -20 °C until preparation for analysis of VFA by GLC (Waters E2695, Waters Corporation, Milford, MS) with detector at 210 nm (PAD 2998) and reverse phase column C18 ODS 80A (150 m x 4.6 mm x 5 μ m). The analysis conditions were mobile phase of 100% acidic aqueous solution (phosphoric acid) pH 2.35 - 2.55, oven temperature 30 ± 5 °C, sample injection volume of 10 μ L, flow of 1 mL/min, and running time of 20 min. A sample was also mixed to a 36% formaldehyde solution for protozoa counting by optical microscopy. The sample for total protozoa enumeration was stained and evaluated with an optical microscope in a Neubauer chamber according to the recommendations of Dehority (1984) and Warner (1962).

Daily composite milk samples were obtained on d 18 and 21 and d 60 and 63 for FA analysis. Samples were stored at -20 °C without preservative and lipids were extracted according to Hara and Radin (1978) and transmethylated according to Christie (1982) as modified by Chouinard et al. (1999). The concentration of fatty acids (FA) in milk fat was analyzed by GLC (Focus Gas Chromatography, Finnigan, Rodano, MI), with a flame ionization detector and a capillary column SLB-ILL-111 of 100 m length by 0.25 μ m internal diameter and 0.20 μ m film thickness. Hydrogen was used as the dragging gas at 2.0 mL/min flow rate. The oven temperature program was 70 °C held for 4 min, 150 °C (13 °C/min) held for 39 min, 215 °C (10 °C/min) held for 10 min, resulting in a total running time of 65 min. The vaporizer temperature was 250 °C and the detector temperature was 300 °C. The FA were

identified by comparing the retention times with butter FA standards. The daily secretion of FA was calculated assuming that milk fat had 93.3% FA (Glasser et al., 2007).

Statistical Analysis

Data obtained at the end of the standardization period and as repeated measures over time during the comparison period were analyzed with the PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary, NC) using the model: $Y_{ijk} = \mu + CV + B_i + T_j + TE_k + T*TE_{jk} + e_{ijk}$. Where: CV = continuous covariate effect (measurement of the same variable at the end of the standardization period), B_i = random block effect ($i = 1$ to 14), T_j = fixed treatment effect ($j = \text{CTL, MON}$), TE_k = fixed time effect ($j = \text{days or weeks}$), $T*TE_{jk}$ = interaction of treatment and time. For variables measured only during the comparison period the same model without the covariate adjustment was used. An alternative analysis of intake, lactation performance, and feed efficiency during weeks 4 and 5 (diet LOW) and weeks 8 and 9 (diet HIGH) was performed. The mean square for the effect of cow nested within treatment was the error term to test the treatment effect in all models. The best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Degrees of freedom were calculated using the Kenward-Roger option. Statistical significance and trends were considered at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.10$, respectively. When a $P \leq 0.10$ was detected for the interaction of treatment and diet/week, pairwise t-test compared least squares means.

RESULTS

The mean daily THI is reported in Figure 1. During the weeks of feeding diet LOW the mean THI was similar to the mean THI of the weeks in which diet HIGH was fed (64.9 vs. 64.6, respectively). The environment was not inductive of heat stress ($\text{THI} \geq 68$ for 29.6% of time).

The composition of the experimental diets are in Table 1 and model estimates (NRC, 2001) are in Table 2. Model parameters were the analyzed composition of feeds, the ingredient composition of the TMR, and the animal data for each treatment on weeks 4-5 (diet LOW) and 8-9 (diet HIGH). Dietary starch concentration was 25.8% of DM for LOW and 30.0% of DM for HIGH (Table 1). Diet LOW had a greater proportion of dietary starch from finely ground mature corn than HIGH and HIGH had a fraction of dietary starch coming from rehydrated and ensiled corn grain to increase ruminal starch fermentability. The partial removal of whole cottonseeds from diet LOW had minor effect on fresh TMR particle size. Based on model estimates (Table 2) all diets were slightly excessive in RDP balance (mean of + 50.2 g/d) and would supply sufficient NE_L for 32.7 to 37.3 kg/d of milk and MP for 34.1 to 37.7 kg/d. The goals of obtaining diets adequate in NE_L and MP supply relative to cow requirement, with at most 2 kg/d difference between NE_L allowable milk and MP allowable milk, and slightly positive in RDP balance were achieved.

Table 3 reports intake and lactation performance during the 9-wk comparison period. When evaluated during the entire experimental period, MON tended to reduce DMI ($P = 0.06$), reduced DOMI ($P = 0.05$), and had no effect on the yields of milk and solids corrected milk ($P \geq 0.32$). The % fat in milk was increased by MON ($P = 0.03$), but fat, protein, and lactose yields and the % of protein and lactose did not change ($P \geq 0.40$). The increase in milk fat % in response to MON supplementation approached a significant difference ($P \leq 0.04$ for slice option) during weeks 7, 8 and 9 (Figure 2). The covariate adjusted BW and BCS were similar ($P \geq 0.32$) for CTL and MON.

However, statistically significant ($P \leq 0.04$) interactions between treatment and experimental week were detected for DMI and the 3 measures of feed efficiency (Table 3). The interaction between treatment and week for DMI and for the milk to DMI ratio is shown in Figure 3. Cows fed MON had reduced DMI and increased ratio of milk to DMI after week

6, when diet HIGH was fed. When the response to MON in milk yield (Figure 4) and DMI (Figure 5) on weeks 4-5 (diet LOW) was compared to weeks 8-9 (diet HIGH), cows fed MON with HIGH had the lowest DMI and had higher milk yield than cows fed MON with LOW. The ratios of milk to DMI (Figure 6) and ECM to DOMI (Figure 7) were increased by MON only when cows were fed diet HIGH. The increase in plasma glucose concentration elicited by MON (Figure 8) showed similar pattern of response over time to the DMI and feed efficiency responses. The effect of MON on feed efficiency, DMI, and plasma glucose concentration lasted for the 9 weeks of the experiment and was amplified during the weeks in which diet HIGH was fed with more advanced days in lactation.

The total tract digestibility of nutrients is in Table 4. Monensin induced a greater reduction in total tract NDF digestibility when diet LOW was fed (- 10.8%-units) than when diet HIGH was fed (- 5%-units) ($P = 0.05$ for the interaction between treatment and diet). The digestibilities of the non-NDF OM and starch were not affected by treatment ($P \geq 0.49$) and there was no evidence for a treatment by diet interaction ($P \geq 0.29$). The DOMI during the period of fecal sampling was reduced by MON ($P = 0.01$) and the ECM/DOMI efficiency was increased by MON only when diet HIGH was fed ($P = 0.02$ for the interaction between treatment and diet), similarly to the data obtained over the 9-wk period (Table 3).

Ruminal fermentation profile and ruminal microbial yield are reported in Table 5. Monensin reduced the molar proportion of VFA as acetate ($P = 0.01$), increased propionate ($P < 0.01$), and reduced the acetate to propionate ratio ($P < 0.01$) in both diets ($P \geq 0.29$ for the interaction between treatment and diet). Butyrate was reduced by MON only when diet LOW was fed ($P = 0.10$ for the interaction between treatment and diet), similarly to total protozoa concentration ($P = 0.09$ for the interaction between treatment and diet). Plasma D-lactate concentration was reduced by MON in both diets ($P < 0.01$ for treatment and $P = 0.40$ for the interaction between treatment and diet). Ruminal pH obtained by stomach tube was high and

was numerically reduced by MON, but the difference did not approach statistical significance ($P = 0.18$ for treatment). Ruminal microbial synthesis, estimated by the daily urinary allantoin excretion, and the efficiency of microbial synthesis, estimated by the allantoin to DOMI ratio, were not affected by treatment ($P \geq 0.40$) and there was no interaction between treatment and diet ($P \geq 0.52$). Urea-N in milk (Table 3) and plasma (Table 6) did not differ ($P \geq 0.13$ for treatment and $P \geq 0.19$ for the interaction of treatment and diet) in response to MON supplementation. The highest PUN concentration was observed 3 h post-feeding when diet LOW was fed and 1.5 h post-feeding when diet HIGH was fed.

Ingestion, rumination, and feed sorting behavior are in Table 7. For cows fed CTL, diet LOW induced a greater proportion of the daily intake at night than cows fed diet HIGH ($P = 0.09$ for the interaction between treatment and diet), but MON did not determine the proportion of intake in the 3 periods of the day ($P \geq 0.32$ for treatment). The supplementation of diet HIGH with MON reduced sorting behavior in favor of small feed particles (< 8 mm) in the morning but had no effect on sorting of small particles with diet LOW ($P = 0.10$ for the interaction between treatment and diet). In the afternoon, cows fed MON were less selective against long feed particles (> 19 mm) and in favor of short particles (< 8 mm) than cows fed CTL ($P \leq 0.05$ for treatment), independently of diet ($P \geq 0.25$ for the interaction between treatment and diet). At night, MON did not affect particle size sorting behavior ($P \geq 0.47$ for treatment). Although the biological significance of the difference seems to be of small magnitude (2%-units), cows fed diet LOW without MON sorted more in favor of starch than cows fed the other diets ($P = 0.05$ for the interaction between treatment and diet). Sorting against NDF was similar between treatments ($P = 0.72$ for treatment and $P = 0.82$ for the interaction between treatment and diet). Sorting for feed particles in periods of the day had greater absolute magnitude than sorting for starch and NDF over a 24-h period. Cows were slightly more selective against NDF than in favor of starch. Rumination in min/d was lower

for LOW than HIGH when cows were not supplemented with MON ($P = 0.09$ for the interaction between treatment and diet), but was similar when expressed in min/kg of DMI ($P = 0.88$ for treatment and $P = 0.77$ for the interaction between treatment and diet). Ingestion behavior in min/d and min/kg of DMI did not differ between treatments ($P \geq 0.31$). Meal duration and interval was reduced by MON only when the ionophore was added to diet HIGH ($P \leq 0.10$ for the interaction between treatment and diet). Meal frequency did not differ between treatments ($P = 0.47$). Rumination frequency, duration, and interval did not differ between treatments ($P \geq 0.21$).

Jugular blood acid-base balance is in Table 8. Monensin reduced the partial pressure of O_2 only when added to diet LOW ($P = 0.08$ for the interaction between treatment and diet). The O_2 saturation of hemoglobin and the % oxygen of total volume followed the same numerical trends of the partial pressure of O_2 response, but the treatment by diet interaction did not achieve a significant trend ($P = 0.12$ and $P = 0.11$, respectively). Diet HIGH tended ($P = 0.10$) to reduce blood pH, but MON had no effect ($P = 0.91$) and treatment did not interact with diet ($P = 0.66$). No major effect of MON on systemic acidosis was evident.

Milk FA profile is reported in Tables 9 to 12. Table 9 shows that MON had no effect on FA proportions in milk fat ($P \geq 0.23$), except for a trend ($P = 0.10$) of reduction in C20:1 and a reduction ($P = 0.02$) in C22:1 n-9. The proportions in milk fat of short FA, CLA, and C18:1 FA were similar for cows fed MON and CTL ($P \geq 0.27$). The response to treatments in daily FA secretion (Table 10) differed from the response in FA proportions. Monensin increased the daily secretion of C16:1 *cis*-9 ($P = 0.03$) and tended to increase C18:1 *trans*-10 ($P = 0.08$) and C18:1 *trans*-11 ($P = 0.07$), but did not change the C18:1 *trans*-10 to C18:1 *trans*-11 ratio ($P = 0.40$), the response to MON was not dependent of diet ($P \geq 0.14$ for the interaction between treatment and diet). Diet HIGH increased the proportion of short chain FA in milk fat ($P = 0.01$), reduced the proportion of long chain FA ($P = 0.03$), and increased the daily

secretions of short chain FA ($P < 0.01$), C18:2 *cis*-9 *trans*-11 ($P < 0.01$), C18:2 *cis*-9 *cis*-12 ($P = 0.01$), and C18:3 n-3 ($P = 0.01$). The proportions of odd and branched chain FA (**OBCFA**) in milk fat were not altered by MON ($P \geq 0.20$), except for the reduction in C13:0 iso ($P = 0.03$), and no interactions between treatment and diet were detected ($P \geq 0.17$). Monensin increased the daily secretions of C13:0 ($P < 0.01$), C13:0 anteiso ($P = 0.05$), C15:0 ($P = 0.04$), and reduced the sum of C15:0 iso and C17:0 iso ($P < 0.01$). There was no significant interaction between treatment and diet for the daily secretion of OBCFA ($P \geq 0.12$).

DISCUSSION

The objective of having diets differing in ruminal acidogenic capacity was apparently achieved. Diet HIGH reduced ruminal pH, tended to reduce blood pH and the ratio of C18:1 *trans*-10 to C18:1 *trans*-11 in milk fat (Fuentes et al., 2011; Lascano et al., 2016), and increased plasma D-lactate concentration (Harmon et al., 1985) compared to LOW.

Monensin supplementation increased feed efficiency by reducing DMI at similar milk secretion. The intake of net energy was apparently regulated, since ECM, BW, and BCS did not differ between CTL and MON treatments. This pattern of response to MON supplementation has been described by compilations of the literature (Duffield et al., 2008b). However, the reduction in DMI occurred only when diet HIGH was fed from d 36 to 63 of the experiment, suggesting that the gain in feed efficiency in response to MON was diet dependent. Akins et al. (2014) observed a greater increase in feed efficiency of dairy cows when MON supplemented a diet with 26.9% starch compared to an iso-forage diet with 20.4% starch in which corn grain was partially replaced with soyhulls, in agreement with our observation that MON supplementation was more favorable when diet acidogenic capacity was increased.

Plasma glucose concentration increased in response to MON only when diet HIGH was fed and had a pattern of response over the duration of the experiment that was similar to the

response in intake and feed efficiency, suggesting that glucose was involved in intake regulation. Glucose is known to be potentially hypophagic in ruminants (Larsen and Kristensen, 2009; Larsen et al., 2010), although the role of glucose in regulation of DMI is not consensual (Allen, 2000). Hurtaud et al. (1998) observed that the infusion of increasing amounts of glucose into the duodenum of lactating cows induced a linear decrease in DMI, but had no effect on net energy intake that was similar across infusion levels. Similar finding was observed in our experiment in regard to plasma glucose concentration and net energy intake.

There is plenty of evidence to substantiate the reduction in the acetate to propionate ratio in rumen fluid and the consequent reduction in energy loss as methane (Duffield et al., 2008b; Ellis et al., 2012) as causative factors for the increases in plasma glucose concentration and energy intake per unit of DMI in response to MON supplementation. Monensin can increase ruminal propionate production (Armentano and Young, 1983) and liver gluconeogenesis (Karcher et al., 2007). The reduction in methane in response to MON could not be ascribed to a direct effect of the ionophore on archaea population, but rather to a decrease in substrate availability for methanogenesis by acting on other microorganisms (Chen and Wolin, 1979; Schären et al., 2017). Schären et al. (2017) observed that MON selected for bacterial groups with less-permeable cell walls and increased the abundance in rumen fluid of succinate and propionate producers and reduced the abundance of non-producers and moderate producers of propionate. Monensin reduced the ruminal concentration of total protozoa in our experiment, also capable of reducing hydrogen and methane production in the rumen (Russel and Strobel, 1989; Debasis and Singh, 2003) and possibly favoring the production of propionate as an electron sink mechanism (Ørskov et al., 1968; Janssen, 2010). The glucogenic capacity of the diet was apparently increased by MON only when it supplemented diet HIGH.

The short term (week 3) responses in the molar proportions of acetate and propionate in ruminal VFA and in the acetate to propionate ratio to the supplementation of diet LOW with MON were similar to the responses in the same variables to MON supplementation of diet HIGH in week 9. The effect of MON on ruminal fermentation was fast acting, did not interact with diet, and showed no evidence of microbial resistance to the ionophore (Guan et al., 2006) during the 9-week experimental period. Similar observation was done by Odongo et al. (2007a,b) by evaluating the effect of MON on milk FA profile and methane excretion of lactating cows supplemented during 6 months with a sustained slow release MON product.

Plasma D-lactate concentration was reduced by MON in weeks 3 and 9. Nagaraja et al. (1981) reported that MON increased ruminal pH and reduced the concentrations of ruminal lactate and plasma D-lactate in beef cattle subjected to a ruminal acidosis induction protocol. The reduction in ruminal butyrate in response to MON is in agreement with most of the published literature (Haimoud et al., 1996; Ellis et al., 2012), but occurred only when diet LOW was fed. Although the molar proportion of butyrate in VFA is not a measure of ruminal butyrate production, a reduction in butyrate absorption would increase gluconeogenesis from propionate (Aiello and Armentano, 1987) and could increase plasma glucose concentration in response to MON supplementation during the first weeks of the experiment. Based on these observations, the change induced by MON in ruminal VFA proportions and plasma D-lactate could not explain the delayed response in plasma glucose and feed efficiency to MON supplementation during the experiment.

Monensin affected feed particles sorting behavior, but had no major effect on NDF and starch sorting. The composition of the consumed diets in nutrients was not affected by MON. Monensin reduced selective sorting in favor of short feed particles and reduced selective refusal of long particles in the afternoon. The reduction in meal duration and meal interval when MON supplemented diet HIGH would be expected based on the possibility of increased

ruminal propionate absorption (Allen et al., 2009; Stocks and Allen, 2012). Monensin reduced meal interval in dairy cows around calving (Mullins et al., 2012) and increased meal frequency and reduced meal duration in beef steers fed a high concentrate diet (Erickson et al., 2003).

Monensin increased milk fat concentration and had no effect on fat yield. In most published literature, MON reduced milk fat concentration, usually with no effect on milk fat yield (Ipharraguerre and Clark, 2003; Duffield et al., 2008b). The reduction of fat concentration in response to MON is usually followed by a reduction in the proportion of short chain FA and an increase in CLA in milk fat (Duffield et al., 2008b; Rico et al., 2014). However, Mathew et al. (2011) observed that FA analysis of milk fat and ruminal fluid did not implicate any particular biohydrogenation intermediate or ruminal fermentation profile as the causative factor for the milk fat depression induced by MON. Bell et al. (2006) observed that MON decreased short-chain FA in milk only when unsaturated fat was included in the diet. The increase in milk fat concentration could not be related to any milk FA in this experiment. The positive response in milk fat concentration was consistent after the third experimental week (Figure 2). The increase in milk fat concentration in response to MON was not expected and may be related to a reduction in ruminal acidosis, as suggested by the reduction in plasma D-lactate concentration.

Monensin reduced the total tract NDF digestibility more when it supplemented diet LOW than when it supplemented diet HIGH, but had no effect on starch and total tract OM digestibility. The inhibitory effect of MON on fibrolytic bacteria has been reported (Chen and Wolin, 1979). The total tract NDF digestibility was higher on diet HIGH, probably reflecting the lower proportion of whole cottonseeds NDF in total NDF and the slightly lower dietary fat concentration than diet LOW. The negative effect of MON on NDF digestibility was apparently accentuated by the presence of low-digestible NDF and fat in the diet. Authors

(Haïmoud et al., 1995; Haïmoud et al., 1996; Reveneau et al., 2012) have reported reduced ruminal degradation of NDF in response to MON without simultaneous reduction in total tract digestibility, suggesting a compensatory digestion of fiber in the lower tract. Our data do not suggest that lower tract fiber digestibility would be capable of compensating for a reduction in ruminal fibrolytic capacity induced by MON. Monensin reduced the daily secretion of FA C15:0 iso plus C17:0 iso and the concentration in milk fat of C13:0 iso. According to Vlaeminck et al. (2006) the cellulolytic bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus* have high concentration of iso-FA in membrane lipids. The reduction of these markers of cellulolytic bacteria supports the possibility that MON supplementation inhibited ruminal fiber digestion.

CONCLUSIONS

Monensin reduced DMI, meal duration, meal interval, and increased feed efficiency only when added to a high acidogenic diet. Plasma glucose concentration was apparently involved in the response to MON and ruminal fermentation profile did not explain the interaction between MON supplementation and diet composition. Monensin had minor effect on milk FA composition and reduced total tract NDF digestibility.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fapemig (Minas Gerais Foundation for Research Support, Belo Horizonte, Brazil), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brasilia, Brazil) and CNPq (National Research Council, Brasilia, Brazil) for the grants to the authors, to MCassab Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brazil) for partially funding the project, to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the help in data collection and animal care, to Dante Pazzanese Duarte Lanna (Esalq/USP, Piracicaba, Brazil) for the analysis of milk fatty acids, and Marco Antônio Sundfeld da Gama and

Fernando Cézar Ferraz Lopes (EMBRAPA CNPGL, Coronel Pacheco, Brazil) for the analysis of ruminal VFA.

REFERENCES

- Aiello, R. J., and L. E. Armentano. 1987. Effects of volatile fatty acids on propionate metabolism and gluconeogenesis in caprine hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 70:2504-2510.
- Akins, M. S., K. L. Perfield, H. B. Green, S. J. Bertics, and R. D. Shaver. 2014. Effect of monensin in lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. *J. Dairy Sci.* 97:917-929.
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598-1624.
- Allen, M. S., B. J. Bradford, and M. Oba. 2009. Board-Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci.* 87:3317-3334.
- AOAC International. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Appuhamy, J. A. D. R. N., A. B. Strathe, S. Jayasundara, C. Wagner-Riddle, J. Dijkstra, J. France, and E. Kebreab. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:5161-5173.
- Armentano, L. E., and J. W. Young. 1983. Production and metabolism of volatile fatty acids, glucose and CO₂ in steers and the effects of monensin on volatile fatty acid kinetics. *J. Nutr.* 113:1265-1277.
- Bell, J. A., J. M. Griinari, and J. J. Kennelly. 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89:733-748.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores : Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.

- Chen, G., and J. B. Russell. 1990. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2186-2192.
- Chen, M., and M. J. Wolin. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:72-77.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.*
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger, and D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Christie, W. W. 1982. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *J. Lip. Res.* 23:1072-1075.
- Debasis, D., and G. P. Singh. 2003. Effect of ionophore enriched cold processed mineral block supplemented with urea molasses on rumen fermentation and microbial growth in crossbred cattle. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 16:852-862.
- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182-185.
- Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008a. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *J. Dairy Sci.* 91:1334-1346.
- Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008b. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *J. Dairy Sci.* 91:1347-1360.
- Ellis, J. L., J. Dijkstra, A. Bannink, E. Kebreab, S. E. Hook, S. Archibeque, and J. France. 2012. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high grain fed beef cattle. *J. Anim. Sci.* 90:2717-2726.

- Erickson, G. E., C. T. Milton, K. C. Fanning, R. J. Cooper, R. S. Swingle, J. C. Parrott, G. Vogel, and T. J. Klopfenstein. 2003. Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2869-2879.
- Fellner, V., F. D. Sauer, and J. K. Kramer. 1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J. Dairy Sci.* 80:921-928.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, V. Fievez, M. Blanch, and D. Mercadal. 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:35-45.
- Glasser, F., M. Doreau, A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2007. Technical Note: Estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. *J. Dairy Sci.* 90:2302-2304.
- Guan, H., K. M. Wittenberg, K. H. Ominski, and D. O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *J. Anim. Sci.* 84:1896-1906.
- Haïmoud, D. A., M. Vernay, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 1995. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. *Can. J. Anim. Sci.* 75:379-385.
- Haïmoud, D. A., C. Bayourthe, R. Moncoulon, and M. Vernay. 1996. Avoparcin and monensin effects on digestive function in cows fed a high forage diet. *J. Sci. Food Agric.* 70:181-189.
- Hall, M. B. 2009. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 92:42-49.
- Haney, M., and M. Hoehn. 1967. Monensin, a new biologically active compound I: Discovery and isolation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1:349-349.

- Hara, A., and N. S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analit. Biochem.* 90:420-426.
- Harmon, D. L., R. A. Britton, R. L. Prior, and R. A. Stock. 1985. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. *J. Anim. Sci.* 60:560-569.
- Hurtaud, C., H. Rulquin, and R. Verite. 1998. Effects of graded duodenal infusions of glucose on yield and composition of milk from dairy cows. Diets based on corn silage. *J. Dairy Sci.* 81:3239-3247.
- Ipharraguerre, I. R., and J. H. Clark. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:1052-1073.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:1-22.
- Jenkins, T. C., V. Fellner, and R. K. McGuffey. 2003. Monensin by fat interactions on trans fatty acids in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. *J. Dairy Sci.* 86:324-330.
- Karcher, E. L., M. M. Pickett, G. A. Varga, and S. S. Donkin. 2007. Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. *J. Anim. Sci.* 85:690-699.
- Larsen, M., A. E. Relling, C. K. Reynolds, and N. B. Kristensen. 2010. Effect of abomasal glucose infusion on plasma concentrations of gut peptides in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:5729-5736.
- Larsen, M., and N. B. Kristensen. 2009. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic and whole-body glucose metabolism in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1071-1083.

- Lascano, G. J., M. Alende, L. E. Koch, and T. C. Jenkins. 2016. Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. *J. Dairy Sci.* 99:6334-6341.
- Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557-564.
- Mathew, B., M. L. Eastridge, E. R. Oelker, J. L. Firkins, and S. K. R. Karnati. 2011. Interactions of monensin with dietary fat and carbohydrate components on ruminal fermentation and production responses by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:396-409.
- Muller, L. D., F. Bargo, and I. R. Ipharraguerre. 2006. Review: Monensin for grazing dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 22:115-119.
- Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323-1336.
- Nagaraja, T. G., T. B. Avery, E. E. Bartley, S. J. Galitzer, and A. D. Dayton. 1981. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. *J. Anim. Sci.* 53:206-216.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Odongo, N. E., R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, M. M. Or-Rashid, S. E. Hook, J. T. Gray, E. Kebreab, J. France, and B. W. McBride. 2007a. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1781-1788.
- Odongo, N. E., M. M. Or-Rashid, R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, E. Kebreab, J. France, and B. W. McBride. 2007b. Long-term effects of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5126-5133.

- Ørskov, E. R., W. P. Flatt, and P. W. Moe. 1968. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. *J. Dairy Sci.* 51:1429-1435.
- Rico, D. E., A.W. Holloway, and K. J. Harvatine. 2014. Effect of monensin on recovery from diet-induced milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 97:2376-2386.
- Reveneau, C., S. K. R. Karnati, E. R. Oelker, and J. L. Firkins. 2012. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. *J. Dairy Sci.* 95:2046-2060.
- Russel, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1-6.
- Russell, J. B. 1987. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: Effects on ion flux and proton motive force. *J. Anim. Sci.* 64:1519-1525.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., version 9.3 ed, Cary, NC.
- Schären, M., C. Drong, K. Kiri, S. Riede, M. Gardener, U. Meyer, J. Hummel, T. Urich, G. Breves, and S. Dänicke. 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:2765-2783.
- Stocks, S. E., and M. S. Allen. 2012. Hypophagic effects of propionate increase with elevated hepatic acetyl coenzyme A concentration for cows in the early postpartum period. *J. Dairy Sci.* 95:3259-3268.
- Surber, L. M., and J. G. Bowman. 1998. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 76:1945-1954.

- Van Maanen, R. W., J. H. Herbein, A. D. McGilliard, and J. W. Young. 1978. Effects of monensin on in vivo rumen propionate production and blood glucose kinetics in cattle. *J. Nutr.* 108:1002-1007.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd-and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- Warner, A. C. 1962. Enumeration of rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 28: 119-128.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.
- Yousef, M. K. 1985. *Stress Physiology in Livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Zinn, R. A., A. Plascencia, and R. Barajas. 1994. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. *J. Anim. Sci.* 72:2209-2215.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Ingredient and nutrient composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) of the low acidogenic diet fed on weeks 1 to 5 (LOW) and of the high acidogenic diet fed on weeks 6 to 9 (HIGH)

	LOW	HIGH
Corn silage (51.6 % NDF, 24.4 % Starch)	40.5	40.4
Tifton hay (69.7 % NDF)	3.9	3.9
Soybean meal (45.2 % CP)	9.6	11.6
Soypass Cargill (48.9 % CP)	7.7	7.7
Whole cottonseed	14.6	7.9
Finely ground mature corn	20.7	17.0
Finely ground mature corn rehydrated and ensiled		8.5
Limestone	1.3	1.3
Sodium bicarbonate	0.8	0.8
Magnesium oxide	0.3	0.3
Salt	0.2	0.2
Minerals and vitamins ¹	0.4	0.4
CP	16.3	16.4
NDF	33.8	32.5
Forage NDF	23.5	23.5
Starch	25.8	30.0
Starch from ground mature corn	15.4	12.8
Starch from ground mature corn rehydrated and ensiled		6.3
Ether extract	5.1	4.1
Ash	6.9	6.6
NFC ²	37.9	40.4
NE _L , ³ Mcal/kg DM	1.59	1.58
DM, % of as fed	48.3	45.6
Feed particles > 19 mm ⁴	14.7 ± 3.6	13.5 ± 1.8
Feed particles 8 - 19 mm ⁴	35.4 ± 1.0	34.8 ± 4.1
Feed particles < 8 mm ⁴	49.9 ± 2.7	51.7 ± 5.4

¹21.0 % Ca, 15.6 % P, 3.0 % Mg, 3.9% S, 150 ppm Co, 2,000 ppm Cu, 5,000 ppm Mn, 11,903 ppm Zn, 82 ppm Se, 200 ppm I, 1,000 KUI/kg Vit A, 220 KUI/kg Vit D, 6,200 UI/kg Vit E.

²NFC = 100 - (CP + NDF + Ether extract + Ash).

³Dairy NRC (2001) estimate.

⁴Diameter of the sieves of the Penn State Particle Separator. Mean and standard deviation of 20 samples for LOW and 16 samples for HIGH (4/week).

Table 2. Model evaluation (NRC 2001) of the diets on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet fed on weeks 1 to 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 6 to 9 (HIGH)

	LOW		HIGH	
	CTL	MON	CTL	MON
NE _L allowable milk, kg/d	37.3	35.7	36.2	32.7
MP allowable milk, kg/d	37.7	37.1	37.0	34.1
NE _L , Mcal/kg DM	1.59	1.60	1.58	1.60
NE _L maintenance, Mcal/d	10.0	10.2	10.3	10.5
NE _L lactation, Mcal/d	21.4	21.7	21.8	22.8
NE _L required, Mcal/d	31.4	31.9	32.1	33.3
NE _L supplied, Mcal/d	35.0	34.7	35.0	33.4
NE _L balance, Mcal/d	3.6	2.8	2.9	0.1
CP, % of DM	16.3	16.3	16.4	16.4
RDP, % of DM	10.1	10.2	10.0	10.2
RUP, % of DM	6.2	6.1	6.4	6.2
RDP balance, g/d	51	60	38	52
RUP balance, g/d	297	283	276	132
MP required, g/d	2161	2130	2238	2206
MP supplied, g/d	2407	2364	2469	2317
MP balance, g/d	246	234	231	110
MP microbial, g/d	1180	1167	1185	1129
MP RUP, g/d	1123	1095	1179	1089
MP endogenous, g/d	104	102	104	99
MP microbial, % total MP	49.0	49.3	47.9	48.7
Lysine, % MP	6.40	6.42	6.36	6.41
Methionine, % MP	1.80	1.81	1.79	1.80
Histidine, % MP	2.23	2.23	2.23	2.23
Lys/Met	3.55	3.54	3.55	3.56
Total EAA, g/d	1293	1273	1317	1241

Table 3. Intake, lactation performance, milk urea-N, feed efficiency, BW, and BCS during the 9 weeks of the experiment on treatments Control (CTL) and Monensin (MON)

	CTL	MON	SEM	<i>P</i> -value ¹	
				Trt	Trt x Wk
DMI, kg/d	22.2	21.5	0.30	0.06	< 0.01
DOMI, ² kg/d	15.0	14.3	0.35	0.05	0.83
Milk, kg/d	32.5	32.1	0.29	0.32	0.19
ECM, kg/d	31.7	31.8	0.39	0.64	0.16
4% FCM, kg/d	30.1	30.2	0.32	0.57	0.14
Fat, kg/d	1.152	1.163	0.024	0.43	0.13
Fat, %	3.54	3.66	0.032	0.03	0.06
Protein, kg/d	1.027	1.022	0.013	0.72	0.41
Protein, %	3.20	3.20	0.041	0.93	0.55
Lactose, kg/d	1.504	1.496	0.017	0.71	0.27
Lactose, %	4.63	4.66	0.025	0.40	0.62
Solids, kg/d	3.992	3.994	0.053	0.97	0.23
Solids, %	12.40	12.48	0.047	0.14	0.78
MUN, mg/dL	17.9	17.3	0.31	0.13	0.47
Milk/DMI, kg/kg	1.45	1.48	0.018	0.18	< 0.01
ECM/DMI, kg/kg	1.42	1.47	0.021	0.14	< 0.01
ECM/DOMI, kg/kg	2.11	2.24	0.068	0.13	0.04
BW, kg	637	633	3.91	0.32	0.86
BCS, 1 to 5	3.37	3.34	0.04	0.34	0.20

¹*P* < 0.01 for the effect of week for all variables (weeks 1 to 9). Trt = Treatment. Trt x Wk = Interaction between Trt and week of experiment.

²Digestible OM intake.

Table 4. Total tract apparent digestibility (D) of DM, OM, NDF, Non-NDF OM, and starch (% of intake), digestible OM intake (DOMI, kg/d), and ECM/DOMI (kg/kg) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
DM D	68.8	68.3	70.1	71.4	1.07	0.69	0.04	0.40
OM D	71.6	69.7	73.1	72.8	1.02	0.29	0.03	0.42
NDF D	52.1 ^b	41.3 ^c	57.0 ^a	52.0 ^b	3.59	0.04	< 0.01	0.05
Non-NDF OM D	86.0	85.8	84.9	84.0	0.78	0.49	0.07	0.66
Starch D	93.2	92.1	92.6	92.7	1.15	0.55	0.23	0.95
DOMI	14.7	14.0	15.2	14.2	0.27	0.01	< 0.01	0.29
ECM/DOMI	2.17 ^a	2.25 ^a	2.06 ^b	2.29 ^a	0.066	0.07	0.31	0.02

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9). Means in a row with differing superscripts differ by pairwise t-test at $P \leq 0.05$ (a b c).

Table 5. Ruminal fluid VFA proportions (mol/100 mol), acetate/propionate ratio (A/P), ruminal pH, total protozoa concentration ($\times 10^5/\text{mL}$), urinary allantoin excretion (Alla, mmol/d), Alla/digestible OM intake (Alla/DOMI, mmol/kg), and plasma D-lactate concentration (μM) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	CTL	MON	CTL	MON		Trt	Diet	Trt x Diet
Acetate	61.2	57.1	61.3	54.8	2.35	0.01	0.31	0.29
Propionate	25.4	30.6	26.2	31.5	0.84	< 0.01	0.33	0.93
Butyrate	13.7 ^a	11.9 ^b	13.0 ^{ab}	13.2 ^{ab}	0.63	0.21	0.66	0.10
A/P	2.49	1.88	2.37	1.74	0.173	< 0.01	0.17	0.91
pH	7.00	6.76	6.33	6.26	0.109	0.18	< 0.01	0.44
Protozoa	2.30 ^b	1.50 ^c	3.71 ^a	4.04 ^a	0.406	0.56	< 0.01	0.09
Alla	268	263	266	242	17.0	0.40	0.41	0.52
Alla/DOMI	19.4	19.0	18.0	17.2	1.03	0.61	0.01	0.64
D-lactate	59.7	50.2	68.6	55.8	2.01	< 0.01	< 0.01	0.40

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9). Means in a row with differing superscripts differ by pairwise t-test at $P \leq 0.05$ (a b c).

Table 6. Plasma urea-N (PUN, mg/dL) 0, 1.5, and 3 h post feeding on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	CTL	MON	CTL	MON		Trt	Diet	Trt x Diet
PUN 0 h	16.1	16.5	17.9	18.4	0.48	0.48	< 0.01	0.94
PUN 1.5 h	17.2	18.3	20.3	20.9	0.54	0.27	< 0.01	0.62
PUN 3 h	20.2	18.5	18.6	18.2	0.64	0.36	0.10	0.19

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9).

Table 7. Proportion of intake in periods of the day (% of daily intake), starch, NDF, and feed particles sorting behavior (Observed/Predicted, %), chewing activity, and meal pattern on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	P-value ¹		
	CTL	MON	CTL	MON		Trt	Diet	Trt x Diet
DMI, ² kg/d	21.9 ^b	22.1 ^{ab}	22.8 ^a	21.8 ^b	0.68	0.56	0.21	0.03
Orts, ² % offered TMR	10.3 ^b	12.2 ^a	12.9 ^a	12.1 ^a	0.67	0.07	0.38	0.04
0700 to 1300 h	33.1	33.0	34.1	32.7	0.89	0.32	0.48	0.51
1300 to 1900 h	42.9	43.6	47.4	47.1	1.42	0.47	0.03	0.21
1900 to 0700 h	24.1 ^a	23.5 ^{ab}	18.6 ^b	20.2 ^{ab}	2.09	0.98	0.01	0.09
Starch sorting ³	102 ^a	100 ^b	99 ^b	100 ^b	0.7	0.25	0.05	0.05
NDF sorting ³	96	96	97	97	0.4	0.72	0.05	0.82
0700 to 1300 h ⁴	Feed particles sorting ³							
> 19 mm	87	109	82	99	14.5	0.20	0.55	0.81
8 - 19 mm	95	95	94	95	1.1	0.91	0.81	0.82
< 8 mm	106 ^{ab}	106 ^{ab}	107 ^a	104 ^b	1.9	0.49	0.74	0.10
1300 to 1900 h ⁴								
> 19 mm	62	81	45	80	8.4	0.01	0.26	0.33
8 - 19 mm	98	99	93	99	3.3	0.31	0.32	0.28
< 8 mm	107	104	115	108	2.3	0.05	0.01	0.25
1900 to 0700 h ⁴								
> 19 mm	88	84	78	70	9.1	0.51	0.16	0.80
8 - 19 mm	93	94	100	94	4.3	0.64	0.43	0.47
< 8 mm	108	108	125	114	7.6	0.47	0.04	0.36
Ing, ⁵ min/d	313	318	292	283	13.6	0.31	0.17	0.15
Ing, min/kg DMI	14.3	14.4	12.8	12.9	0.78	0.41	0.22	0.20
Rum, ⁵ min/d	460 ^b	478 ^{ab}	495 ^a	467 ^{ab}	15.8	0.80	0.37	0.09
Rum, min/kg DMI	21.0	21.6	21.7	21.4	1.07	0.88	0.97	0.77
Chew, ⁵ min/d	773	796	787	750	23.6	0.39	0.31	0.16
Chew, min/kg DMI	35.2	36.0	34.5	34.4	1.18	0.68	0.32	0.24
FM duration, ⁶ min	35.4	36.3	39.0	39.4	1.43	0.26	0.73	0.28
Meal duration, min	31.3 ^a	29.8 ^{ab}	31.4 ^a	27.5 ^b	1.70	0.89	0.23	0.03
Meal interval, min	142 ^a	135 ^a	136 ^a	118 ^b	7.6	0.39	0.16	0.10
Meals/d	10.0	10.7	9.3	10.3	0.69	0.47	0.21	0.12
Rum duration, min	38.5	37.0	40.5	37.5	1.73	0.38	0.69	0.16
Rum interval, min	86.4	80.9	84.8	85.1	3.94	0.32	0.65	0.19
Rum/d	11.9	12.9	12.2	12.4	0.69	0.21	0.96	0.24

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9). Means in a row with differing superscripts differ by pairwise t-test at $P \leq 0.05$ (a b).

²DMI and Orts during the 3 days of chewing activity and feed sorting behavior evaluation.

³< 100 % = rejection, > 100 % = preferential intake, = 100 % = no selection.

⁴Diameter of the sieves of the Penn State Particle Separator.

⁵Ing = Ingestion, Rum = Rumination, Chewing = Ing + Rum.

⁶First meal duration.

Table 8. Jugular blood acid-base balance 8 h post-feeding on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
pCO ₂ , ² mm Hg	29.3	29.7	37.9	38.3	1.39	0.78	< 0.01	0.96
pO ₂ , ² mm Hg	38.8 ^a	29.7 ^b	31.4 ^b	31.7 ^b	3.05	0.12	0.31	0.08
pH	7.46	7.46	7.44	7.44	0.013	0.91	0.10	0.66
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	20.9	21.2	25.4	25.7	1.29	0.79	< 0.01	0.99
Total CO ₂ , mmol/L	22.1	22.1	26.5	26.9	1.49	0.88	< 0.01	0.87
Base excess, mmol/L	-0.5	-0.7	2.0	2.4	1.27	0.95	0.04	0.81
SatO ₂ , ² %	68.0	60.1	62.0	62.2	2.57	0.16	0.43	0.12
O _{2ct} , ² %	15.3	13.5	13.9	13.9	0.40	0.16	0.42	0.11

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9). Means in a row with differing superscripts differ by pairwise t-test at $P \leq 0.05$ (a b).

²pCO₂ = partial pressure of CO₂; pO₂ = partial pressure of O₂; SatO₂ = % oxygen saturation of hemoglobin; O_{2ct} = % oxygen of the total volume.

Table 9. Fatty acid proportions in milk fat (g/100 g fatty acids) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
4:0	7.58	7.52	7.36	7.26	0.241	0.75	0.27	0.92
6:0	3.76	3.92	3.87	3.99	0.147	0.34	0.36	0.82
8:0	1.84	1.91	2.02	2.20	0.132	0.31	< 0.01	0.49
10:0	3.61	3.91	4.07	4.41	0.274	0.23	< 0.01	0.88
12:0	3.55	3.74	4.06	4.30	0.279	0.42	< 0.01	0.88
14:0	11.11	11.06	11.53	11.88	0.494	0.74	0.07	0.55
14:1 <i>cis</i> -9	0.64	0.68	0.76	0.79	0.048	0.46	< 0.01	0.83
16:0	29.36	29.39	29.76	29.52	1.027	0.91	0.77	0.87
16:1 <i>cis</i> -9	1.22	1.27	1.22	1.29	0.076	0.43	0.84	0.79
18:0	11.68	11.17	10.34	10.01	0.372	0.27	< 0.01	0.76
18:1 <i>trans</i> -10	0.32	0.32	0.35	0.35	0.019	0.85	0.18	0.85
18:1 <i>trans</i> -11	0.64	0.65	0.61	0.60	0.042	0.72	0.34	0.45
18:1 <i>cis</i> -9	17.14	17.01	16.19	16.03	1.136	0.89	0.11	0.98
18:1 <i>cis</i> -11	0.69	0.66	0.64	0.63	0.062	0.71	0.29	0.84
18:1 <i>cis</i> -12	0.45	0.45	0.42	0.39	0.024	0.52	0.04	0.55
18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0.17	0.16	0.18	0.19	0.011	0.63	0.14	0.50
18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	1.79	1.71	1.96	1.82	0.101	0.33	0.07	0.72
18:3 n-3	0.09	0.10	0.11	0.12	0.012	0.47	0.01	0.52
20:0	0.06	0.06	0.05	0.05	0.005	0.28	0.02	0.82
20:1	0.03	0.03	0.04	0.03	0.002	0.10	< 0.01	0.71
20:4 n-6	0.07	0.07	0.08	0.08	0.005	0.48	< 0.01	0.83
20:5 n-3	0.07	0.08	0.06	0.07	0.003	0.80	0.77	0.44
22:1 n-9	0.05	0.04	0.06	0.05	0.004	0.02	0.07	0.38
22:5	0.01	0.01	0.02	0.02	0.002	0.61	0.05	0.44
Ratio ²	0.54	0.52	0.58	0.59	0.043	0.94	0.06	0.55
< 16:0	34.14	35.49	35.91	37.78	1.241	0.27	0.01	0.72
16:0 + 16:1	30.57	30.55	30.97	30.41	0.969	0.76	0.87	0.75
≥ 18:0	33.94	33.09	31.80	31.79	1.074	0.78	0.03	0.57

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9).

²Ratio = C18:1 *trans*-10/C18:1 *trans*-11.

CLA (*trans*-10 *cis*-12; *cis*-10 *trans*-12 and *trans*-9 *cis*-11) were undetected.

Table 10. Fatty acid secretion in milk fat (g/d) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
4:0	76.4	80.5	75.6	81.9	4.44	0.25	0.92	0.66
6:0	37.8	42.3	39.8	44.8	2.83	0.11	0.07	0.82
8:0	18.5	20.9	21.0	25.2	2.52	0.18	< 0.01	0.35
10:0	36.1	42.8	42.1	51.2	5.10	0.12	< 0.01	0.45
12:0	35.7	41.0	41.8	49.9	4.919	0.17	< 0.01	0.39
14:0	110.8	120.0	118.2	135.2	11.20	0.23	< 0.01	0.30
14:1 <i>cis</i> -9	6.4	7.3	7.8	8.8	0.58	0.11	< 0.01	0.83
16:0	294.7	310.2	305.2	330.2	15.41	0.21	0.16	0.66
16:1 <i>cis</i> -9	12.3	13.4	12.4	14.8	0.72	0.03	0.08	0.14
18:0	116.5	116.1	105.9	115.2	5.80	0.45	0.13	0.20
18:1 <i>trans</i> -10	3.2	3.6	3.2	4.0	0.03	0.08	0.42	0.32
18:1 <i>trans</i> -11	6.1	7.1	6.1	7.0	0.46	0.07	0.93	0.96
18:1 <i>cis</i> -9	172.7	177.4	166.7	184.6	13.71	0.39	0.92	0.29
18:1 <i>cis</i> -11	7.0	6.4	6.6	7.3	0.65	0.51	0.69	0.20
18:1 <i>cis</i> -12	4.5	4.6	4.3	4.5	0.26	0.66	0.44	0.71
18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	1.7	1.7	1.9	2.3	0.14	0.23	< 0.01	0.22
18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	17.9	18.1	20.1	21.0	1.58	0.73	0.01	0.68
18:3 n-3	1.0	0.9	1.2	1.3	0.15	0.46	0.01	0.15
20:0	0.7	0.6	0.7	0.7	0.13	0.50	0.63	0.71
20:1	0.01	0.01	0.02	0.02	0.08	0.45	0.06	0.45
20:4 n-6	0.9	0.9	0.9	1.0	0.07	0.56	0.56	0.61
20:5 n-3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.09	0.71	0.92	0.83
22:1 n-9	0.5	0.3	0.7	0.6	0.29	0.28	0.05	0.87
22:5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.10	0.87	0.84	0.86
Ratio ²	0.52	0.50	0.51	0.56	0.382	0.40	0.21	0.26
< 16:0	347.5	384.9	374.1	431.1	32.36	0.14	< 0.01	0.35
16:0 + 16:1	307.2	323.7	317.8	344.7	15.55	0.18	0.15	0.63
≥ 18:0	339.2	347.6	325.5	360.0	20.81	0.30	0.92	0.18

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9).

²Ratio = C18:1 *trans*-10/C18:1 *trans*-11.

CLA (*trans*-10 *cis*-12; *cis*-10 *trans*-12 and *trans*-9 *cis*-11) were undetected.

Table 11. Odd and branched-chain fatty acid (OBCFA) proportions in milk fat (g/100 g fatty acids) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
11:0	0.28	0.31	0.35	0.36	0.016	0.20	< 0.01	0.69
13:0	0.11	0.12	0.13	0.13	0.009	0.46	0.01	0.96
13:0 iso	0.04	0.03	0.05	0.04	0.002	0.03	0.03	0.77
13:0 anteiso	0.06	0.06	0.07	0.07	0.005	0.53	< 0.01	0.73
14:0 iso	0.10	0.09	0.11	0.09	0.009	0.22	0.41	0.50
15:0	0.85	0.87	0.92	0.94	0.039	0.57	< 0.01	0.94
15:0 iso	0.20	0.19	0.20	0.20	0.009	0.63	0.26	0.58
15:0 anteiso	0.46	0.44	0.45	0.45	0.018	0.54	0.97	0.42
16:0 iso	0.17	0.17	0.20	0.18	0.016	0.64	0.01	0.17
17:0 iso	0.20	0.21	0.20	0.21	0.011	0.35	0.76	0.84
17:1	0.08	0.09	0.07	0.07	0.012	0.57	0.17	0.82
21:0	0.02	0.02	0.03	0.02	0.004	0.29	0.40	0.54
15:0 iso + 17:0 iso	0.40	0.40	0.40	0.41	0.016	0.63	0.63	0.98
Ratio ²	1.17	1.10	1.12	1.11	0.038	0.26	0.54	0.41
Total OBCFA	2.41	2.35	2.56	2.52	0.075	0.52	< 0.01	0.84

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9).

²Ratio = 15:0 anteiso/(15:0 iso + 17:0 iso).

Table 12. Odd and branched-chain fatty acid (OBCFA) secretion in milk fat (g/d) on treatments Control (CTL) and Monensin (MON) with the low acidogenic diet on week 3 (LOW) and with the high acidogenic diet on week 9 (HIGH)

	LOW		HIGH		SEM	Trt	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	MON	CTL	MON			Diet	Trt x Diet
11:0	2.9	3.4	3.7	4.1	0.25	0.12	< 0.01	0.88
13:0	1.1	1.4	1.3	1.7	0.13	< 0.01	0.02	0.77
13:0 iso	0.2	0.1	0.5	0.4	0.15	0.52	0.02	0.94
13:0 anteiso	0.5	0.8	0.9	1.0	0.11	0.05	< 0.01	0.27
14:0 iso	1.1	1.0	0.9	1.1	0.12	0.70	0.62	0.12
15:0	8.2	9.4	9.4	11.0	0.60	0.04	< 0.01	0.53
15:0 iso	2.3	2.1	2.0	2.0	0.12	0.30	0.10	0.29
15:0 anteiso	4.6	5.0	4.7	5.4	0.41	0.17	0.26	0.30
16:0 iso	1.9	1.7	2.0	1.9	0.13	0.23	0.04	0.30
17:0 iso	2.2	2.1	2.3	2.1	0.14	0.23	0.27	0.36
17:1	1.3	1.2	1.0	0.9	0.09	0.97	0.11	0.40
21:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.09	0.88	0.94	0.86
15:0 iso + 17:0 iso	4.5	4.2	4.3	4.1	0.08	< 0.01	0.13	0.18
Ratio ²	1.02	1.18	1.08	1.31	0.324	0.26	0.53	0.40
Total OBCFA	26.6	28.5	29.0	31.9	2.98	0.12	< 0.01	0.34

¹Trt = Treatment. Trt x Diet = Interaction between Trt and Diet (weeks 3 vs. 9).

²Ratio = 15:0 anteiso/(15:0 iso + 17:0 iso).

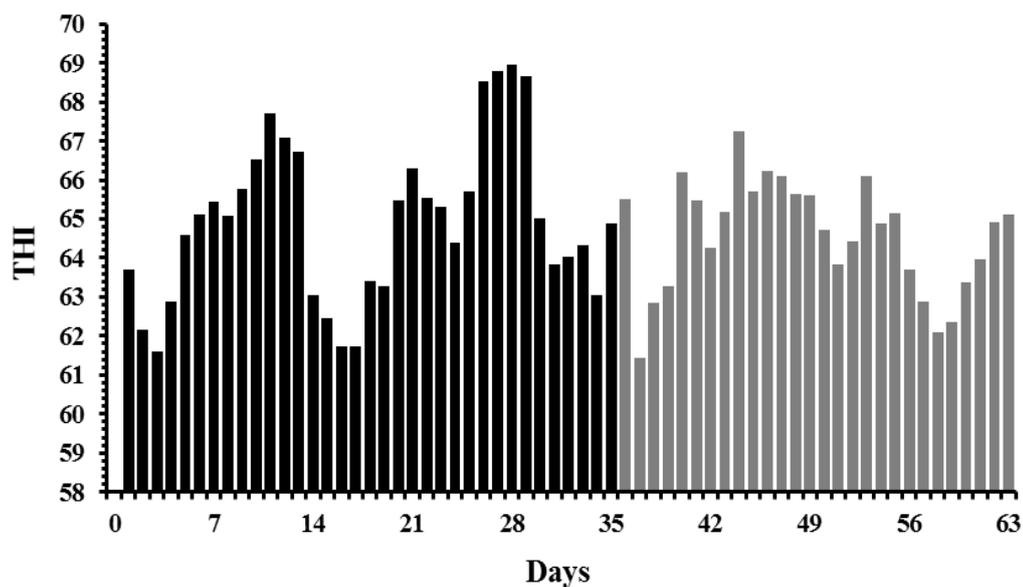


Figure 1. Daily means of the Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall. 3023 recordings at 30-min intervals. Temperature: 18.2 ± 4.8 °C. Humidity: $83.0 \pm 14.0\%$. THI: 64.8 ± 5.5 . THI ≥ 68 : 29.6% of time. THI ≥ 72 : 14.0% of time. Mean THI during days 1 to 35 (diet LOW): 64.9 ± 2.07 . Mean THI during days 36 to 63 (diet HIGH): 64.6 ± 1.43 .

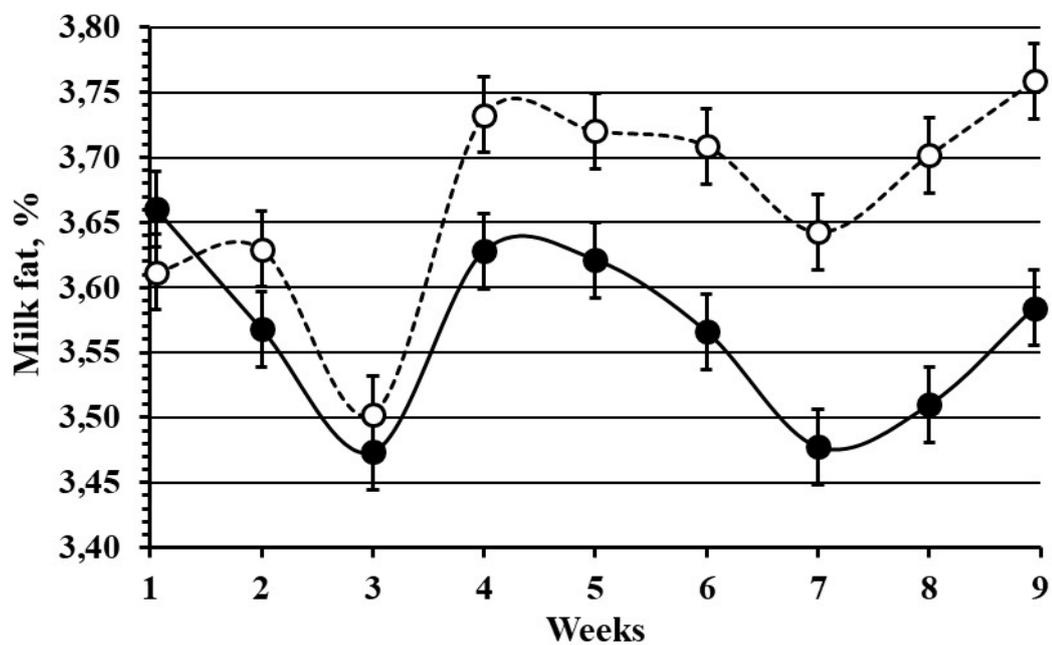


Figure 2. Milk fat concentration on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.06$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.08$ on wk 6, $P = 0.04$ on wk 7, $P = 0.03$ on wk 8, $P = 0.03$ on wk 9.

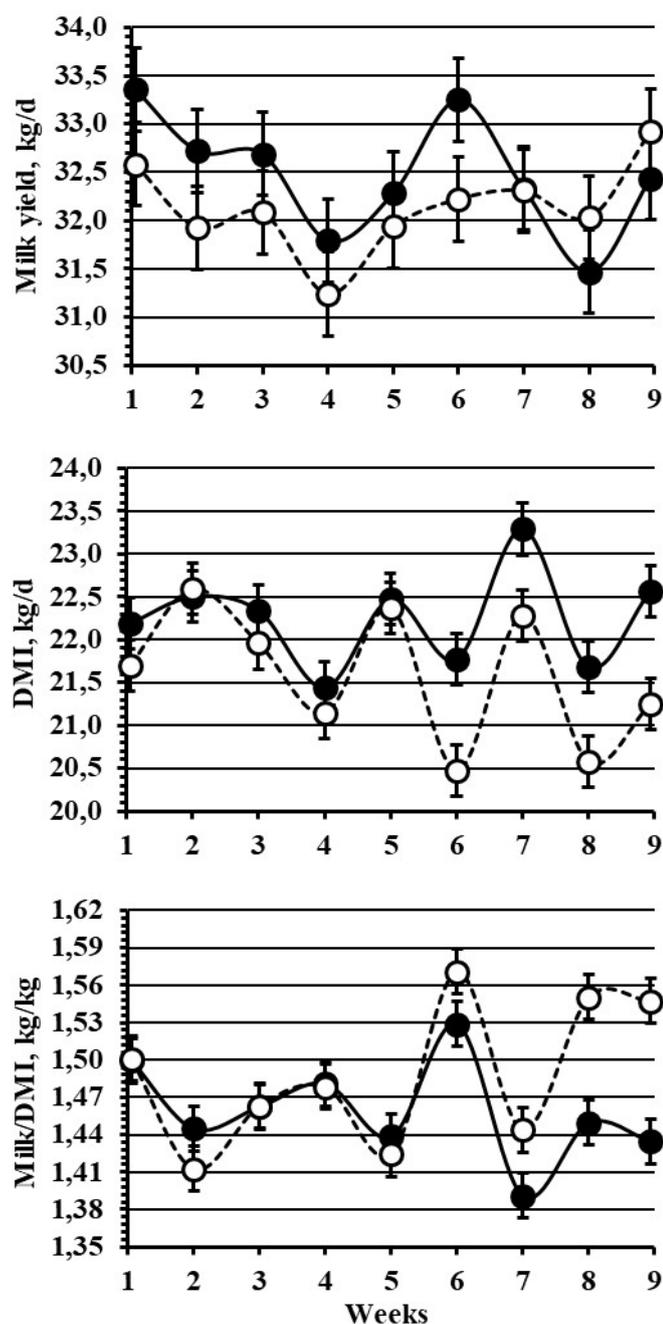


Figure 3. Milk yield, dry matter intake (DMI), and Milk/DMI on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. *P*-values for the interactions between treatment and week: 0.19 for Milk, 0.01 for DMI, < 0.01 for Milk/DMI. Slice option: *P* < 0.01 on wk 6, *P* < 0.01 on wk 7, *P* < 0.01 on wk 8, *P* < 0.01 on wk 9 for DMI. *P* = 0.08 on wk 7, *P* < 0.01 on wk 8, *P* < 0.01 on wk 9 for Milk/DMI.

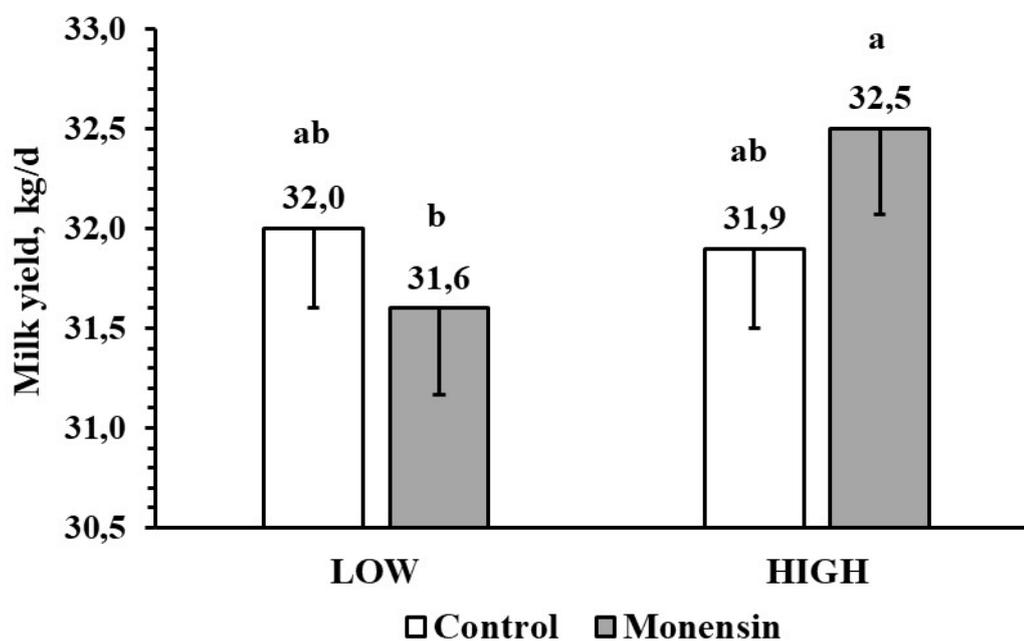


Figure 4. Milk yield of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). *P*-values: 0.93 for treatment, 0.17 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), 0.10 for the interaction between treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).

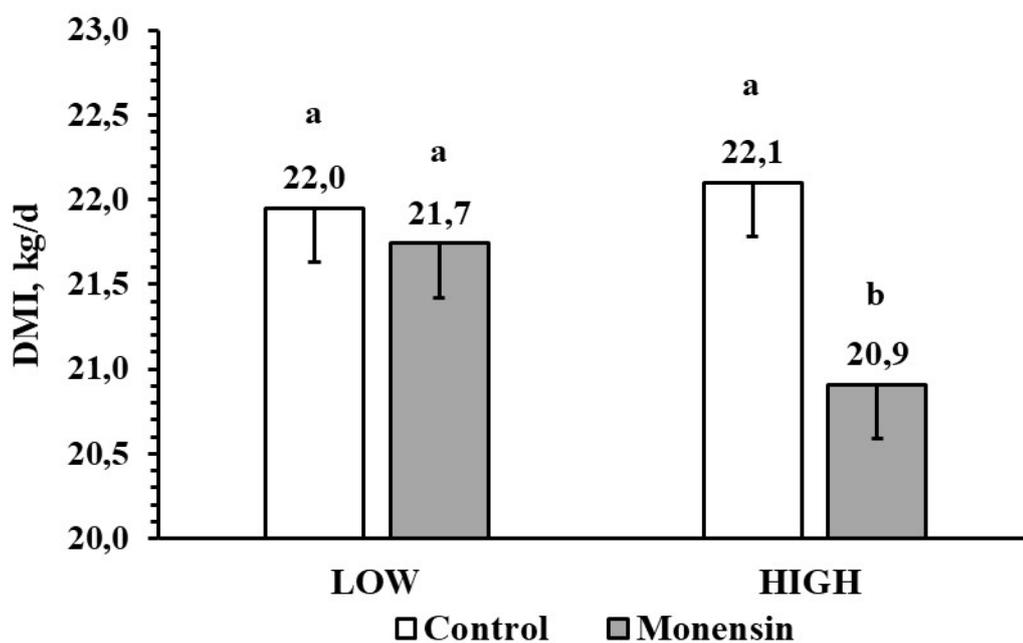


Figure 5. Dry matter intake (DMI) of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). *P*-values: 0.05 for treatment, 0.04 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), < 0.01 for the interaction between treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).

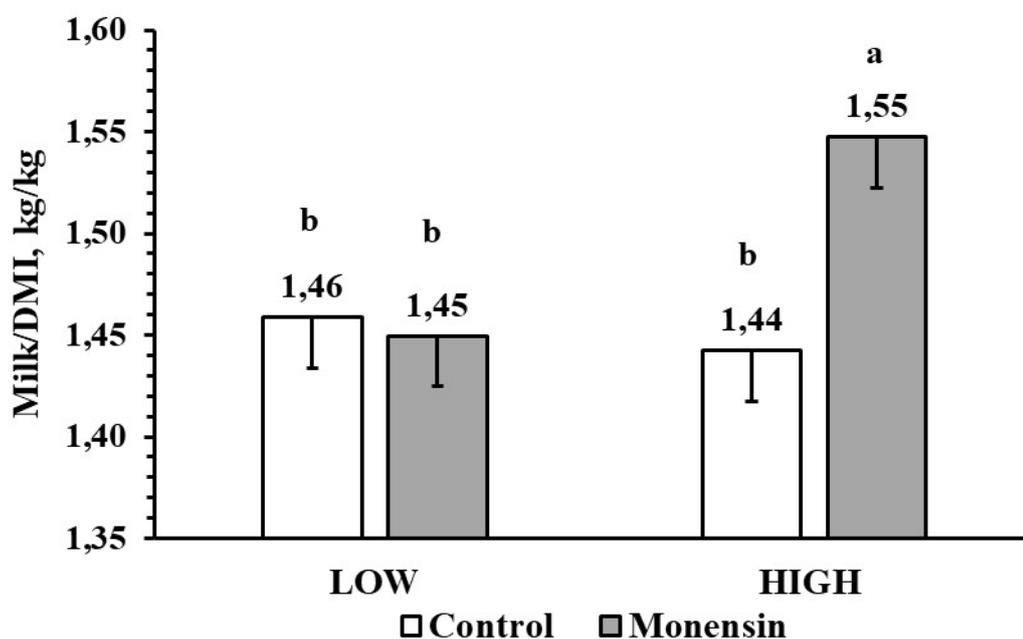


Figure 6. Feed efficiency defined by the ratio between milk yield and DMI of dairy cows on treatments Control and Monensin with the low acidogenic diet fed on weeks 4 and 5 (LOW) and with the high acidogenic diet fed on weeks 8 and 9 (HIGH). *P*-values: 0.09 for treatment, < 0.01 for diet (weeks 4 + 5 vs. 8 + 9), < 0.01 for the interaction between treatment and diet. Means with differing superscripts differ at $P \leq 0.05$ (a b).

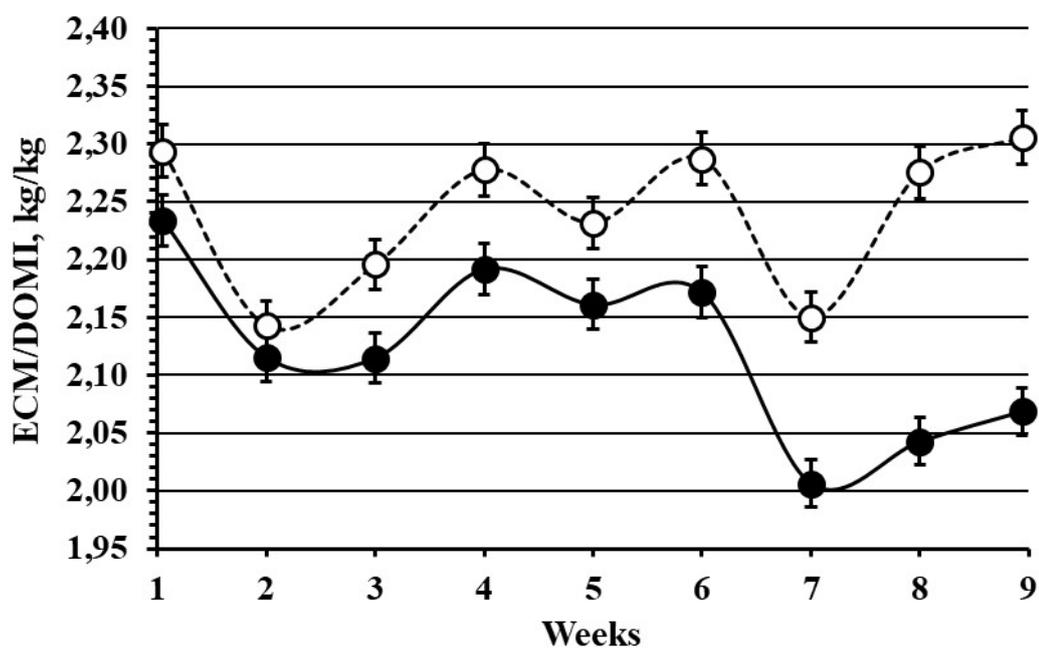


Figure 7. Ratio of ECM to digestible OM intake (DOMI) on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.04$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.08$ on wk 6, $P = 0.05$ on wk 7, $P = 0.01$ on wk 8, $P < 0.01$ on wk 9.

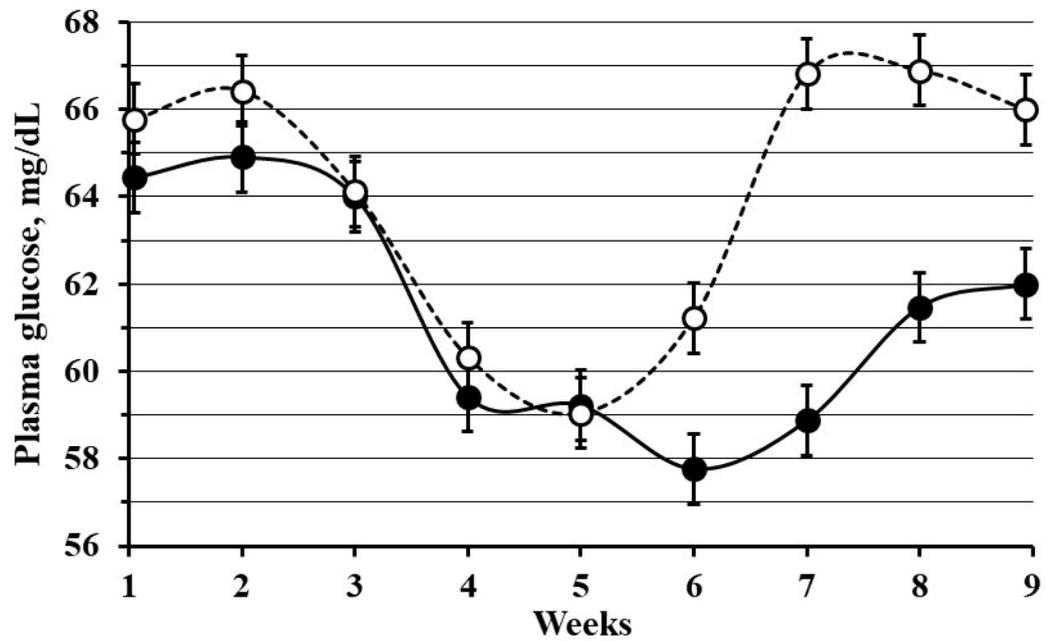


Figure 8. Plasma glucose concentration on treatments Control (●) or Monensin (○). A low acidogenic diet was fed during weeks 1 to 5 and a high acidogenic diet was fed during weeks 6 to 9. $P = 0.05$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.09$ on wk 6, $P < 0.01$ on wk 7, $P < 0.01$ on wk 8, $P = 0.05$ on wk 9.