

UNIVERSIDADE BRASIL
CAMPUS DESCALVADO

WEBERSON DONIZETH DE CASTRO AMANCIO

**INFLUÊNCIA DE FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO***

INFLUENCE OF DIFFERENT SOURCES OF VANADIUM ON *IN-VITRO*
RUMINAL FERMENTATION

Descalvado, SP
2020

WEBERSON DONIZETH DE CASTRO AMANCIO

INFLUÊNCIA DE FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO*

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Descalvado, SP

2020

A499i Amâncio, Weberson Donizeth de Castro
Influência de fontes de vanádio na fermentação ruminal
in vitro / Weberson Donizeth de Castro Amâncio. – Descal-
vado: Universidade Brasil, 2020.
48f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Bra-
sil, como complementação dos créditos necessários para
obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
Coorientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo

1. Complexo. 2. Microflora ruminal. 3. Produção de ga-
ses. 4. Quelato. I. Título.

CDD 636.0852



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2008, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://banco deteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "INFLUÊNCIA DE FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO"

Autor(es):

Discente: ~~Weberson Dorizeth~~ de Castro Amancio

Assinatura: _____

Orientador: Gabriel Maurício Peruca de Melo

Assinatura: _____

Data: 30/novembro/2020



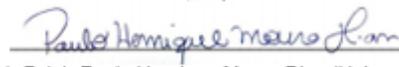
TERMO DE APROVAÇÃO

WEBERSON DONIZETH DE CASTRO AMANCIO

**“INFLUÊNCIA DE FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO
RUMINAL IN VITRO”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:


Prof(a). Dr(a) Gabriel Maurício Peruca de Melo (Presidente)


Prof(a). Dr(a). Paulo Henrique Moura Dias (Universidade Brasil)


Prof(a). Dr(a). Marcela Midori Yada de Almeida (Faculdade de Tecnologia de Taquaritinga)

Descalvado, 30 de novembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico

Primeiramente, a Deus, por sua paciência às minhas imperfeições, também a minha mãe, à tia Rute e ao tio Henrique (*in memoriam*).

E aos pequenos: Valtinho, Leo, Chico, Linda, a minha menininha Duda e meu menininho Noah.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, dona Lourdes, pela paciência e pelas orações, a minha tia Rute, pelos conselhos e ao Tio Henrique pelas conversas e por mostrar que conhecimento é essencial para a vida.

Aos meus amigos e companheiros Yuri, Bibi, William (Indiã), Cói, Juliana, Huallison, Vitoria, Peão, Gustavo pelas conversas acaloradas dos domingos à tarde.

Angélica, Rosine, Luciana, Mersso, Daniel e Pedro pelos vinhos e queijos das sextas à noite.

Ao meu orientador Professor Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo, pelos conselhos, extremos profissionalismo e paciência, à Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia no desenvolvimento do projeto.

Ao Professor Dr. Wanderley José de Melo por seus conselhos.

Aos Amigos Anderson, Carol, Hildene, Maycon e Fabiano.

Aos Professores do programa pelos conselhos, conversas e contribuições para nosso aprendizado.

A Juliana por ser sempre tão atenciosa e paciente.

A Universidade Brasil pelas oportunidades e pelos recursos disponibilizados.

E principalmente Deus.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

RESUMO

O papel do vanádio (V) no organismo de animais de produção é pouco conhecido. Os complexos de V vêm se tornando agentes farmacológicos muito promissores devido suas propriedades biológicas. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de fontes de V (complexo e inorgânica) e de suas concentrações, no meio de fermentação ruminal *in vitro*, sobre a cinética de produção de gases e degradação da matéria seca. O ensaio foi instalado no Laboratório de Nutrição Animal e Biogeoquímica da Universidade Brasil, campus de Descalvado/SP em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial 2x5x6, com 5 repetições por tratamento. O fator principal (Fator A) foi constituído por 2 tratamentos (V inorgânico e V complexo), o fator secundário (Fator B), por cinco concentrações no meio de incubação (0; 0,25; 0,50; 1,0; e 2,0 mg de V/L) e o fator terciário (Fator C) os tempos de incubação (3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). Nos tempos de incubação foi mensurada a produção de gases e a degradação da matéria seca (DIVMS). A inclusão do V complexo, nas concentrações avaliadas, promoveu menor produção de gases em relação ao tratamento sem inclusão de V. Na degradação *in vitro* da matéria seca, as fontes de V não diferiram entre si e não apresentaram interações significativas com as concentrações de V no meio de incubação e os tempos avaliados. Em 24h, os tratamentos com adição de V apresentaram maior DIVMS e, após 24 h, a dose de 1 mg/L apresentou a menor taxa de degradação quando comparado com o tratamento sem inclusão de V, os demais tratamentos não diferiram da testemunha. A fonte de vanádio complexo reduziu a produção de gases acumulada. Conclui-se que as fontes de V avaliadas comportam-se de modo semelhante na DIVMS, no entanto, a fonte complexada proporciona menor produção de gases *in vitro* sem comprometer a degradação da matéria seca com 72 horas de incubação.

Palavras-chave: complexo, microflora ruminal, produção de gases, quelato

INFLUENCE OF DIFFERENT SOURCES OF VANADIUM ON IN-VITRO RUMINAL FERMENTATION

ABSTRACT

The role of vanadium (V) in the organism of farm animals is poorly understood. V complexes have become very promising pharmacological agents due to their biological properties. The objective of the work was to evaluate the effects of organic and inorganic sources of V and its concentrations, in the medium of ruminal fermentation in vitro, on the gas production kinetics and dry matter degradation. The essay was installed at the Laboratory of Animal Nutrition and Biogeochemistry and the Microbiology Laboratory of the Universidade Brasil, campus Descalvado, SP in a completely randomized design, in a 2x5x6 factorial analysis scheme, with 5 replicates per treatment. The main factor (factor A) was consisted of 2 treatments (inorganic V and complex V), the secondary factor (factor B), by five concentrations in the incubation medium (0; 0.25; 0.50; 1.0; and 2.0 mg of V / L) and the tertiary factor (C) the incubation times (3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours). During incubation times, gas production and dry matter degradation (DIVMS) were measured. The inclusion of complexed V, in the concentrations evaluated, promoted less gas production compared to the treatment without the inclusion of V. In the in vitro degradation of dry matter, the sources of V do not differ from each other and did not present significant interactions with the concentrations of V in the incubation medium and the evaluated times. In 24h, treatments with the addition of V showed higher DIVMS and, after 24h, the dose of 1 mg / L showed the lowest rate of degradation when compared to the treatment without inclusion of V, the other treatments did not differ from the control. The source of complex vanadium reduced the accumulated gas production. It is concluded that the evaluated sources of V behave similarly in DIVMS, however, the complex source provides less gas production in vitro without compromising the dry matter degradation with 72 hours of incubation.

Keywords: complex, rumen microflora, gas production, chelate

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Leitura da pressão interna nos frascos em incubação em banho-maria com auxílio de manômetro digital.....26
- Figura 2.** Separação a vácuo do resíduo da fermentação das amostras nos frascos de incubação; em B, resíduo da fermentação in vitro no cadinho tipo Gooch para determinação da DIVMS e, em C, cadinhos na estufa para a secagem a 100° C-105°C.....27
- Figura 3** Cinética de produção de gases para os tratamentos com inclusão de vanádio, na forma de complexo ou inorgânico, em função dos tempos de incubação..30
- Figura 4** Produção de gases acumulada, expresso em mL/g MS, nos tempos de incubação de 48 e 72 horas.....31
- Figura 5** Cinética de degradação da matéria seca para o tratamento sem inclusão de vanádio.33
- Figura 6** Cinética de degradação da matéria seca para os tratamentos com inclusão de vanádio. Em (A) 0,25 mg.L-1 , (B) 0,5 mg.L-1 , (C) 1,0 mg.L-1 , (D) 2,0 mg.L-1 Vanádio no meio de incubação34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resumo da análise de variância para efeitos principais e suas interações dos resultados obtidos para a cinética de produção de gases. 28

Tabela 2 Produção de gases acumulada em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação. Valores expressos em mL por grama de matéria seca. 29

Tabela 3 Produção de gases acumulada em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação. Valores expressos em mL por grama de matéria seca. 32

Tabela 4 Degradação in vitro da matéria seca em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação, nos tempos de incubação. Valores de DIVMS encontram expressos em porcentagem da matéria seca. 35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TGI	Trato gastrointestinal
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
g/mol	Gramas por mol
°C	Graus celsius
nM	Nanomolar
µg / kg	Microgramas por quilo
ratos STZ	Estreptozotocina
<i>in vivo</i>	No organismo vivo.
<i>In vitro</i>	Fora do organismo vivo, em laboratório.
<i>In sito</i>	No local
V₂O₅	Pentóxido de vanádio
mg	Miligrama
NH₄VO₃	Vanadato de amônio
L/dia	Litros por dia
mL	Mililitro
PSI	Pound force per square inch
V	Vanádio
Fg	Fentograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Relevância do Tema.....	14
1.2 Fundamentação.....	15
1.2.1. Minerais orgânicos	15
1.2.2. Vanádio (V)	15
1.2.2.1 Toxicidade em humanos	19
1.2.2.2 Toxicidade em animais monogástricos.....	20
1.2.2.3 Toxicidade em ruminantes	20
1.2.3 Ambiente ruminal e microbiota ruminal	21
1.2.4 Cinética da produção de gases <i>in vitro</i>	23
1.3 Objetivos geral e específicos	24
1.3.1 Geral	24
1.3.2 Específicos.....	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. Local do experimento	25
2.2. Delineamento experimental e tratamentos	25
2.3. Procedimentos experimentais	25
2.4. Análise estatística	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Produção total de gases.....	28
3.2 Degradação <i>in vitro</i> da matéria seca	31
4 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	48
ANEXO 1- Protocolo de envio do projeto para avaliação pelo CEUA da universidade brasil.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do Tema

O avanço na produção de bovinos fez com que as exigências nutricionais aumentassem e novos microelementos minerais e formas de suplementação entrassem no cenário da produção (MORAES, 2001). Neste contexto, pode-se citar as respostas positivas obtidas pelo uso de minerais em complexos orgânicos na alimentação de ruminantes, como é o caso do cromo em complexo orgânico (ZANETTI et al., 2003).

Há disponibilidade limitada de dados sobre o uso da suplementação de minerais e suas formas, em animais (CONKLIN et al., 1982; OBERG et al. 1978; RHOADS e SANDERS, 1985; ROSHCHIN et al. 1980). Sobre o vanádio (V), estudos feitos em humanos, ratos, camundongos e cães mostraram que a atuação do V entre animais monogástricos e humanos é semelhante. Apesar disso, como acontece com qualquer substância particulada, as extrapolações nas taxas de absorção de animais para humanos ainda são difíceis (PATTERSON et al., 1986).

Apenas um conjunto de estudos cinéticos foi feito em ruminantes (ovinos). A partir desses estudos, parece que a cinética em ruminantes pode ser ligeiramente diferente da dos animais monogástricos devido à diferença na fisiologia e anatomia do rúmen em relação ao estômago verdadeiro. Absorção significativa de V ocorre a partir do trato gastrointestinal superior (TGI) de carneiros e as concentrações de vanádio na parede do TGI superior e inferior nestes animais foram, respectivamente, dez e cem vezes maiores do que no sangue (PATTERSON et al., 1986).

Muito pouco se sabe sobre os efeitos da exposição crônica às baixas doses de V em ruminantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em estudo *in vitro*, os efeitos de duas fontes de V (mineral e complexo orgânico) e de suas concentrações sobre a cinética de produção de gases e da degradação da matéria seca.

1.2 Fundamentação

1.2.1. Minerais orgânicos

Ao final da década de 1980, surgiram os ditos “minerais orgânicos” ou complexos, uma nova forma de suplemento mineral, que tinha como proposta aumentar a produtividade dos animais. Tais substâncias teriam como vantagens elevada absorção, maior biodisponibilidade e menor toxicidade, pois não haveria interação (antagonismos) entre elas e outros minerais ou nutrientes (gorduras e fibras da dieta). São compostos produzidos por quelação (ligação) entre metais e aminoácidos. São íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica, formando estruturas únicas de estabilidade e de alta biodisponibilidade para o mineral.

De fato, não parece haver dúvidas de que os “minerais orgânicos” têm biodisponibilidade maior que os minerais na forma inorgânica. Esses compostos apresentam a característica de serem bem menos tóxicos que os minerais na forma inorgânica. Desde que haja homogeneização correta e nível adequado do mineral no preparo da mistura mineral (PEIXOTO, 2006).

1.2.2. Vanádio (V)

O V foi descoberto em 1801, na cidade do México, pelo químico e mineralogista espanhol Don Andrés Manuel del Río (1764-1849). No entanto, o metal só foi isolado pela primeira vez em 1867 pelo químico inglês Henry Enfield Roscoe (1833-1915). Em 1925, os químicos americanos John Wesley Marden e Malcolm N. Rich obtiveram vanádio bastante puro (99,7%) pela redução do pentóxido de vanádio, V_2O_5 , com o cálcio (PEIXOTO, 2006).

O décimo nono elemento mais abundante da crosta terrestre, constituindo 0,015% da mesma, e o quinto mais abundante dos elementos de transição. O V é amplamente distribuído na natureza e o teor médio na crosta terrestre é de 100 a 150 mg/kg (FAULKER HUDSON, 1964; RICHIE, 1985; WATERS 1977). A prevalência de V excede a de metais conhecidos como cobre e chumbo (NRIAGU, 1998) e é igual à de zinco e estanho (BYERRIUM et al., 1974; WINDHOLZ, 1983; GRAYSON, 1983).

Os compostos de V existem em mais de 50 minérios diferentes em concentrações entre 10-4.100 mg/kg⁻¹ e em associação com combustíveis fósseis,

particularmente carvão (em concentrações entre 19-126 mg/kg em cinzas) e óleo bruto, em concentrações entre 3-257 mg/kg (NRIAGU, 1998).

A maior parte da produção de V vem como subprodutos e coprodutos na extração de outros elementos, como ferro, fósforo e urânio. Minérios a partir dos quais o V pode ser potencialmente recuperado são encontrados em muitas partes do mundo. Cerca de um terço dos recursos de V estão localizados na África e na América do Norte, e cerca de 24% são encontrados na Europa e <4% na Ásia e na América do Sul (NRIAGU, 1998).

O V possui número atômico 23 e peso atômico 50,942 g/mol. É um metal de transição do bloco d, cuja configuração eletrônica a partir do Ar é $4s^2 3d^3$. um ponto de fusão de 1890 °C e ferve a 3380 °C. Possui seis estados de oxidação (1^- , 0, 2^+ , 3^+ , 4^+ e 5^+), dos quais 3^+ , 4^+ e 5^+ são os mais comuns (TIAGO, 2000).

Ao examinar várias frutas, vegetais e plantas, Bertrand (1941) detectou vanádio em todas as 62 amostras estudadas. Ele descobriu que a concentração média nas plantas era superior a 1 mg/kg, as raízes geralmente contendo mais do que as sementes e folhas; os nódulos radiculares da maioria das leguminosas tinham cerca de 4 mg/kg, e ocasionalmente até 12 mg/kg. Os fungos continham menos, geralmente 0,5 ppm, mas excepcionalmente podiam chegar a até 112 mg/kg.

O vanádio é encontrado em altas concentrações em certos organismos marinhos, principalmente ascidianos e esguichos marinhos pertencentes aos da família dos tunicados. Essas criaturas acumulam o elemento no sangue, no intestino e em outros tecidos. Alguns cientistas acreditam que o vanádio possa funcionar como uma forma de transportador de oxigênio nesses animais, da mesma maneira que a eritrocruorina dos invertebrados, a clorocruorina, o pigmento verde do sangue de certos vermes anelídeos; hemeritina em vermes de espinafre; e a hemocianina em vários moluscos e artrópodes atua como transportadora de oxigênio. Ao contrário da hemoglobina e da hemovanadina, esses pigmentos não estão confinados às células sanguíneas, mas estão presentes no plasma como proteínas conjugadas, possuindo um metal incorporado na molécula (FAULKNER HUDSON, 1964; NRIAGU, 1998).

Essencial para alguns animais devido às suas atividades fisiológicas e bioquímicas, apresenta propriedades benéficas em concentrações muito baixas (1-10 nM), porém passa a ser tóxico quando em concentrações superiores. Estudos desenvolvidos nos anos 70 em ratos e frangos, confirmaram que o vanádio é um elemento essencial. Por meio de alimentação com quantidades menores de vanádio,

os animais apresentavam várias deficiências, tais como crescimento retardado, aumento dos níveis de colesterol no plasma, malformação óssea, entre outras (TIAGO, 2000).

O vanádio também é encontrado em uma ampla variedade de tecidos de animais vertebrados superiores, sendo essencial para alguns animais devido às suas atividades fisiológicas e bioquímicas, apresenta propriedades benéficas em concentrações muito baixas (1-10 nM), porém passa a ser tóxico quando em concentrações superiores. Puls (1989), apresenta um resumo dos níveis de vanádio encontrados em bovinos, ovinos, cães, porcos, galinhas e patos. As concentrações normais no fígado para bovinos são relatadas como 6-7 Fg / kg (peso úmido). Elas parecem ser muito mais baixas que as concentrações hepáticas relatadas para ovelhas (100-220 Fg / kg), cães (30-50 Fg / kg) e galinhas (18-38 Fg / kg), mas da mesma ordem que os patos (0,7 -2 Fg / kg). Estudos desenvolvidos nos anos 70 em ratos e frangos, confirmaram que o vanádio é um elemento essencial (TIAGO, 2000).

Com seu uso pode-se normalizar a concentração de glicose no sangue, e restaurar a função cardíaca e aumentar a lipogênese (YAMAZAKI, 2004). O papel do vanádio no organismo humano continua sendo ainda pouco conhecido. No entanto, ele é usado em muitas aplicações clínicas observando suas capacidades antioxidantes e insulinoimético (PEIXOTO, 2006).

Segundo Koch et al., 1956; Perry e Perry, 1959, várias pessoas procuraram vanádio nos tecidos humanos. Em um dos estudos mais rigorosos usando espectrografia de emissão, as amostras usadas foram colhidas em autópsia das vítimas de morte súbita, geralmente por trauma e algumas vezes por doenças cardiovasculares e outras. Os tecidos examinados foram aorta, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, próstata, baço e testículo, os quais pareciam macroscopicamente normais. Mas em uma porcentagem muito pequena de amostras, o vanádio pode ser encontrado no fígado, próstata e baço. Em cerca de 50% dos espécimes foi encontrado nos pulmões. Sendo que a concentração média nesses órgãos era geralmente inferior a 1 mg de V/ kg de material mineral, exceto no pulmão, que apresentava níveis de até 5 mg/ kg, (TIPTON,1960).

Segundo Puls (1989), o vanádio demonstrou ser um oligoelemento essencial para uma variedade de espécies animais. A sua deficiência está associada à formação alterada de glóbulos vermelhos e metabolismo do ferro, reprodução prejudicada, ao crescimento atrofiado, e alterações nos níveis de lipídios no sangue. Existe uma

crença entre os especialistas em saúde humana de que o metal pode desempenhar um papel semelhante nos seres humanos. Nos anos 80, foi relatado que o vanádio imitava os efeitos metabólicos da insulina nos adipócitos de ratos (LU et al., 2001).

Nos anos 90, descobriu-se que o vanádio age de maneira semelhante à insulina no músculo e no fígado. Estudos posteriores revelaram que a ação dos sais de vanádio é mediada por vias alternativas independentes do receptor de insulina. A investigação da potência antidiabética do vanádio logo se seguiu. O uso terapêutico do vanádio demonstrou normalizar os níveis de glicose no sangue em ratos STZ e curar diversos distúrbios relacionados à hiperglicemia. Os efeitos terapêuticos do vanádio foram então demonstrados em roedores diabéticos tipo II, que não respondem à insulina administrada (GOLDWASER et al., 2000).

O papel do vanádio no organismo humano continua sendo ainda pouco conhecido. No entanto, ele é usado em muitas aplicações clínicas observando suas capacidades antioxidantes e insulinomimético (PEIXOTO, 2006).

No ser humano, como por exemplo, atua na redução da biossíntese de colesterol e dos níveis de triglicerídeos no plasma; estimula o consumo de glicose, e a síntese de glicogênio que o faz mimetizar a insulina; até mesmo algumas evidências de que este elemento possa induzir a mineralização dos dentes e ossos em animais; apresenta um efeito positivo e negativo na força de contração do músculo cardiovascular, entre outros (TIAGO, 2000).

Os complexos de vanádio vêm se tornando agentes farmacológicos muito promissores devido suas propriedades biológicas. É um dos mais ativos elementos do ponto de vista de reações de oxirredução e forma complexos aniônicos, catiônicos e neutros na faixa de pH 2-8. Seus estados de oxidação são encontrados *in vivo*, V(+4) e V(+5), em equilíbrio e são reguladas pela disponibilidade do oxigênio, acidez e a presença de agentes redutores como: ascorbato, glutatona e catecolaminas (MIRANDA, 2010).

A superação da toxicidade do vanádio, no entanto, permaneceu o principal obstáculo no uso do vanádio como agente terapêutico. Além de normalizar a concentração de glicose no sangue, e restaurar a função cardíaca e aumentar a lipogênese (YAMAZAKI, 2004).

1.2.2.1 Toxicidade em humanos

O vanádio dietético não parece tóxico para o homem, pelo menos em níveis baixos normalmente encontrados em alimentos. A exposição de trabalhadores a pós de vanádio em escala industrial é um risco profissional bem reconhecido. A poeira do pentóxido de vanádio (V_2O_5) pode ser encontrada em ambientes ocupacionais, e sendo que a principal via de exposição para humanos é por inalação. Assim sendo acredita-se que as respostas à exposição industrial sejam agudas e não crônicas, envolvendo irritação dos olhos e sistema respiratório na forma de conjuntivite, broncoespasmo, bronquite e sintomas semelhantes à asma. Estimando-se que 25% dos compostos solúveis podem ser absorvidos pelos pulmões (WHO, 1987; LAUWERYS e HOET, 1993).

É relatado especificamente que o V_2O_5 é quase 100% absorvido pela inalação (LEWIS, 1995). Informações sobre os efeitos dos outros compostos de vanádio tem origem principalmente de estudos orais em animais, e a absorção pela via oral parece ser baixa (FRIBERG, 1979).

Outros sintomas de envenenamento descritos em humanos incluem fraqueza, náusea, vômito, anorexia, zumbido, dor de cabeça, tontura, descoloração verde da língua, palpitações, insuficiência coronária transitória, bradicardia com sístoles extras, dermatite, anemia, leucopenia, granulação e abaixamento de leucócitos, (FAULKNER HUDSON, 1964; HUNTER, 1975; FRIBERG, 1979; REILLY, 1991). Estudos recentes mostraram que existem correlações entre os níveis de vanádio na urina e déficits séricos e cognitivos. Quando as concentrações de vanádio estavam em torno de 14,2 $\mu\text{g/L}$ na urina, uma redução na habilidade neurocomportamental foi observada, principalmente habilidades viso espaciais e atenção (BARTH et. al., 2002).

Entretanto, os efeitos a longo prazo da exposição em humanos não parecem ter sido extensivamente estudados (ATDS, 1992).

Biomarcadores específicos para exposição ao vanádio incluem a presença de vanádio na urina (GYLSETH et al. 1979; KIVILUOTO et al. 1981; LEWIS, 1959; ORRIS et al. 1983; ZENZ et al. 1962) e uma verde descoloração da língua (LEWIS, 1959), a última resultante do acúmulo direto de pentóxido de vanádio.

1.2.2.2 Toxicidade em animais monogástricos

Animais monogástricos foram usados como modelos em uma quantidade considerável de trabalho realizados ao longo de anos. Isso começou em 1876, quando Priestley (1876) mostrou que as soluções de vanadato de sódio, quando fornecidas por várias vias, eram intensamente venenosas para o pombo, porquinho da índia, coelho, gato e cachorro (FAULKNER HUDSON, 1964).

Priestley relata que doses de 9,18-14 e 66 mg de V_2O_5 /kg poderiam levar a óbito um coelho quando injetado por via subcutânea. Era evidente nessas experiências que o vanádio tinha dois modos principais de ação; um efeito central no sistema nervoso, causando sonolência por convulsões, seguido por uma paralisia gradual da respiração e movimento; e, um efeito no trato gastrintestinal, causando dor abdominal, com diarreia e fezes com sangue. Tais observações originais foram depois confirmadas por outros pesquisadores (PULS, 1989).

Proescher, Seil e Stillians (1917) apud Faulkner Hudson (1964) usaram animais experimentais de grande e pequeno porte, incluindo os pássaros e peixes. O LD50 em ratos, injetado por via subcutânea com metavanadato de amônio, foi estimado com mais precisão em 22,7 mg V_2O_5 / kg. O cavalo e o coelho mostraram-se especialmente sensíveis ao vanádio, enquanto o rato e o camundongo se mostraram relativamente resistentes (MASSMANN, 1956).

Jackson (1911 e 1912) mostrou que o vanádio, se administrado por via intravenosa em cães, produz intensa vasoconstrição no baço, rim e intestino, com aumento associado da temperatura. Outros trabalhos mostraram, portanto, a depressão do centro respiratório, acentuada vasoconstrição das artérias viscerais e lesões inflamatórias no pulmão, rim e intestino. Todas as observações foram baseadas em exposição aguda ou subaguda, geralmente por meios iatrogênicos, ou seja, doença ou tratamento causado por erros médicos.

1.2.2.3 Toxicidade em ruminantes

Hansard et al. (1978, 1982a, 1982b) realizaram vários estudos utilizando ovelhas. Observaram que, em doses de 9,6 a 12 mg de V por kg de peso corporal, dadas em uma cápsula de gelatina uma hora após a alimentação, houve declínio na ingestão de

alimentos e diarreia. Hemorragia na mucosa extensiva do intestino delgado e hemorragias subcapsulares difusas dos rins foram detectadas na necropsia desses animais. No entanto, não foi demonstrada diferença na toxicidade entre metavanadato de amônio, ortovanadato de cálcio e pirovanadato de cálcio. Uma dose de 40 mg de NH_4VO_3 / kg de peso corporal em cápsulas de gelatina causou a morte em duas de três ovelhas, no tempo de 80 horas pós ingestão.

Realizado por Platonow e Abbey (1968), um dos primeiros estudos experimentais sobre intoxicação por vanádio em bovinos. Os pesquisadores usaram bezerros, sendo que geralmente são os animais referidos por outros pesquisadores quando é descrita a toxicidade do vanádio em bovinos. Os autores observaram sinais que incluíam diarreia, perda de apetite e falta de vontade de permanecer em pé. Não houve alteração no sangue, mas o exame após a morte revelou congestão hepática e pulmonar, petéquias difusas que cobriam o rim e o coração, pequenas úlceras no rúmen e inflamação hemorrágica no trato intestinal.

Segundo ter Heege et al. (1964), vacas que ingeriram fuligem de óleo combustível tiveram problemas de toxicidade. FRANK et al. (1990) relataram envenenamento agudo por vanádio de bovinos no norte da Suécia após o pastejo em pastagens fertilizadas com escória básica e seguiram esse trabalho em 1996 com um segundo artigo sobre evento que incluiu níveis de tecido em bovinos abatidos também em outras partes da Suécia (FRANK, et al. 1996). McCrindle et al. (2001) relataram intoxicação aguda por vanádio em bovinos pastejando ilegalmente em uma área onde ocorreu um derramamento de vanádio em uma mina sul-africana.

1.2.3 Ambiente ruminal e microbiota ruminal

A utilização de suplementos que possam auxiliar na manutenção do pH ruminal e manutenção dos microrganismos envolvidos é de vital importância para proporcionar um bom ambiente ruminal (ARCURI et al., 2006). Este ambiente é formado por uma série de microrganismos (bactérias, protozoários e fungos). Esses são responsáveis diretos pela digestão de partículas o que favorece a decomposição do alimento proporcionando uma melhora em diversos fatores ligados a produção animal (VIEIRA, 1986).

De acordo com Willians (1986), a dieta, provavelmente, é um dos fatores mais importantes para a concentração e a distribuição dos gêneros de protozoários existentes no rúmen.

Segundo Furlan, Macari e Faria Filho (2011), o ruminante é capaz de manter condições que promovam o crescimento dos microrganismos ruminais, favorecendo assim, a fermentação, como por exemplo, a manutenção da temperatura relativamente constante (39°C), devido principalmente aos mecanismos homeostáticos do animal, e em parte pelo calor gerado durante a fermentação realizada pelos microrganismos.

Os três tipos de microrganismos ativos no rúmen, representados pelas bactérias, protozoários e fungos, são as bactérias as que constituem a maior parte da microbiota presente no rúmen, em média 10^{10} células/mL, desempenhando um papel particularmente importante na degradação biológica de fibra vegetal, por serem quantitativamente mais representativas e as mais ativas fermentadoras (KOIKE e KOBIAISHI, 2009; KOZLOSKI, 2011).

Estes microrganismos estabelecem interações positivas e negativas entre si e são responsáveis pela fermentação do alimento e pela produção de ácidos graxos de cadeia curta. Os protozoários foram os primeiros microrganismos a serem descritos nesse ambiente e podem representar 2% de peso do conteúdo ruminal, 40% do nitrogênio total e 60% do produto da fermentação (KAMRA, 2005).

A população de protozoários no rúmen corresponde em 10^5 a 10^6 células/mL de líquido ruminal, sendo estritamente anaeróbicos e com predominância de protozoários ciliados. Estes por sua vez, possuem a capacidade de degradar e fermentar uma grande variedade de substratos, ingerindo partículas de alimento e atacando os principais constituintes das plantas, como celulose, hemicelulose, pectina, amido, açúcares solúveis e lipídios. Os protozoários exercem um papel benéfico para o hospedeiro, através da ingestão de partículas de alimentos e armazenam polissacarídeos de reserva, os quais controlam o nível de substrato disponível, proporcionando desta forma, uma fermentação mais uniforme (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988).

Pesquisas apontam que protozoários ruminais apresentam-se em maior população quando a dieta é constituída de proporções mistas de volumoso/concentrado. Quanto maior a proporção de concentrado, menor será sua concentração, devido à acidificação do meio. Os protozoários são importantes no meio

ruminal, pois fermentam carboidratos, usando amido e açúcares solúveis, evitando, assim, a rápida formação de ácido láctico, o que estabiliza a fermentação ruminal e dificulta o abaixamento do pH (JOUANY; USHIDA, 1990; USHIDA et al., 1990).

A importância desses protozoários ocorre na digestão de fibras. Enzimas produzidas por protozoários do rúmen constituem significativa porção das enzimas hidrolíticas no rúmen (AGARWAL et al., 1991). Em uma pesquisa, constatou-se que a menor atividade da carboximetilcelulase no rúmen de cordeiros defaunados contribuiu para a menor digestibilidade da celulose, indicando a relevância dos protozoários ciliados do rúmen na digestão das fibras (SANTRA e KARIM, 2002).

1.2.4 Cinética da produção de gases *in vitro*

A técnica de produção de gases (THEODOROU et al., 1994) é uma metodologia eficiente para estudar o valor nutritivo de alimentos por estimar os valores de digestibilidade aparente *in vivo* (MAURICIO et al., 1999). Segundo Pell e Schofield, 1993 a produção de gases é obtida então, por duas vias, a primeira sendo oriunda da degradação do alimento (via direta) e a segunda, oriunda da reação dos ácidos graxos de cadeia curta com o tampão (via indireta) presente no meio de incubação, Sendo assim, a produção de gases é indicativo da fermentação do alimento por microrganismos ruminais, e apresenta como produtos finais: energia para a manutenção e crescimento microbiano, ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e metano (THEODOROU et al., 1994). É uma metodologia que apresenta uma alta correlação com a digestibilidade e degradabilidade dos alimentos (BUENO et al., 1999), por isso é largamente utilizada.

Esta técnica baseia-se no princípio de degradação dos nutrientes pela população de microrganismos presentes no rúmen, permite simular o ambiente ruminal *in vitro*, medir o desaparecimento do alimento no decorrer do tempo e mensurar a produção de gases (BUENO, 2002). Sendo assim, trata-se de técnica bastante utilizada para avaliação de alimentos. Também, muitas vezes utilizada para avaliar efeitos que os alimentos possam ter na fermentação ruminal, degradabilidade da matéria orgânica e na produção de metano (ABDALLA et al., 2008).

Contudo, devido à precisão da técnica, pequenas variações podem gerar efeitos acumulativos sobre a produção de gases (ALVES, 2010). As principais

variações estão associadas à coleta e à amostragem dos microrganismos ruminal, podendo conduzir a erros de estimativa (MOULD et al., 2005). Dentre as fontes de variação também estão os equipamentos utilizados (LOPEZ et al., 1998), a espécie doadora do inóculo e a dieta do animal doador (CONE et al., 1996), o local da amostra do conteúdo ruminas no rúmen, ao horário de coleta e ao método de obtenção do conteúdo ruminal (RYMER et al., 2005) e, por fim, a preparação do inóculo ruminal (RYMER et al., 1999). As fístulas ruminais facilitam na obtenção de uma coleta mais homogênea, porém, necessita de animais com cirurgia (SALLES et al., 2003). Estas fontes ou variações podem ocasionar erros no experimento, ou diferença de resultados entre experimentos.

1.3 Objetivos geral e específicos

1.3.1 Geral

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de duas fontes de V (mineral e complexo) e de suas concentrações no meio de incubação *in vitro* sobre a cinética de produção de gases e de degradação da matéria seca.

1.3.2 Específicos

Especificadamente, os objetivos do trabalho foram:

- I. Determinar a interação dos fatores fontes de vanádio e das suas concentrações sobre a cinética de produção acumulada de gases;
- II. Determinar a interação dos fatores fontes de vanádio e das suas concentrações sobre a cinética de degradação da matéria seca;
- III. Determinar possíveis efeitos tóxicos das concentrações de vanádio no meio de incubação;
- IV. Determinar se a fonte complexada possui efeitos positivos na fermentação ruminal *in vitro* em comparação à fonte inorgânica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O ensaio experimental e as análises laboratoriais foram realizados no Laboratório de Nutrição Animal e Biogeoquímica e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, campus de Descalvado, SP.

2.2. Delineamento experimental e tratamentos

O ensaio foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial 2x5x6, com 5 repetições por tratamento. O fator (A) foi constituído por 2 tratamentos (V inorgânico (vanadato) e V complexo aminoácido, produto sintetizado pela empresa NewAgri®), o fator (B), por cinco concentrações no meio de incubação (0; 0,25; 0,50; 1,0; e 2,0 mg de V/L de líquido de fermentação) e o fator (C) os tempos de incubação (3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas).

2.3. Procedimentos experimentais

Foi realizado o ensaio de produção de gases *in vitro*, utilizando a técnica descrita por Theodorou et al. (1994), com transdutor de pressão. Para a obtenção do inóculo foram utilizados três bovinos machos castrados, da raça Nelore, canulados no rúmen, com peso vivo médio de 200 kg, mantidos em pastagem do gênero *Brachiaria*. O líquido ruminal foi retirado com a ajuda de bomba de sucção, introduzida na fístula ruminal e o material obtido (inóculo ruminal) foi condicionado em garrafas térmicas e conduzido para o laboratório para realização dos procedimentos experimentais.

Na incubação, para cada repetição foram incubados 1,0 g de substrato moído (constituído de 60% de concentrado, ração moída a base de milho e soja, e 40% de volumoso, silagem de milho desidratada moída) em um frasco de vidro com 160 mL

de capacidade, juntamente com 60 mL de inóculo diluído (12 mL de inóculo + 48 mL de solução tampão Menke) de acordo com Longo et al. (2006).

Uma vez colocados o inóculo ruminal e a amostra, os frascos de vidro foram fechados com tampas de borracha presas com anéis de alumínio, o conteúdo foi homogeneizado por agitação manual e, posteriormente, colocados em banho maria à temperatura de 39 °C.

Foi estimada a produção de gases *in vitro*, registrando-se a pressão no interior do frasco com manômetro digital (*Pressure Meter Delta OHM-HD 2124.1*) (Figura 1), nos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas.



Figura 1. Leitura da pressão interna nos frascos em incubação em banho-maria com auxílio de manômetro digital. Fonte: Arquivo pessoal

A transformação dos dados de leitura de pressão medida em polegada quadrada (PSI) para volume (mL) foi realizada através da equação ($R^2 = 0,999$):

$$Y = 0,2839 X1 \text{ (} Y \text{ é o volume de gases em ml; } X \text{ é a pressão em psi e } 0,2839 \text{ é o fator de conversão entre volume e pressão)}$$

Na avaliação da degradação *in vitro* da matéria seca, os frascos de cada tratamento, nos tempos de avaliação, tiveram seus conteúdos filtrados em cadinhos tipo Gooch (poros de 40 a 100 μm) previamente pesados, sendo o material retido (resíduo) lavado com água destilada quente (Figuras 2A e 2B). Em seguida, os cadinhos foram levados para estufa a 100°C - 105°C para determinação da DIVMS (Figura 2C).

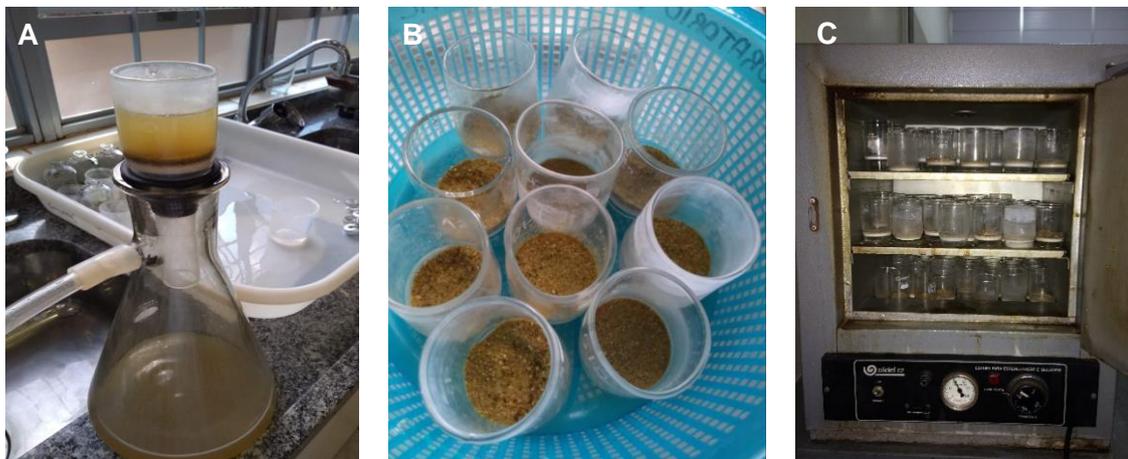


Figura 2. Em A, separação a vácuo do resíduo da fermentação das amostras nos frascos de incubação; em B, Resíduo da fermentação *in vitro* no cadinho tipo Gooch para determinação da DIVMS e, em C, cadinhos na estufa para a secagem a 100° C-105°C. Fonte: Arquivo pessoal

2.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade do erro e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. Quando a análise de variância foi significativa ($p < 0,01$) procedeu-se a comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e por análise de regressão polinomial para o desdobramento das interações entre os efeitos principais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção total de gases

Na Tabela 1, encontra-se o resumo da análise de variância dos dados de cinética de produção de gases para os efeitos principais (fontes de vanádio, concentrações do elemento e tempos de incubação) e de suas interações.

O teste F foi significativo para a interação entre os três fatores ($p < 0,01$) indicando que os fatores agem de forma dependente. Neste contexto, iremos desdobrar e discutir as interações duplas significativas.

As interações fontes de vanádio (V) e concentração (C), fontes de vanádio (V) e tempo de incubação (T) e, concentração de vanádio (C) e tempo de incubação (T) foram significativas ($p < 0,01$) e serão discutidas em sequência.

Tabela 1 Resumo da análise de variância para efeitos principais e suas interações dos resultados obtidos para a cinética de produção de gases.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F		P
Fontes de vanádio (V) ¹	1	149,16	**	<0,0001
Concentrações (C) ²	4	6,95	**	<0,0001
Tempos de incubação (T) ³	5	3157,14	**	<0,0001
Interação (V)*(C)	4	15,98	**	<0,0001
Interação (V)*(T)	5	22,28	**	<0,0001
Interação (C)*(T)	20	2,34	**	0,0025
Interação (V)*(C)*(T)	20	2,73	**	0,0004
CV (%) = 5,19				

¹ Fontes de vanádio (inorgânico e orgânico)

² Concentrações de vanádio no meio de incubação (0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ no meio de incubação)

³ Tempos de incubação (3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas)

Na Tabela 2, encontram-se os dados obtidos para o desdobramento da interação fontes de vanádio (V) e concentração do elemento no meio de incubação (C). Com exceção do tratamento sem inclusão das fontes de vanádio (testemunha), para as demais concentrações avaliadas pode-se observar que a utilização do vanádio na forma de complexo (orgânico) promoveu menor produção de gases por gramas de matéria seca em comparação a fonte de vanádio inorgânico.

No tratamento com inclusão de vanádio inorgânico pode-se observar maior produção de gases na concentração de 0,5 mg de V/L de meio de incubação, sendo superior aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Demais doses não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Com a inclusão do vanádio complexo, observou-se menor produção de gases em relação ao tratamento testemunha ($p > 0,05$).

Tabela 2 Produção de gases acumulada em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação. Valores expressos em mL por grama de matéria seca.

Vanádio (mg/L)	Concentração de vanádio (mg/L)									
	0		0,25		0,50		1,00		2,00	
Inorgânico	57,18	Ab	55,81	Ab	63,98	Aa	57,59	Ab	57,04	Ab
Complexo	57,02	Aa	45,16	Bb	42,90	Bb	47,19	Bb	48,04	Bb

Letras maiúsculas comparam médias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), na coluna e, minúsculas na linha.

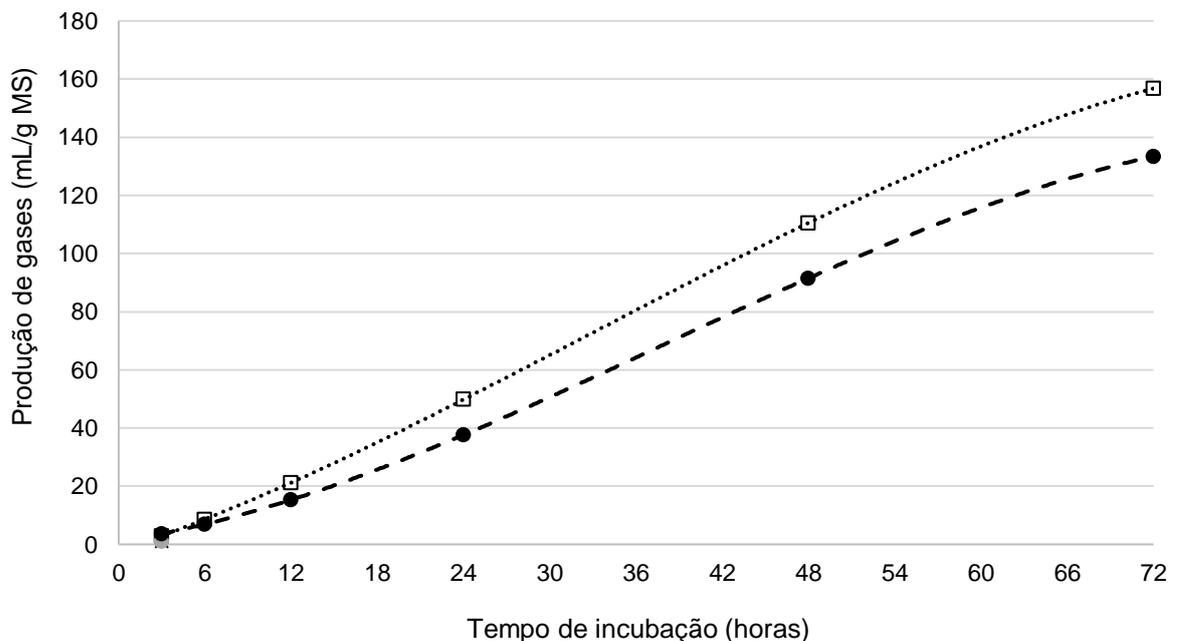
Técnicas de fermentação *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para avaliar o efeito de dietas ou aditivos na fermentação ruminal (DURMIC et al., 2010). Essas técnicas permitem o controle das condições experimentais de forma mais precisa do que os experimentos *in vivo* (MAKKAR, 2004) e podem, portanto, ser utilizadas para a triagem e informar sobre a adequação de outros estudos *in vivo* (YÁÑEZ-RUIZ et al., 2016). Com as técnicas de fermentação *in vitro*, pode-se avaliar como os suplementos (por exemplo, os minerais) afetam a fermentação, a produção de gases e a microbiota em diferentes circunstâncias, podendo-se ser avaliados simultaneamente.

De acordo com Durand e Kawashima (1980), os minerais, principalmente o Zn, Mn, Cu e Co, que são os mais estudados, são necessários para proteínas estruturais, enzimas, coenzimas e proteínas celulares e participam de muitos processos enzimáticos no rúmen, o que produz mudanças no ambiente ruminal, afetando a produção de AGV, a digestibilidade da fibra e a digestão da ração, e também, podem modificar as populações microbianas e as vias metabólicas no rúmen.

Cao et al. (2000) ressaltam que os microrganismos podem usar formas solúveis e insolúveis de elementos no rúmen para o metabolismo bacteriano, sendo ainda, necessário determinar as funções específicas da suplementação de elementos traços no ambiente ruminal e como elas afetam as vias metabólicas microbianas.

De modo geral, Pino e Heinrichs (2016) indicam que informações limitadas estão disponíveis sobre o efeito da suplementação de elementos traços e micro minerais sobre os microrganismos ruminais; sendo que mais pesquisas são necessárias para avaliar e compreender como esses microrganismos usam os elementos minerais e como eles são importantes para a fermentação ruminal.

Na Figura 3, encontram-se as curvas de regressão polinomial do desdobramento da interação fontes de vanádio (V) e tempo de incubação (C). A partir do tempo de incubação de 12 horas, os valores começam a diferir significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$), permanecendo este comportamento até as 72 horas.



$$(\square) \text{ Inorgânico} = -2,35 + 1,67 \cdot x - 0,027 \cdot x^2 + 0,00027x^3 \quad R^2 = 0,9996$$

$$(\bullet) \text{ Complexo} = 1,03 + 0,75 \cdot x - 0,040 \cdot x^2 + 0,00035x^3 \quad R^2 = 0,9998$$

Figura 3. Cinética de produção de gases para os tratamentos com inclusão de vanádio, na forma de complexo ou inorgânico, em função dos tempos de incubação.

As concentrações de vanádio não promoveram alterações significativas na produção de gases nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas (Figura 4). No tempo de 48 horas a menor dose de vanádio (0,25 mg/L) promoveu redução na produção de gases em comparação a testemunha ($p < 0,05$) e, no tempo de 72 horas, as doses de vanádio avaliadas apresentaram reduções significativas na produção de gases em

comparação a testemunha ($p < 0,05$), no entanto, a menor concentração de vanádio (0,25 mg/L) foi a que apresentou a menor produção de gases não diferindo das doses de 1,0 e 2,0 mg /L.

Optou-se por não inserir os dados da análise de regressão polinomial em função do baixo coeficiente de determinação, 0,5545 e 0,5572, para os tempos de 48 e 72 horas respectivamente.

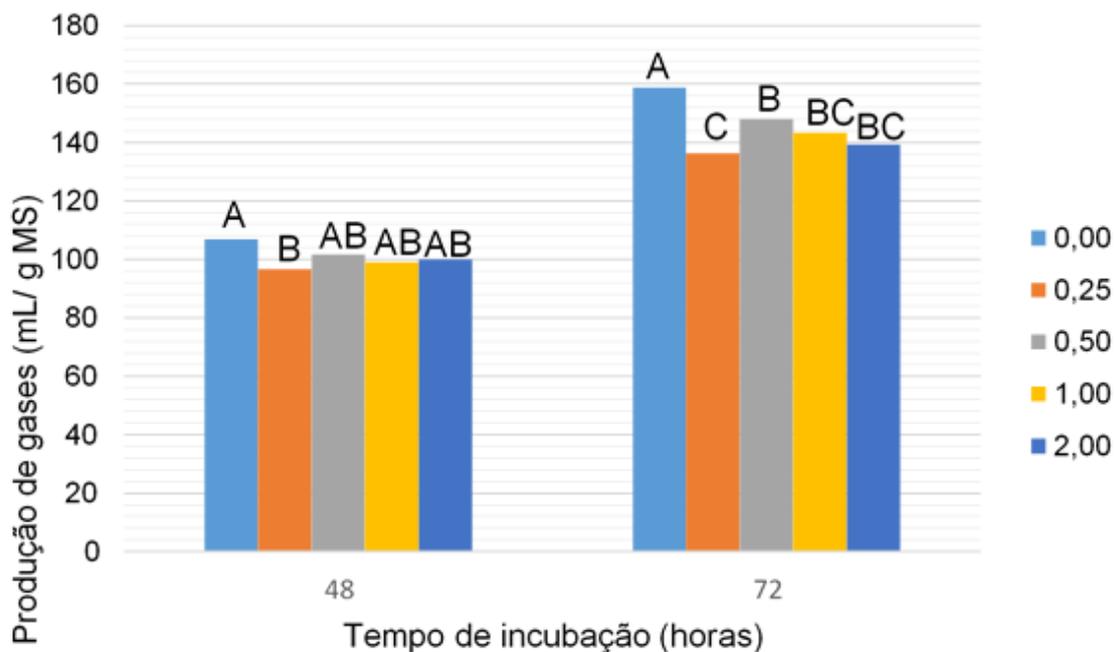


Figura 4. Produção de gases acumulada, expresso em mL/g MS, nos tempos de incubação de 48 e 72 horas. Letras maiúsculas comparam médias pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade, no tempo de incubação.

3.2 Degradação *in vitro* da matéria seca

Na Tabela 3, encontra-se o resumo da análise de variância da degradação de matéria seca para os efeitos principais (fontes de vanádio, concentrações do elemento e tempos de incubação) e de suas interações.

As fontes de vanádio avaliadas, orgânico e inorgânico, não diferem entre si ($p > 0,05$) e não apresentaram interações significativas com as concentrações de vanádio no meio de incubação e os tempos avaliados.

Houve efeito significativo ($p < 0,001$) da interação entre concentrações avaliadas e os tempos de incubação, indicando que estes fatores agem de forma dependente. Os dados do desdobramento da interação foram analisados através de regressão polinomial e, os gráficos que demonstram a cinética de degradação *in vitro* da matéria seca em função dos tempos de incubação podem ser observados nas Figuras 5 e 6 (A, B, C e D). Demais interações não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$).

Tabela 3 Produção de gases acumulada em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação. Valores expressos em mL por grama de matéria seca.

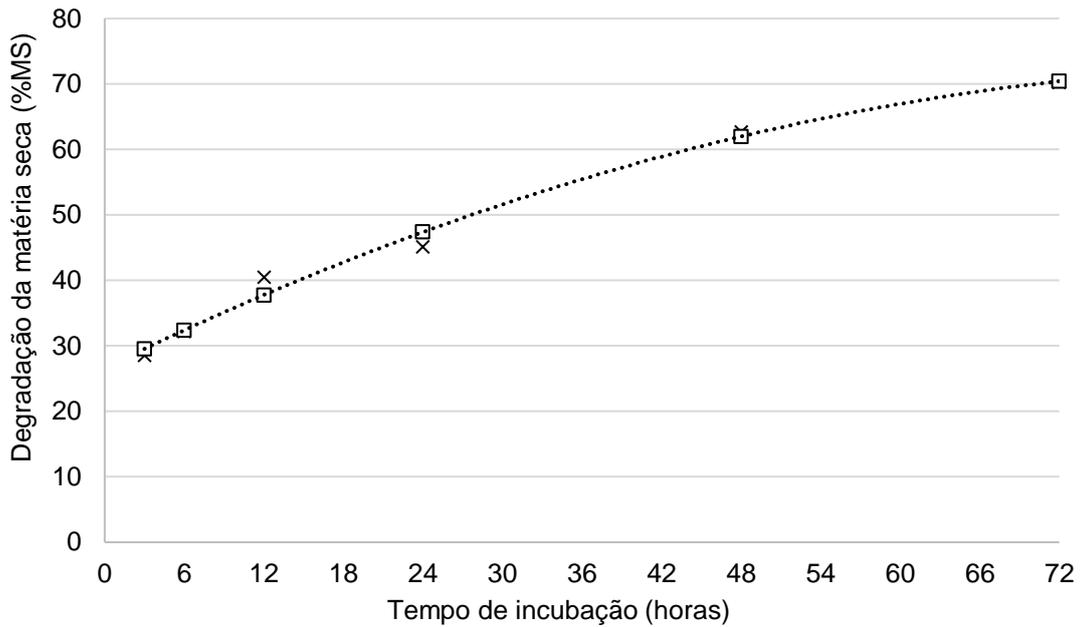
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F		P
Fontes de vanádio (V) ¹	1	2,09	NS	0,1510
Concentrações (C) ²	4	2,63	*	0,0378
Tempos de incubação (T) ³	5	2063,36	**	0,0001
Interação (V)*(C)	4	0,96	NS	0,4348
Interação (V)*(T)	5	0,83	NS	0,5303
Interação (C)*(T)	20	4,28	**	0,0001
Interação (V)*(C)*(T)	20	0,94	NS	0,5432
CV (%) = 5,19				

¹ Fontes de vanádio (inorgânico e orgânico)

² Concentrações de vanádio no meio de incubação (0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ no meio de incubação)

³ Tempos de incubação (3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas)

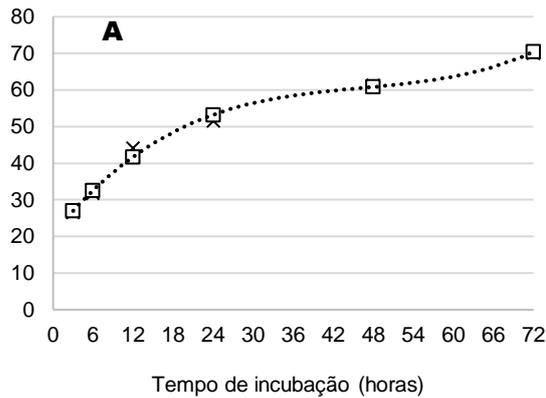
Na Figura 5 é possível observar o que o tratamento sem a inclusão de vanádio apresentou análise de regressão polinomial significativa ($p < 0,0001$) para equação de segundo grau. No tempo de incubação de 72 horas o gráfico demonstra a tendência de estabilização de degradação *in vitro* da matéria seca.



$$\text{DIVMS} = 26,60 + 0,99 \cdot X - 0,05 \cdot X^2 \quad R^2 = 0,9897 \quad F = <0,0001^{**}$$

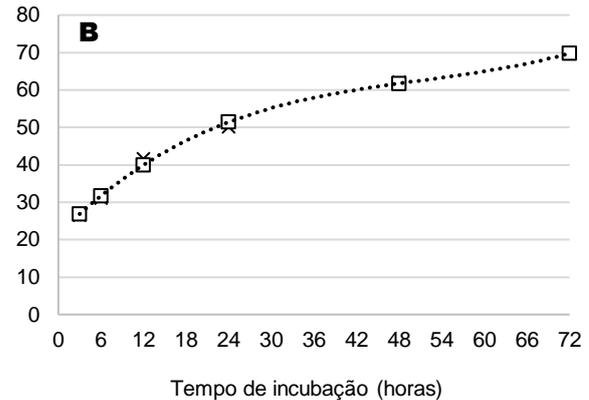
Figura 3. Cinética de degradação da matéria seca para o tratamento sem inclusão de vanádio. (X) Valores observados e (□) valores preditos pelo modelo.

Com a inclusão de vanádio no meio de incubação é possível observar que, diferentemente do tratamento sem inclusão de vanádio, no tempo de incubação de 72 horas existe uma tendência de aumento na degradação *in vitro* da matéria seca, não configurando o início de um patamar de estabilização da degradação (Figura 6 A, B, C e D). Neste contexto, independentemente da concentração de vanádio no meio de incubação, a análise de regressão polinomial obtida foi significativa para regressão polinomial cúbica, sendo possível observar pequenas alterações nos parâmetros da equação em função da concentração de vanádio do meio de incubação.



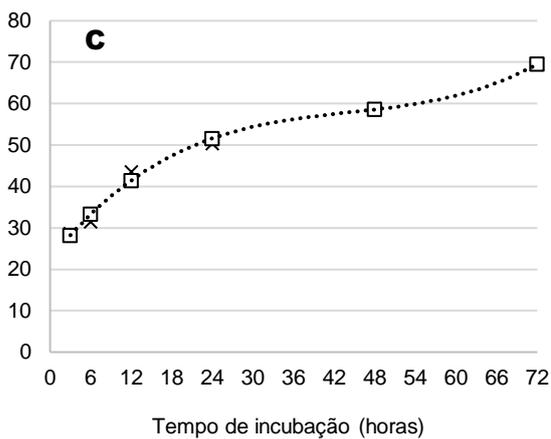
$$\text{DIVMS} = 26,63 + 2,25 \cdot X - 0,04 \cdot X^2 + 0,0003 X^3$$

$$R^2 = 0,9928 \quad F = < 0,0001^{**}$$



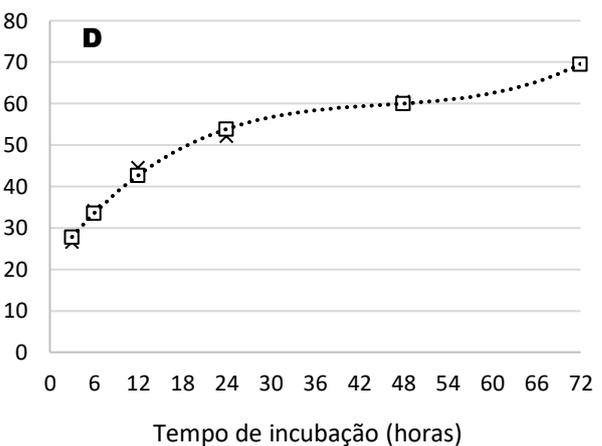
$$\text{DIVMS} = 21,45 + 1,89 \cdot X - 0,031 \cdot X^2 + 0,0002 X^3$$

$$R^2 = 0,9966 \quad F = < 0,0001^{**}$$



$$\text{DIVMS} = 22,47 + 2,03 \cdot X - 0,041 \cdot X^2 + 0,0003 X^3$$

$$R^2 = 0,9923 \quad F = < 0,0001^{**}$$



$$\text{DIVMS} = 21,27 + 2,32 \cdot X - 0,048 \cdot X^2 + 0,00035 X^3$$

$$R^2 = 0,9934 \quad F = < 0,0001^{**}$$

Figura 4 Cinética de degradação da matéria seca para os tratamentos com inclusão de vanádio. (X) Valores observados e (□) valores preditos pelo modelo. Em (A) 0,25 mg.L⁻¹, (B) 0,5 mg.L⁻¹, (C) 1,0 mg.L⁻¹, (D) 2,0 mg.L⁻¹ Vanádio no meio de incubação

Nos tempos de incubação de 6 e 12 horas não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da concentração de vanádio sobre a DIVMS. Com 12 horas de incubação, as doses de 0,25 e 2 mg/L promoveram uma maior degradação matéria seca quando comparado com a testemunha. Decorrido 24 horas do início de incubação, todos os tratamentos com adição de vanádio apresentaram maior degradação da matéria seca. Decorridos 48 horas de incubação, a dose de 1 mg/L de meio incubação apresentou uma menor taxa de degradação quando comparado com o tratamento sem inclusão de vanádio, os demais tratamentos não diferiram da testemunha (sem adição de vanádio) (Tabela 4).

Ao final do período de avaliação experimental não houve diferença significativa nas taxas de degradação da matéria seca ($p>0,05$).

Tabela 4 Degradação *in vitro* da matéria seca em função da concentração de vanádio adicionado ao meio de incubação, nos tempos de incubação. Valores de DIVMS encontram expressos em porcentagem da matéria seca.

Vanádio (mg/L)	Tempo de incubação (horas)					
	3	6	12	24	48	72
0	25,55	32,25	40,54 B	45,13 B	62,72 A	70,27
0,25	26,62	31,79	44,21 A	51,53 A	61,33 AB	67,97
0,50	26,60	31,16	41,67 AB	50,20 A	62,10 A	69,73
1,00	28,68	31,51	43,63 AB	50,43 A	58,89 B	69,50
2,00	26,59	34,17	44,57 A	52,16 A	60,58 AB	69,48

Letras maiúsculas comparam médias, pelo teste de Tukey ($p<0,05$), dentro de cada tempo de incubação avaliado.

Outros experimentos realizados avaliaram o efeito da suplementação de vanádio *in vivo* e demonstraram que essa suplementação, não influenciou a digestibilidade dos nutrientes. Singh et al. (2020) examinaram o efeito da suplementação dietética de vanádio sobre o consumo de ração, eficiência de utilização de nutrientes, desempenho de crescimento, constituintes bioquímicos do sangue e estado endócrino em bezerros da raça Sahiwal machos (peso = $71 \pm 8,06$ kg) e idade ($6 \pm 0,82$ meses) e distribuíram cinco animais em tratamentos com a administração de dois, quatro e oito ppm de vanádio/ kg MS, durante 120 dias. Observaram, dentre outras respostas, que a suplementação alimentar de vanádio não afetou o consumo de ração, digestibilidade dos nutrientes, ganho médio diário e eficiência alimentar.

Kumar et al. (2017), suplementaram com vanádio, quatro grupos experimentais com seis bezerros da raça Karan Fries, de 6 meses de idade. O período experimental foi de 165 dias e os tratamentos foram a suplementação de três, seis e nove ppm/ kg MS. Segundo os autores, a suplementação de vanádio não teve efeito significativo sobre o consumo de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e nutrientes digestíveis totais (NDT), tão como sobre a digestibilidade de PB, extrato etéreo (EE), fibra em

detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). Concluiu-se que a suplementação de vanádio até o nível de 9 ppm não influenciou a taxa de crescimento e a digestibilidade dos nutrientes em bezerros machos da raça Karan.

Cabras em lactação foram suplementadas com dois, quatro e seis ppm de V inorgânico/kg de MS, durante período experimental de 150 dias. Os autores ressaltaram que a digestibilidade dos nutrientes permaneceu semelhante entre cabras alimentadas com dietas basais ou suplementadas com V. Demonstraram, também, que a suplementação com V não alterou o consumo de matéria seca (CMS), a produção e a composição do leite durante o período experimental. Concluiu-se que os resultados dos presentes achados indicaram que, até o nível de suplementação com seis ppm, o V inorgânico da dieta não afetou a produção e o perfil mineral do leite e do plasma (TRIPATHI; MANI; PAL, 2019).

4 CONCLUSÕES

As doses de vanádio avaliadas apresentaram-se seguras e podem nortear novas pesquisas com relação aos níveis ruminais, dados estes não encontrados atualmente na literatura.

A inclusão de vanádio no meio de incubação, independente da forma, promoveu alterações na cinética de degradação da matéria seca em relação a testemunha, no entanto, não alterou a degradação potencial observada em 72 horas.

A inclusão de vanádio na forma de complexo reduziu a produção de gases acumulada, no entanto, não foi observada redução na degradação da matéria seca o que pode indicar uma melhor eficiência no processo fermentativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A.L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, Suplemento especial, p.260-268, 2008.

AGARWAL, N.; KEWALRAMANI, N.; KAMRA, D.N. et al. Hydrolytic enzymes of buffalo rumen: comparison of cell free rumen fluid, bacterial and protozoal fractions. *Buffalo Journal*, v.7, p.203-207, 1991.

ALCALDE, C. R. et al. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. *Acta Scientiarum - Animal Science*, v. 23, n. 4, p. 917–921, 2001.

ALVES T.C. Desenvolvimento ponderal, características da carcaça e eficiência da nutrição energética e proteica no metabolismo ruminal de búfalos e produção de gases *in vitro*. 2010. 146 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) *Nutrição dos ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-140.

ATSD, 1992, Toxicological Profile For Vanadium. US Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, TP-91/29.

BARTH, A., SCHAFFER, A.W., KONNARIS, C., BLAUENSTEINER, R., WINKER, R., OSTERODE, W., RUDIGER, H.W., 2002. Neurobehavioral effects of vanadium. *Journal of toxicology and environmental health-part a*, v.65, n.9, p.677-683, 2002.

BERTRAND, D., 1941. Recherches sur le vanadium chez les végétaux. *Bull. Soc. Chim. Boil.*, 23: 467. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

BLÜMMEL, M., MAKKAR, H.P.S. AND BECKER, K. *In vitro* gas production: a

technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.77, p.24-34, 1997.

BUENO, I.C.S. Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas. Piracicaba, 2002. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.

BUENO, I.C.S. et al. Uso de líquido ruminal e fezes de bovinos e ovinos como fonte de inóculo para a técnica in vitro de produção de gás. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 36, 1999. Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBZ, 1999, p. 122.

BYERRIUM et al., 1974; BYERRUM, R.U., ECKARDT, R.E., HOPKINS, L.L., et. al., 1974. Vanadium. Washington, D.C.: National Academy of Sciences.

CAO, J., P. R. HENRY, R. GUO, R. A. HOLWERDA, J. P. TOTH, R. C. LITTELL, R. D. MILES, AND C. B. AMMERMAN. 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science*, v.78, p.2039–2054, 2000.

CHANG, X.; MOWAT, D.N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 2, p. 559-565, 1992.

CHANG, X.; MOWAT, D.N.; MALLARD, B.A. Supplemental organic and inorganic chromium with niacin for stressed feeder calves. *Journal of Animal Science*, v. 72 (S.1), p. 132, 1994.

CONE, J. W.; VAN GELDER A. H.; & MARVIN, H. J. P. (1996). Influence of drying method on chemical and physical properties and in-vitro degradation characteristics of grass and maize. *Annual Zootechnology*, v.44(Suppl.), p.174, 1996.

CONKLIN, A.W., SKINNER, C.S., FELTEN, T.L, et. al., 1982. Clearance and distribution of intratracheally instilled vanadium. *Clinical Toxicology*, v.16, p.541-548, 1982.

CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1977. CRC Press, Cleveland, Ohio.

DURMIC, Z.; HUTTON, P.; REVELL, D.K.; EMMS, J.; HUGHES, S.; VERCOE, P.E. In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, v.160, p.98–109, 2010.

FAULKER HUDSON, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York

FRANK, A., KRISTIANSOON, L., PETERSSON, F.K., 1990. Vanadinförgiftning hos nötkreatur - Första kända fallet i Sverige. *Svensk Veterinartidning*, v.42, p. 447-451, 1990.

FRANK, A., MADEJ, A., GALGAN, V., PETERSSON, L.R. Vanadium poisoning of cattle with basic slag. Concentrations in tissues from poisoned animals and from a reference, slaughter-house material. *The Science of the Total Environment*, v.181, p.73-92, 1996.

FRIBERG, L., NORDBERG, G.F., VOUK, V.B. (Editors), 1979. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). *Nutrição de ruminantes*. 2a. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 1 – 25.

GOLDWASER, I., GEFEL, D., GERSHONOV, E., FRIDKIN, M., SHECHTER, Y., 2000. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 80, p. 21-25.

GRAYSON, M. 1983. *Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology*. Vol 23, 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 688-704.

GYLSETH, B., LEIRA, H.L., STEINESS, E., *et. al.*, 1979. Vanadium in blood and Urine of workers in a ferroalloy plant. *Scandinavian Journal of Work Environmental Health*, v. 5, p.188-194, 1979.

HANSARD, S.L., AMMERMAN, C.B. & HENRY, P.R. Vanadium metabolism in sheep. II. Effect of dietary vanadium on performance, vanadium excretion and bone deposition in sheep. *Journal of Animal Science*, v.55, p. 350-356, 1982b.

HANSARD, S.L., AMMERMAN, C.B., FICK, K.R., & MILLER, S.M., Performance and vanadium content of tissues in sheep as influenced by dietary vanadium. *Journal of Animal Science*, v.46, p.1091-1095, 1978.

HANSARD, S.L., AMMERMAN, C.B., HENRY, P.R. & SIMPSON, C.F., Vanadium metabolism in sheep. 1. Comparative and acute toxicity of vanadium compounds in sheep. *Journal of Animal Science*, v.55, p.344-349, 1982a.

HEEGE, J. Een intoxicatie bij runderen door opname van stookoeroet. *Tijdschr. diergeneesk.*, v.89, p.1300-1304, 1964.

HUNTER, D., 1975. *The Diseases of Occupations*. The English Universities Press Ltd, St Paul's House, Warwick Lane, London.

JACKSON, D.E. 1912. The pulmonary action of vanadium together with a study of the peripheral reactions to the metal. *Journal of Pharmacol. exp. Ther.*, 4: 1. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

JACKSON, D.E., 1911. The pharmacological action of vanadium. *Journal of Pharmacol. exp. Ther.*, 3: 477. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

JOUANY, J.P.; USHIDA, K. Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: MOSHINO, S. et al. (Eds.). *The rumen ecosystem*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press. Pringer-Verlag, 1990. p.139-150.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science.*, v.89, p.125-135, 2005.

KIVILUOTO, M., PYY, L., PAKARINEN, A., 1981. Serum and urinary vanadium of workers processing vanadium pentoxide. *Int. Arch. Accup. Environmental Health*, v.48, p.251-256, 1981.

KOCH JR., J.J.; SMITH, E.R.; SHIMP, N.F.; CONNER, J., 1956. Analysis of trace elements in human tissues. 1. Normal tissues. *Cancer (Philad.)*, v.9, p. 499, 1956.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 2009, v. 22, n. 1, p. 131 - 138.

KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos Ruminantes*. 3 ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2011. 214p.

KUMAR, R.; KEWLARAMANI, N.; PAL, R.P. E.; MANI, V. Suplementação de vanádio vis-à-vis ao crescimento e utilização de nutrientes em bezerros Karan Fries. *Indian Journal of Animal Nutrition*, v.34, p.169–172, 2017.

LAUWERYS, R.R., HOET, P., 1993. *Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring*, 2nd Ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton

LEWIS, C.E., 1959. The biological effects of vanadium. II. The signs and symptoms of occupational vanadium exposure. *AMA Arch. Industrial Health*, v.19, p. 497-503, 1959.

LINDELL, S.A.; BRANDT, R.T.; MINTON, J.E. et al. Supplemental Cr and revaccination effects on performance and health of newly weaned calves. *Journal of Animal Science*, v. 72, (S. 1), p. 133, 1994.

LOPES, F. C. F.; AROEIRA, L. J. M. Consumo, digestibilidade e degradabilidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) picado e seu efeito sobre características do rúmen em vacas mestiças. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 5, p.593-599, 1998.

LU, B.; ENNIS, D., LAI, R., BOGDANOVIC, E., NIKOLOV, R., SALAMON, L., FANTUS, C., LE-TIEN, H., FANTUS, I.G., 2001. Enhanced sensitivity of insulin-resistant adipocytes to vanadate is associated with oxidative stress and decreased reduction of vanadate (+5) to vanadyl (+4). *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.38, p.35589-35598, 2001.

LYONS, P. A new era in animal production: the arrival of the scientifically proven natural alternatives. In: *SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY*, 13, 1997. *Proceedings of Alltech...* Nottingham: Univ. Press, 1997. p. 1-13.

MATHISON, G.W.; ENGSTROM, D.F. Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 75, n. 4, p. 549-558, 1995.

MAKKAR, HP (2004) Avanços recentes no método de gases in vitro para avaliação da qualidade nutricional de recursos alimentares. Avaliação da qualidade e segurança dos alimentos para animais. *FAO Animal Production and Health Series*, v.160, p.55–88, 2004.

MASSMANN, W., 1956. Experimentelle Untersuchungen über die biologische Wirkung von Vanadinverbindungen. *Arch. Toxikol.*, 16: 182. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

MAURICIO, R.M.et al.. Semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science Technology*, v. 79, p. 321-330, 1999.

MCCRINDLE, C.M.E., MOKANTLA, E., DUNCAN, N., 2001. Peracute vanadium toxicity in cattle grazing near a vanadium mine. *Journal of Environmental Monitoring*, v.3, n.6, p. 580-582, 2001.

MIRANDA, C. T. Especificação química do v(v) e v (vi) na presença de ácidos (amino)-hidroxâmicos em meio aquoso. 2010. .128 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

MORAES, 2001 MORAES, S. S. Novos microelementos minerais e minerais quelatados na nutrição de bovinos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. (Documento, n. 119).

MOULD, F. L. et al. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123-124, p. 31–50, set. 2005.

MOWAT, D.N., CHANG, X., YANGA, W.Z. Chelated chromium for stressed feeder calves. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 73, n. 1, p. 49-55, 1993.

NRIAGU, J.O., 1998. *Vanadium in the Environment*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

OBBERG, S.G., PARKER, R., SHARMA, R.P. Distribution and elimination of an intratracheally administered vanadium compound in the rat. *Toxicology*, v.11, p. 315-323, 1978.

ORRIS, P., CONE, J., MCQUILKIN, S., 1983. Health hazard evaluation report HETA 80-096-1359, Eureka Company, Bloomington, IL. Washington, DC. US Department of Health and Human Services, National Institute of Occupational Safety and Health. NTIS-PB85-163574.

PATTERSON, B.W., HANSARD, S.L., AMMERMAN, C.B., HENRY, P.R., ZECH, L.A. & FISHER, W.R. 1986. Kinetic model of whole-body vanadium metabolism: studies in sheep. *American Journal of Physiology*, v.251, p. R325-R332, 1986.

PEIXOTO, E. Histórico do elemento Vanádio. *Química Nova na Escola*, n. 24, 2006, p.1-3.

PERRY JR., H.M., PERRY, E.F., 1959. Normal concentrations of some trace metals in human urine: changes produced by ethylenediaminetetraacetate. *Journal of Clinical Investigation*, v.38, p.1452, 1959.

PINO, F.; HEINRICHS, A. J. Effect of trace minerals and starch on digestibility and rumen fermentation in diets for dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n.4, p.2797–2810, 2016.

PLATONOW, N.; ABBEY, H.K., 1968. Toxicity of vanadium to calves. *The Veterinary Record*, 292-293.

PRIESTLEY, J., 1876. On the physiological action of vanadium. *Phil. Trans., Part 2*: 495. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

PROESCHER, F., SEIL, H.A., STILLIANS, A.W., 1917. A contribution to the action of vanadium with particular reference to syphilis. *American Journal of Syphilis.*, 1: 347. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

PULS, R., 1989. Mineral levels in animal health. *Diagnostic data*. Sherpa International, Clearbrook, British Columbia, Canada.

REILLY, C., 1991. Metal Contamination of Food, 2nd Ed. Elsevier Applied Science, New York.

RHOADS, K., SANDERS, C.L., 1985. Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environmental Research*, v.36, p.378, 1985.

RICHIE, D.A. 1985. The effects of toxicity induced by feeding selected elements (Pb, Hg, Cd, F, V), *Agri-Practice*, v.6, n.1, p 37-42, 1985.

ROSHICHIN, A.V., ORDZHONIKIDZE, E.K., SHALGANOVA, I.V., 1980. Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 24: 377-383. In *Toxicological Profile for Vanadium*. US Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, TP-91/29, 1992.

RYMER, C. et al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, p. 9-30, 2005.

RYMER, C., GIVEN, D.I., The use of the in vitro gas production technique to investigate the effect of substrate on the partitioning between microbial biomass production and the yield of fermentation products. *The British Society of Animal Science* 1999, p 36, 1999.

SALLES M.S.V., ZANETTI M.A., DEL CLARO G.R., NETTO A.S. & FRANZOLIN R. Avaliação de colheita de líquido ruminal por fístula ou sonda esofágica em bovinos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.438-442, 2003.

SANTRA, A.; KARIM, S.A. Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolytic enzyme profile in the rumen ecosystem. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, p.801-811, 2002.

SINGH, D.; DATT, C.; MISHRA, A.; SHIVANI, S.; GUPTA R.; MANI, V. Influence of Dietary Vanadium Supplementation on Nutrient Utilization, Growth Performance and Blood Biochemical Parameters in Sahiwal Calves. *Indian Journal of Animal Research*, v. 54, p. 973-980, 2020.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J.; a simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v.48, p.185-197, 1994.

TIAGO, T.P.M. Interação de oligómeros de vanadato com miosina de músculo esquelético. 2000. 79p. Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica - Universidade do Algarve, Faro, 2000.

TIPTON, I.H., 1960. The distribution of trace metals in the human body. *Metal binding in medicine*. Lippincott, Philadelphia and Montreal. In Faulker Hudson, T.G., 1964. *Vanadium: Toxicology and Biological Significance*. Elsevier Publishing Company, New York.

TRIPATHI, D.; MANI, V.; PAL, R.P. Effect of Vanadium Supplementation on Production Performance, Nutrient Utilization, Plasma Mineral Concentration, and Mineral Balance in Lactating Goats. *Biological Trace Elements Research*, v. 188, p. 412–418, 2019.

USHIDA, K.; KAYOULI, C.S.S.; JOUANY, J.P. Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated strawbased diets with or without maize. *British Journal of Nutrition*, v.64, p.765-775, 1990.

VIEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *Journal of Animal Science*, v.63, n. 5, p.1547-1560, 1986.

WATERS, M.D. Toxicology of vanadium. In: *Advanced Modern Toxicology*, 2: 147-189, 1977.

WHO, Air quality guidelines for Europe. *WHO Regional Publications*, European Series No. 23. Copenhagen World Health Regional Office for Europe, 1987.

WILLIAMS, A.G. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*, v.50, p.25-49, 1986.

WINDHOLZ, M. ed. 1983. *The Merck Index*. 10th ed. Rahway, N.J., Merck & Co., Inc., 82, 1417-1419.

YAMAZAKI, R. K. Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de vanádio peroxidados identificação de proteínas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação em músculo sóleo. 2004. 51 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2004.

YÁÑEZ - RUIZ, DR, BANNINK, A., DIJKSTRA, J., KEBREAB, E., MORGAVI, DP, O'KIELY, P., et al (2016) Design, implementação e interpretação de experimentos de cultura em lote in vitro para avaliar mitigação entérica de metano em ruminantes - uma revisão. *Animal Feed Science and Technology*, v.216, p.1–18, 2016.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiology of the rumen ad intestine. In: CHURCH, D. C. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nova Jersey, 1988, cap. 7, p. 125-144.

ZANETTI, M. A.; SALLES, M. S. V.; BRISOLA, M. L.; CÉSAR, M. C. Desempenho e resposta metabólica de bezerros recebendo dietas suplementadas com cromo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, p. 1532-1535, 2003.

ZENZ ET AL. ZENZ, C., BARTLETT, J.P., THIEDE, W.H., 1962. Acute vanadium pentoxide exposure. *Arch Environmental Health*, v.14, p. 542-546, 1962.

ANEXOS**ANEXO 1- Protocolo de envio do projeto para avaliação pelo CEUA da universidade brasil****RESOLUÇÃO - PARECER
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA****PROTOCOLO Nº 1900033****RESPONSÁVEL**

RESPONSÁVEL:
Gabriel M. P. de Melo
Instituição Universidade Brasil
Unidade Descalvado
Departamento / Disciplina
Nutrição Animal- Mestrado Profissional em Produção Animal

TÍTULO DO PROJETO

INFLUÊNCIA DE FONTES DE VANÁDIO NA FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO

RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 03/07/2020, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão
Cássia Maria Barroso Orlandi