

LUANE DOS SANTOS PEREIRA

**EFEITOS DE BOVICINA HC5 E DE ALFA-ÁCIDOS DO LÚPULO
NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO***

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

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani

Coorientadores: Cláudia Batista Sampaio
Marcio Arêdes Martins

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

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

T

P436e
2022
Pereira, Luane dos Santos, 1997-
Efeitos de bovicina HC5 e de alfa-ácidos do lúpulo na
fermentação ruminal in vitro / Luane dos Santos Pereira. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.413>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Alimentos - Aditivos. 2. Peptídeos. 3. Desaminação.
4. Agentes antiinfeciosos. I. Mantovani, Hilário Cuquetto,
1970-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 664.06

LUANE DOS SANTOS PEREIRA

**EFEITOS DE BOVICINA HC5 E DE ALFA-ÁCIDOS DO LÚPULO NA
FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO***

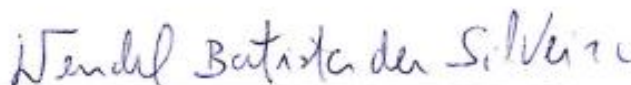
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de abril de 2022.

Assentimento:



Luane dos Santos Pereira
Autor



Hilário Cuquetto Mantovani
Orientador

Aos meus pais, Lindomar Pereira Jorge e Maria Nilza Porfírio dos Santos, por toda dedicação, cuidado, companheirismo e por sempre me ensinarem a olhar o lado leve da vida mesmo em meio a pandemia.

Aos meus avós, Mário Jorge, Maria de Lourdes Máximo Pereira Jorge e Luzia do Nascimento Porfírio, pelos exemplos de vida, inspiração, acolhimento e apesar da distância me dedicarem amor e carinho.

Aos meus irmãos, Mário Jorge dos Santos Pereira e Rebeca dos Santos dos Santos, pelos momentos que compartilhamos e por trazerem beleza a minha vida.

À Nádia Pereira Luz, por toda atenção e amizade.

Aos demais familiares e amigos pelo apoio e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, família e por toda força.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, por toda contribuição para a realização deste trabalho e por possibilitar meu aperfeiçoamento acadêmico e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e financiamento à pesquisa. A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento à pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani pela orientação, por todo aprendizado e pela dedicação na realização deste projeto.

Aos coorientadores Dra. Cláudia Batista Sampaio e Dr. Marcio Arêdes Martins pela contribuição neste trabalho.

À Dra. Camila Soares Cunha por ter aceito o convite para participar da banca.

Aos professores do Departamento de Microbiologia.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Microbiologia pela colaboração.

À Letícia, por toda atenção, colaboração e paciência ao responder as dúvidas.

Ao apoio da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE – GL).

À Dayanne, por todo auxílio na realização das coletas do líquido ruminal que possibilitaram a condução deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN): Ana Júlia, Juliana, Katialaine, Letícia, Nívea, Nneka Vivian, Rodrigo, Rúzivia e Yasmin, por todo apoio, compreensão e escuta ativa durante a execução do projeto.

À minha família, por ser meu porto seguro em todos os momentos de angústias e incertezas, por ensinar valores que me guiam no caminho da vida.

À Ana Flávia, por todo acompanhamento psicoterápico, por ter me guiado no caminho do autoconhecimento e ter me ajudado a lidar com a ansiedade.

Às minhas amigas da República Tipo Fiona: Ana, Bárbara, Bruna, Carmen, Josiane, Vanessa e aos agregados Dona Roseli, Hugo e Vitor Renan, por trazerem

um aconchego de lar, sentimento de bem querer e memórias que sempre guardarei com muito carinho.

À Dona Gracinha, Zinho Batista, Josiane, Eliane, Leandro e Larissa, por todo apoio e carinho.

À Dona Cidinha, José Roberto, Bruna e Betânia, pelo acolhimento e os momentos de descontração.

Ao grupo Leia Outros, por me mostrar o lado bonito e humano da vida, pelo incentivo à busca por novos horizontes e por todas as viagens literárias que realizamos em meio aos dias pandêmicos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

PEREIRA, Luane dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Efeitos de bovicina HC5 e de alfa-ácidos do lúpulo na fermentação ruminal *in vitro***. Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadores: Cláudia Batista Sampaio e Marcio Arêdes Martins.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado ou combinado da bovicina HC5 e alfa-ácidos de lúpulo (lactoStab) na fermentação ruminal *in vitro* utilizando líquido ruminal de vacas leiteiras e incubado com substrato à base de fubá e silagem de milho. Após 48 h de incubação foi realizada a análise da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e o pH ruminal. Também foram coletadas alíquotas após 0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h de incubação para análises de produção de gás, concentração de nitrogênio amoniacal, proteína solúvel e proteína microbiana. O perfil de ácidos orgânicos voláteis foi analisado nos tempos 0 h, 6 h, 9 h e 24 h de incubação. As concentrações estabelecidas para bovicina HC5 (B) e lactoStab (L), isoladamente ou combinados, foram de 5 μM e 100 ppm, respectivamente. A adição dos antimicrobianos em substrato à base de fubá e silagem de milho não afetou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ($P>0,05$) e não influenciou a produção de gás ($P>0,05$). No entanto, a bovicina HC5 diminuiu ($P<0,05$) o acúmulo de amônia (Δ amônia) em relação ao controle. Os tratamentos com lactoStab e a combinação B+L apresentaram menor concentração total de proteína solúvel ($P<0,05$), enquanto o oposto foi observado para o tratamento com bovicina HC5 quando comparado ao controle ($P<0,05$). Bovicina HC5 aumentou a produção de proteína microbiana ($P<0,05$). Além disso, os antimicrobianos avaliados aumentaram a concentração total de ácidos orgânicos voláteis (AOV) ($P<0,05$) em relação ao controle. Tanto a adição isolada da bovicina HC5, quanto a aplicação combinada (B+L) aumentaram a produção de propionato ($P<0,05$). Não houve efeito na produção de acetato, independentemente do antimicrobiano avaliado ($P>0,05$). No entanto, o grupo da combinação B+L reduziu a relação A:P ($P<0,05$). Os antimicrobianos testados aumentaram a concentração total de AOV e não afetaram os demais parâmetros da fermentação ruminal *in vitro*. A bovicina HC5 afetou positivamente a fermentação ruminal de proteína, promovendo aumento da proteína microbiana e menor Δ amônia. A concentração de proteína solúvel e propionato foi menor no tratamento com lactoStab. Os resultados sugerem que bovicina HC5 pode potencializar o efeito do

lactoStab, com conseqüente aumento da produção de propionato e redução da relação acetato/propionato.

Palavras-chave: Aditivo alimentar. Peptídeo antimicrobiano. Desaminação.

ABSTRACT

PEREIRA, Luane dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Effects of bovicin HC5 and alpha hop acids on ruminal fermentation *in vitro*.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Cláudia Batista Sampaio and Marcio Arêdes Martins.

This work aimed to evaluate the isolated and combined effect of bovicin HC5 and lactoStab on rumen fermentation *in vitro* using rumen fluid from dairy cows and incubated with a substrate based on cornmeal and corn silage. After 48 h of incubation, the analysis of *in vitro* dry matter digestibility of (IVDMD) and ruminal pH was performed. Aliquots were also collected after 0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h, and 48 h of incubation for analysis of gas production, ammoniacal nitrogen concentration, soluble protein, and microbial protein. The profile of volatile organic acids was analyzed at 0 h, 6 h, 9 h, and 24 h incubation times. The concentrations established for bovicin HC5 (B) and lactoStab (L), alone or combined, were 5 μ M and 100 ppm, respectively. The *in vitro* dry matter digestibility and gas production of substrates based on corn meal and silage were not affected by the addition of antimicrobials ($P > 0.05$). However, bovicin HC5 decreased ($P > 0.05$) the accumulation of ammonia (Δ ammonia) in relation to the control ($P < 0.05$). The treatments with lactoStab and the combination B+L had a lower total concentration of soluble protein ($P < 0.05$), while the opposite was observed for the bovicin HC5 treatment ($P < 0.05$) compared to the control. Bovicin HC5 increased microbial protein production ($P < 0.05$). In addition, the antimicrobials under study increased the total concentration of volatile organic acids (AOV) ($P < 0.05$) in relation to the control. Both the isolated addition of bovicin HC5 and the combined application (B+L) increased propionate production ($P < 0.05$). There was no effect on acetate production, regardless of the antimicrobial tested ($P > 0.05$). However, the B+L treatment reduced the A:P ratio ($P < 0.05$). The antimicrobials tested increased the total concentration of AOV and did not affect other *in vitro* ruminal fermentation parameters. Bovicin HC5 positively affected ruminal protein fermentation, favoring the increase of microbial protein and a lower Δ ammonia. The concentration of soluble protein and propionate was lower in the lactoStab treatment. These results suggest that bovicin HC5 can enhance the effect of lactoStab, with a consequent increase of propionate and reduction of the acetate/propionate ratio.

Keywords: Feed additive. Antimicrobial peptide. Deamination.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1	14
1. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1. Modulação da fermentação ruminal	14
1.1.1. Importância dos agentes moduladores da fermentação ruminal.....	14
1.1.2. Ionóforos	15
1.1.3. Óleos essenciais.....	16
1.1.4. Ácidos orgânicos.....	18
1.1.5. Enzimas	19
1.1.6. Bacteriocinas	19
1.2. Bacteriocinas.....	20
1.2.1. Definição e classificação.....	20
1.2.2. Modo de Ação	21
1.2.3. Aplicações comerciais.....	21
1.3. Bovicinas.....	23
1.3.1. Bovicina HC5	23
1.4. Estratégias para potencializar o efeito de agentes antimicrobianos e moduladores de microbiota.....	24
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2	33
2. Efeitos de bovicina HC5 e de alfa-ácidos do lúpulo na fermentação ruminal <i>in</i> <i>vitro</i>	33
2.1. INTRODUÇÃO.....	33
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.2.1. Produção, extração e purificação da bovicina HC5.....	34
2.2.2. Coleta de líquido ruminal.....	35
2.2.3. Determinação da concentração subinibitória dos antimicrobianos.....	35
2.2.4. Análise bromatológica do substrato	36
2.2.5. Incubação <i>in vitro</i>	37
2.2.5.1. Produção de Ácidos orgânicos	38
2.2.5.2. Concentração de amônia, proteína microbiana e proteína solúvel	38
2.2.5.3. Produção de gás.....	39
2.2.6. Digestibilidade <i>in vitro</i>	39
2.2.7. Análises estatísticas.....	40

2.3. RESULTADOS	41
2.4. DISCUSSÃO.....	48
2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

INTRODUÇÃO GERAL

Os ruminantes são herbívoros que possuem estômago multicavitário, dividido em rúmen, retículo, omaso e abomaso, em que os três primeiros compartimentos possuem função fermentativa, enquanto o abomaso realiza a digestão química. O rúmen é o maior compartimento, formado por papilas cônicas que atuam na absorção dos produtos gerados a partir da atividade fermentativa dos microrganismos (GALMESSA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). O retículo é revestido por uma membrana mucosa dividida em diversas pregas que possuem a função de selecionar as partículas que passam no orifício retículo-omasal (BERCHIELLI et al., 2011). O omaso possui capacidade absorptiva, constituído por lâminas musculares, envolvidas na reciclagem de água e sais minerais, como sódio e fósforo (OLIVEIRA et al., 2019). O abomaso possui uma mucosa retorcida em espiral, formado por uma porção glandular que secreta HCl e enzimas digestivas (JOUANY; MORGAVI, 2007).

O rúmen provém condições ideais de temperatura (39 °C), pH (~6,5) e oferta de nutrientes para o crescimento microbiano. A microbiota ruminal é filogeneticamente complexa, formada por bactérias, arqueas, fungos, e protozoários que atuam na degradação do material lignocelulósico presente na dieta (RETI et al., 2013). A relação de simbiose entre os ruminantes e os microrganismos permite a degradação de carboidratos, proteínas e lipídeos contidos no alimento fornecido ao animal (JOUANY; MORGAVI, 2007). Os principais produtos da fermentação ruminal, tal como os ácidos orgânicos voláteis e a proteína microbiana são utilizados como fonte de nutrientes e energia pelo metabolismo do animal (FLYTHE; AIKEN, 2010). Contudo, também ocorrem perdas de energia durante a fermentação em ruminantes, a partir da liberação excessiva de amônia, e gases como o metano e CO₂. Uma das estratégias de manejo utilizadas para modular a fermentação ruminal é o uso de antibióticos ionóforos na dieta de bovinos leiteiros e gado de corte (RETI et al., 2013).

Este grupo de aditivos zootécnicos visa otimizar o uso da dieta, melhorar os parâmetros zootécnicos, manter o pH ruminal e reduzir a geração de produtos indesejáveis da fermentação. Os antibióticos ionóforos atuam na modulação da população microbiana do rúmen, principalmente, na inibição da atividade fermentativa de bactérias Gram-positivas, e aumento da eficiência no metabolismo de energia e nitrogênio (RUSSELL; STROBEL, 1989; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013). No entanto, a utilização de promotores de crescimento ou antibióticos com relevância

para a clínica humana na produção animal tem sido largamente criticado, devido à possível seleção de bactérias resistentes que representam risco à saúde pública (CHATTOPADHYAY, 2014). Neste sentido, vários compostos naturais tem sido avaliados como alternativas aos promotores de crescimento utilizados na produção animal (YANG et al., 2015). Dentre as substâncias com potencial para modular a microbiota do trato gastrointestinal animal, os compostos fitoquímicos e os peptídeos antimicrobianos são antimicrobianos com espectro variado de ação.

O lúpulo (*Humulus lupulus*) possui inflorescências que são constituídas por compostos secundários de interesse comercial, como os alfa-ácidos e beta-ácidos que apresentam atividade antimicrobiana, agindo principalmente contra a estabilidade da membrana celular de bactérias (ALMAGUER et al., 2014). Os alfa-ácidos e beta-ácidos são considerados fito-ionóforos, pois apresentam ação similar aos ionóforos utilizados na produção animal (FLYTHE et al., 2017). Estes ácidos orgânicos possuem resultados positivos no controle da produção de amônia ruminal, modificação do perfil de ácidos orgânicos voláteis e inibição de bactérias hiperprodutoras de amônia isoladas de rúmen bovino (FLYTHE, 2009; FLYTHE; AIKEN, 2010).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos pelos ribossomos de bactérias que atuam na formação de poros na membrana ou inibição da síntese de parede celular (PARADA et al., 2007; PAIVA et al., 2012). A bovicina HC5 é uma bacteriocina de bactéria do ecossistema ruminal que demonstrou ser uma candidata promissora aos promotores de crescimento em estudo *in vitro*, reduzindo a produção de metano ruminal (LEE et al., 2002). Outra bacteriocina isolada de *Lactococcus lactis* (nisina) demonstrou potencial como alternativa aos ionóforos na modulação da fermentação no rúmen (SHEN et al., 2017).

O uso de compostos naturais como aditivos na nutrição de ruminantes é tema de interesse para a pecuária leiteira e de corte. No entanto, informações sobre a eficácia e efeitos de peptídeos antimicrobianos e ácidos orgânicos de lúpulo na modulação da fermentação ruminal ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do lantibiótico bovicina HC5 e do composto lactoStab (alfa-ácidos de lúpulo) na fermentação ruminal *in vitro*, com ênfase no metabolismo de carbono e nitrogênio.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Modulação da fermentação ruminal

O rúmen é o maior compartimento do trato gastrointestinal dos ruminantes, possui função importante para a digestão de fibras e apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de uma microbiota diversa. A população microbiana do rúmen se diferencia de acordo com a diversidade de espécies e pelas funções metabólicas envolvidas na degradação de substratos, podendo ser específica ou generalista (MAO et al., 2015). Os produtos gerados a partir da fermentação, são os precursores que atendem as necessidades requeridas pelo animal. Portanto, deve-se destacar a importância do uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal na nutrição de ruminantes, com o intuito de melhorar o desempenho, aproveitamento da dieta, e otimizar a produção animal (RUSSELL; RYCHLIK, 2001).

O uso de aditivos alimentares na dieta de ruminantes tem como objetivo aumentar a eficiência da fermentação ruminal e controlar processos indesejáveis que resultam em gasto de energia, como a produção de metano, liberação excessiva de amônia e síntese de lactato (RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013; MARQUES; COOKE, 2021). Os efeitos benéficos resultam em alteração do perfil de ácidos orgânicos voláteis, favorecendo a produção de ácido propiônico, alteração do metabolismo de nitrogênio com o retardo da proteólise no rúmen e aumento da conversão de compostos nitrogenados em proteína microbiana (TEDESCHI; FOX; TYLUTKI, 2003; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013). Além disso, os aditivos minimizam a ocorrência de distúrbios metabólicos, a exemplo da acidose ruminal (MARQUES; COOKE, 2021).

1.1.1. Importância dos agentes moduladores da fermentação ruminal

Os ruminantes possuem uma relação simbiótica com microrganismos anaeróbios que estão presentes no ecossistema do rúmen, em que, os animais provêm condições favoráveis para a fermentação, e em contrapartida a microbiota atua na degradação da fibra, geração de energia e síntese de biomassa microbiana (CALSAMIGLIA et al., 2007). Os substratos fornecidos na dieta são degradados por meio da fermentação realizada pelos microrganismos do rúmen, e convertidos em monômeros e precursores (TAMMINGA, 1996). Estes produtos da fermentação são

utilizados como fonte de energia, síntese de proteína microbiana, manutenção do metabolismo e produção animal (GALMESSA et al., 2019).

Os aditivos zootécnicos utilizados na nutrição de ruminantes podem modular a fermentação ruminal e afetar a dinâmica da microbiota do rúmen, por meio do controle de patógenos, estímulo de grupos microbianos específicos, redução da síntese de metabólitos indesejáveis e melhoria da assimilação de nutrientes (DIBNER; RICHARDS, 2005; RETI et al., 2013). Os promotores de crescimento, por exemplo, favorecem o melhor aproveitamento da dieta e reduzem o desperdício de energia metabolizável na produção de metano e excreção de metabólitos (BABANDI et al., 2020).

Entretanto, durante o processo de fermentação podem ocorrer perdas energéticas para o animal e conseqüentemente, menor aproveitamento da dieta. Além disso, podem causar danos ao meio ambiente devido à excreção de N amoniacal e geração de gases de efeito estufa, como o metano (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005; UNGERFELD, 2015). A suplementação com aditivos tem o objetivo de contornar estes efeitos deletérios e melhorar o desempenho dos animais (LILLEHOJ et al., 2018). Assim, o uso de aditivos capazes de aumentar a eficiência da fermentação ruminal e melhorar a produção animal é de grande interesse econômico (KALMOKOFF; BARTLETT; TEATHER, 1996).

1.1.2. Ionóforos

Os ionóforos representam um grupo de compostos bioativos produzidos pelo gênero *Streptomyces*, comumente utilizados como anticoccidianos e também como promotores de crescimento em ruminantes. Dentre os compostos, pode se destacar alguns de maior uso comercial, como a monensina, lasalocida, salinomicina e a narasina (RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013). Os ionóforos são substâncias lipossolúveis, capazes de formar complexos com íons metálicos que interferem no transporte através da membrana celular (RUSSELL; STROBEL, 1989; RUTKOWSKI; BRZEZINSKI, 2013). A estrutura da membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, facilita a ação dos ionóforos na perturbação do fluxo de íons e cátions, o que ocasiona o aumento da pressão osmótica, desequilíbrio do transporte intermembrana e perda de viabilidade celular (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

As bactérias Gram-negativas apresentam diferenças na estrutura de parede celular, em que a membrana externa atua como uma barreira na entrada de

compostos na célula bacteriana (RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Existem canais inseridos nesta membrana, denominados de porinas que possui tamanho limite de 600 daltos, no entanto, a maioria dos ionóforos possuem uma maior massa molecular e isto  um dos impeditivos da aao dos aditivos sobre bactérias Gram-negativas (RUSSELL; STROBEL, 1989; MARQUES; COOKE, 2021).

O efeito dos ionóforos na modulaao da fermentaao em ruminantes pode ser influenciado por outros fatores, como a proporao volumoso: concentrado, qualidade da forragem, sanidade animal, manejo alimentar e processamento dos grãos (MARQUES; COOKE, 2021). Além disso, a complexa microbiota ruminal possui a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência e se tornam menos susceptíveis aos ionóforos (GUAN et al., 2006; RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

O tipo de dieta  um fator que influencia no modo de aao dos ionóforos, tal como, o aumento da conversão alimentar em animais alimentados com alta concentraao de grãos e suplementados com ionóforos (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008). Enquanto que a adiao de ionóforos em animais alimentados  base de forragem, melhora a eficiência alimentar a partir do aumento do ganho de peso sem afetar o consumo da materia seca (LIMEDE et al., 2021).

A suplementaao de monensina e lasalocida em bovinos alimentados com dietas de alto e baixo concentrado promoveu a reduao da proporao acetato/propionato, diminuiao da concentraao de N amoniacal e inibiao do crescimento de protozoários ciliados (GUAN et al., 2006). Os protozoários são capazes de produzir H₂ por meio dos hidrogenossomas, além disso, possuem relaao de endossimbiose com as arqueas metanogenicas que utilizam H₂ e CO₂ para a produao de metano (FINLAY et al., 1994; MORGAVI et al., 2010; NEWBOLD et al., 2015).

1.1.3. leos essenciais

As plantas sintetizam diversos compostos bioativos por meio do seu metabolismo secundário que são denominados de fitoquímicos. Estas moléculas possuem atividade antimicrobiana, sendo utilizadas há séculos na conservaao de alimentos, aplicaoes industriais e uso terapêutico em humanos (BUSQUET et al., 2005). A utilizaao de compostos extraídos de vegetais também  vista como uma alternativa em potencial aos antibióticos como promotores de crescimento em animais (LILLEHOJ et al., 2018). Dentre os compostos estudados, os óleos essenciais têm

mostrado efeitos benéficos na modulação da fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Os óleos essenciais são substâncias complexas, constituídas por hidrocarbonetos cíclicos de natureza hidrofóbica, possuem propriedades antioxidantes, e antimicrobianas que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, promovem a melhoria da saúde intestinal e podem atuar como imunomoduladores (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; CALSAMIGLIA et al., 2007; LILLEHOJ et al., 2018). Apesar de apresentar diversos metabólitos em sua composição, destacam-se dois compostos bioativos: os terpenóides que representa um grupo complexo, caracterizado por terem compostos derivados do isopreno, uma estrutura básica de cinco carbonos, e os fenilpropanóides que são formados por uma cadeia de três carbonos ligados a um anel aromático de seis carbonos (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O modo de ação destes compostos ainda não está bem esclarecido, mas, há indícios que os óleos essenciais podem interagir com a bicamada lipídica, causando a perturbação e perda de estabilidade da membrana celular dos microrganismos (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; CALSAMIGLIA et al., 2007). Esta perturbação da membrana causa o vazamento de íons e na tentativa de restabelecer o gradiente iônico ocorre o gasto de energia com o acionamento de bombas iônicas que resultam em redução do crescimento microbiano ou morte celular (JOUANY; MORGAVI, 2007). Aplicação destas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais na nutrição animal pode ocasionar modificações na taxa de crescimento, composição filogenética e o perfil de fermentação da microbiota do rúmen. Além disso, os óleos essenciais podem reduzir a produção de metano, inibir a atividade de desaminação e modificar o metabolismo de nitrogênio no rúmen (ZHOU et al., 2020).

A mistura de óleos essenciais (cinamaldeído, eugenol e timol) promoveu o aumento na digestibilidade *in vitro*, contudo, não afetou a proporção total de ácidos orgânicos após 24 h de incubação *in vitro* (KIM et al., 2019). A inclusão do óleo essencial de orégano diminuiu a produção de N-amoniaco, afetou a abundância relativa de arqueas ruminais, resultando em menor produção de CH₄, sem alterar a produção de ácidos orgânicos voláteis (ZHOU et al., 2020). No entanto, a adição do cinamaldeído e o óleo de alho, alterou o perfil de fermentação ruminal, com redução na concentração de acetato, e aumento nas proporções de propionato e butirato (BUSQUET et al., 2005).

1.1.4. Ácidos orgânicos

O uso de ácidos orgânicos também é uma estratégia utilizada no manejo nutricional de animais alimentados com dietas à base de grãos, visando retardar a degradação dos carboidratos fermentescíveis, e assim, otimizar o aproveitamento da dieta e evitar o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como a acidose ruminal subaguda (VYAS; BEAUCHEMIN; KOENIG, 2015; ZHAO et al., 2021). Em experimento com grãos de cevada tratados com ácido láctico, foi evidenciado a manutenção do pH ruminal, aumento na produção de propionato e redução de acetato. Além disso, houve efeito na redução da taxa de degradação do substrato e aumento no teor de gordura do leite (IQBAL et al., 2009).

As inflorescências do lúpulo contêm metabolitos secundários de grande interesse para a indústria cervejeira, como alfa ácidos (α -ácidos) e beta ácidos (β -ácidos). A ação antimicrobiana destes compostos tem sido explorada na busca por alternativas aos antibióticos convencionais utilizados na alimentação de ruminantes, além disso, há indícios que a adição de alfa e beta ácidos geram efeitos benéficos na modulação da fermentação ruminal (FLYTHER et al., 2017). Os constituintes do lúpulo atuam na perturbação da membrana celular de bactérias Gram-positivas de forma similar ao ionóforo monensina (FLYTHER, 2009; FLYTHER et al., 2017). Além disso, foi constatado em experimento *in vitro* com culturas mistas de microrganismos do rúmen que a adição de β -ácidos aumentou a produção de propionato, reduziu a proporção acetato/propionato e inibiu o crescimento de *S. bovis* (FLYTHER; AIKEN, 2010). Apesar de duas variedades de lúpulo terem afetado positivamente a degradabilidade *in vitro* da proteína bruta, ocasionaram a diminuição da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (LAVRENCIC et al., 2014).

A aplicação de ácido cítrico no tratamento de grãos de milho modificou os padrões de fermentação ruminal em cabras leiteiras. Foi observado a redução da concentração total de ácidos orgânicos voláteis, aumento do pH, com tendência a diminuir a resposta inflamatória e os riscos de desenvolver acidose ruminal (SHEN et al., 2019). Além de modificar o perfil de fermentação ruminal, o uso de ácido tânico para o tratamento de grãos de milho, afetou a composição da microbiota ruminal e promoveu alterações nas vias metabólicas do amido (ZHAO et al., 2021).

1.1.5. Enzimas

A suplementação de enzimas exógenas em dietas de ruminantes tem como objetivo melhorar a utilização de nutrientes e aumentar a digestibilidade dos alimentos (ZILIO et al., 2019). Grande parte dos sistemas de produção de ruminantes utilizam dietas à base de forragens. Neste cenário, o uso de enzimas fibrolíticas pode melhorar a digestão das fibras e otimizar o aproveitamento da dieta (CHUNG et al., 2012; ZILIO et al., 2019). As enzimas xilanases e celulasas, afetaram positivamente a digestibilidade e a produção de leite, contudo, não houve efeito sobre o consumo da matéria seca e da eficiência alimentar em vacas leiteiras (ARRIOLA et al., 2017). A adição de enzimas fibrolíticas em dieta à base de grão seco de destilaria de trigo e cevada, melhorou a digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) e aumentou a digestibilidade do amido. No entanto, o desempenho de novilhos confinados não foi afetado (HE et al., 2014).

A inclusão de amilases em dieta rica em concentrado para vacas leiteiras, não alterou o perfil de fermentação ruminal e reduziu a ingestão de matéria seca. Apesar disso, foi observado melhora na eficiência alimentar e aumento da produção de leite (ANDREAZZI et al., 2018). Contudo, a suplementação dietética de xilanases e amilases em vacas em lactação não afetou a produção e nem a composição do leite (ZILIO et al., 2019). A composição da dieta, atividade enzimática, tipo de fornecimento, estabilidade da enzima e dosagem utilizada são fatores que podem interferir na resposta à suplementação enzimática (ARRIOLA et al., 2017; ZILIO et al., 2019).

1.1.6. Bacteriocinas

As bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias (COTTER; ROSS; HILL, 2013). Dentre os compostos propostos como alternativa aos promotores de crescimento convencionais, as bacteriocinas se destacam pela eficácia, baixa citotoxicidade e por não promoverem a transferência horizontal de resistência antimicrobiana (HOANG; STERN; LIN, 2011; VIECO-SAIZ et al., 2019). A suplementação de peptídeos antimicrobianos comerciais em cabras não castradas, influenciou a composição da microbiota ruminal aumentando a abundância relativa dos gêneros *Fibrobacter*, *Anaerovibrio* e *Ophryoscolex* (REN et al., 2019).

1.2. Bacteriocinas

1.2.1. Definição e classificação

Os microrganismos produzem vários metabólitos extracelulares com atividades biológicas diversas que podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos de interesse comercial. Dentre esses metabólitos, as bacteriocinas se destacam pelo amplo interesse aplicado na indústria, agricultura e medicina (ZHENG; SONOMOTO, 2018). As bacteriocinas são peptídeos com ação antimicrobiana sintetizados pela via ribossomal em bactérias (YANG et al., 2014). São moléculas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e que apresentam espectro de ação variado (SOLTANI et al., 2021). Vários desses peptídeos antimicrobianos possuem estrutura estável, sendo capazes de tolerar variação ampla de pH e temperatura (GARSA et al., 2019). Grande parte das bacteriocinas não induz a resposta imunológica em humanos (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020).

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas são tipicamente divididas em três grupos. A classe I, que abrange peptídeos que contém anéis de lantionina, os lantibióticos, os quais passam por modificações pós-traducionais (NEGASH; TSEHAI, 2020). Os lantibióticos são uma classe de bacteriocina muito estudada por ser abundante em bactérias lácticas e demonstrar potencial para aplicações comerciais (MCAULIFFE; ROSS; HILL, 2001). Os lantibióticos são considerados um grupo de peptídeos promissores para o desenvolvimento de fármacos alternativos aos antibióticos tradicionais, além de possuírem características úteis para uso na indústria alimentícia e na clínica humana e veterinária (PAIVA et al., 2012; VAN TILBURG et al., 2020). A classe II agrupa os peptídeos que não passam por modificações pós-traducionais, enquanto a classe III corresponde a proteínas instáveis ao calor (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

As bactérias Gram-negativas sintetizam bacteriocinas denominadas de colicinas e microcinas (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020). As microcinas são peptídeos de baixa massa molecular (< 10 kDa) que podem ou não sofrer modificações pós-traducionais (YANG et al., 2014). As colicinas são proteínas codificadas por genes presentes em plasmídeos e com maior massa molecular (< 100 kDa) (BOSÁK et al., 2021). A complexidade bioquímica e estrutural das bacteriocinas, requer um sistema de classificação individualizado para cada grupo de peptídeos (CHIKINDAS et al., 2018).

1.2.2. Modo de Ação

As bacteriocinas podem apresentar espectro de ação variado, agindo contra grupos microbianos específicos ou filogeneticamente distintos (NEGASH; TSEHAI, 2020). A inibição do organismo alvo pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos de ação, os quais tipicamente envolvem a interação com fosfolipídeos ou receptores específicos na membrana citoplasmática (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020). A agregação dos peptídeos na membrana citoplasmática resulta na formação de poros, efluxo de metabólitos e alteração do equilíbrio osmótico (DICKS et al., 2018). O lantibiótico nisina inibe a síntese de peptidoglicano por meio da utilização do lipídeo II, um precursor da síntese de parede celular, como alvo de ancoragem na célula (DIEP et al., 2007). Enquanto a lactococina A, forma poros na membrana utilizando as proteínas IIC e IID do sistema manose fosfotransferase como receptores (OFTEDAL et al., 2021).

Além disso, os peptídeos podem causar interferência no sistema de quorum-sensing, inibindo a formação ou estabelecimento de biofilmes (ALGBURI et al., 2017). A bacteriocina lisostafina demonstrou ser mais eficaz na ruptura de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*, quando comparado a nisina (CEOTTO-VIGODER et al., 2016). Contudo, o uso de nisina afetou a composição de polissacarídeos e reduziu o DNA extracelular de biofilmes de *S.aureus* (ANDRE et al., 2019).

A expressão dos genes de biossíntese das bacteriocinas pode ser regulada por indutores externos sintetizados pela própria linhagem produtora, por outras espécies microbianas presentes no meio de cultivo, ou ser influenciada por fatores ambientais (GUINANE et al., 2015; MOREIRA et al., 2020). A seleção de culturas bacterianas com diferentes vias biossintéticas para produção de bacteriocinas, e a otimização dos fatores que influenciam a síntese desses peptídeos possibilitam ampliar a diversidade e rendimento das moléculas disponíveis, o que é essencial para as aplicações comerciais dessas moléculas (YANG et al., 2014).

1.2.3. Aplicações comerciais

O baixo rendimento de bacteriocina é um dos entraves para a sua produção em larga escala (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020). Devido a sua natureza peptídica e o fato de serem codificadas a partir de um gene estrutural específico, as bacteriocinas são moléculas mais suscetíveis às ferramentas de bioengenharia, quando comparado aos antibióticos convencionais (COTTER; ROSS; HILL, 2013). O

uso das técnicas de bioengenharia otimiza o processo de seleção das espécies produtoras e aprimora características de interesse comercial, como estabilidade e aumento no rendimento do peptídeo (DEEGAN et al., 2006). A melhoria das características físico-químicas de bacteriocinas, potencializa o aproveitamento das propriedades funcionais e das múltiplas aplicações industriais (FIELD et al., 2015).

As bacteriocinas têm-se mostrado uma alternativa promissora para o desenvolvimento de fármacos, antibióticos e produtos que beneficiem a saúde humana (MEADE; SLATTERY; GARVEY, 2020). As bacteriocinas vêm sendo utilizadas na conservação de alimentos, como vegetais, carnes e produtos lácteos (ZACHAROF; LOVITT, 2012). Estas moléculas podem ser incorporadas ao alimento de três formas distintas: bacteriocinas purificadas, adição de um ingrediente previamente fermentado pela bactéria produtora da bacteriocina ou com o uso de culturas starters, produtoras de bacteriocinas em alimentos fermentados (CHIKINDAS et al., 2018).

Estudos indicam que as bacteriocinas são compostos bioativos de caráter multifuncional, e que podem apresentar atividade *in vitro* contra células tumorais (CHUMCHALOVA; SMARDA, 2003). Além de auxiliar na saúde da microbiota intestinal a partir da potencialização dos efeitos de probióticos quando utilizados de forma conjunta (YANG et al., 2014). Atuando como peptídeo colonizador, em que facilita a interação do probiótico com os microrganismos presentes no trato gastrointestinal (KRETH et al., 2005). Na inibição direta de linhagens ou patógenos (CORR et al., 2007). E como peptídeos sinalizadores, auxiliando na comunicação celular e na resposta imunológica (VAN HEMERT et al., 2010).

A nisina é um lantibiótico sintetizada pela bactéria *Lactococcus lactis* e tem sido muito utilizado na indústria alimentícia. A nisina atua no controle de agentes microbianos causadores de intoxicação e promove o aumento de vida útil de prateleira (DEEGAN et al., 2006). O uso de *Streptococcus macedonicus*, produtora do lantibiótico macedocina, como cultura starter, demonstrou ter potencial na conservação de alimentos fermentados (GEORGALAKI et al., 2002). A bacteriocina warnericina RB4 produzida pela linhagem *Staphylococcus warneri* RB4 inibiu o crescimento de microrganismos deteriorantes em bebidas com suco de frutas (MINAMIKAWA et al., 2005). A bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por bactéria isolada do rúmen bovino, também demonstrou potencial para uso na conservação de sucos de fruta (CARVALHO; VANETTI; MANTOVANI, 2008).

Na aplicação farmacêutica veterinária, a nisina demonstrou ter potencial para o desenvolvimento de medicamentos profiláticos e tratamento de mastite bovina (PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014). Além disso, o uso da nisina como aditivo em dietas de ruminantes tem-se mostrado uma alternativa em potencial aos antibióticos convencionais, com a modulação de alguns parâmetros ruminais, como o perfil de ácidos orgânicos voláteis e inibição da produção de metano (SAR et al., 2005). Também já foi evidenciado a ação da nisina sobre as arqueas metanogênicas, resultando em menor perda de energia na forma de CH₄ em estudos com ovinos (SANTOSO et al., 2004).

1.3. Bovicinas

As bovicinas representam um grupo de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias do gênero *Streptococcus* que apresentam diversas estruturas e propriedades bioquímicas (GARSA et al., 2019). A sequência peptídica da bovicina 255 é semelhante as bacteriocinas de classe II produzidas por bactérias Gram-positivas, como a lactococina A e a termofilina (WHITFORD et al., 2001). Além disso, a bovicina 255 produzida a partir cepas de *Streptococcus gallolyticus* LRC0255, obtidas de isolados do rúmen bovino, possui peptídeos curtos (6 kDa), termostáveis, de natureza hidrofóbica e catiônica (NES et al., 1996; GARSA et al., 2019).

A bovicina HJ50 é um lantibiótico da classe II, produzida pela bactéria *Streptococcus bovis* HJ50 (XIAO et al., 2004; WANG et al., 2014). É uma bacteriocina que possui massa molecular de 3,43 kDa, caracterizada por apresentar uma ponte dissulfeto que desempenha um papel importante na manutenção da natureza hidrofóbica e na função antimicrobiana da molécula (WANG et al., 2014; GARSA et al., 2019). No entanto, a bovicina HJ50 apresenta sensibilidade a tripsina, subtilisina e a proteinase K (XIAO et al., 2004). A bovicina HC5 é um peptídeo pequeno (2,44 kDa) do grupo dos lantibióticos de amplo espectro que possui anéis de lantionina (MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI; RUSSELL, 2008; GARSA et al., 2019).

1.3.1. Bovicina HC5

A bovicina HC5 é um peptídeo antimicrobiano produzido pela bactéria *Streptococcus equinus* HC5 (GARSA et al., 2019). Possui estabilidade em pH ácido e em altas temperaturas (MANTOVANI et al., 2002; HOULIHAN; RUSSELL, 2006). *Streptococcus equinus* é uma bactéria Gram-positiva, que possui arranjo em pares ou cadeias em formato de cocos, não formadores de esporos, não móveis, catalase-

negativo e oxidase-negativo (SCHLEGEL et al., 2003). Faz parte da microbiota comensal do trato gastrointestinal de bovinos, caprinos, ovinos e outros animais ruminantes (GHALI; SCOTT; JASSIM, 2004). O *Streptococcus equinus* HC5 sintetiza a bovicina HC5, uma bacteriocina do grupo dos lantibióticos tipo All, que apresenta potencial para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas (GARSA et al., 2019).

A bovicina HC5 é uma bacteriocina que atua na formação de poros na membrana celular e possui interação com o lipídeo II, causando a inibição da síntese da parede celular do microrganismo alvo (PAIVA et al., 2011; NEGASH; TSEHAI, 2020). O uso da bovicina HC5 em culturas mistas de bactérias ruminais reduziu a produção de amônia, de forma similar ao ionóforo monensina (LIMA et al., 2009). Em cultivo *in vitro* de culturas mistas de microrganismos do rúmen, a adição da bovicina HC5 reduziu cerca de 50% a produção de metano, nas seis primeiras horas de incubação (LEE et al., 2002).

Em estudos com o uso da bovicina HC5 para o controle de patógenos, observou-se que o peptídeo é capaz inibir bactérias causadoras da mastite bovina e que a ação da bacteriocina poderia ser potencializada por meio do uso associado com outras bacteriocinas (SANTOS et al., 2019). Além disso, o uso combinado de bacteriocinas com agentes quelantes pode aumentar a eficácia das bacteriocinas contra Gram-negativas, causando a desorganização da membrana externa dessas bactérias (PARADA et al., 2007). De modo similar, a eficiência das bacteriocinas pode ser otimizada a partir da combinação com outras moléculas ou agentes antimicrobianos (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

1.4. Estratégias para potencializar o efeito de agentes antimicrobianos e moduladores de microbiota

A utilização de produtos alternativos aos antibióticos convencionais já demonstrou ter efeito positivo como promotor de crescimento em ruminantes (LILLEHOJ et al., 2018). No entanto, ainda apresenta resultados que variam de acordo com as condições experimentais, por isso existe uma necessidade da realização de estudos que visem demonstrar o modo de ação destes compostos. Além de abordar a influência de determinados fatores, como os tipos de dieta, as diferentes dosagens e a combinação com outros compostos no efeito do uso dos antibióticos não convencionais (YANG et al., 2015). Tendo em vista contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo alimentar mais robustas. Na busca por preencher estas

lacunas têm-se desenvolvido estudos com o objetivo de descobrir os diferentes modos de ação dos compostos naturais e de substâncias convencionais, visando a identificação de possíveis interações benéficas capaz de melhorar ações terapêuticas de interesse (CALSAMIGLIA et al., 2007; ALMAGUER et al., 2014; YANG et al., 2015).

Foi evidenciado que diversos compostos alternativos aos promotores de crescimento, possuíam propriedades e efeitos similares aos antibióticos utilizados na modulação da fermentação ruminal (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013). No entanto, há indícios que alguns compostos naturais possuem sítios de ação não seletivos, diferente da atividade antimicrobiana exercida pelos antibióticos convencionais. Portanto, tem-se estudado o uso de forma combinada como estratégia para potencializar os efeitos dos aditivos, visando avaliar a ocorrência de sinergismos entre as moléculas e desenvolver alternativas eficazes para aumentar a eficiência alimentar e reduzir os impactos na pressão de seleção sobre a microbiota ruminal aos antibióticos tradicionais (ADWAN; ABU-SHANAB; ADWAN, 2009; CAPELARI; POWERS, 2017).

A combinação de nitrato de cálcio e monensina sódica afetou a fermentação ruminal *in vitro*, inibindo a produção de metano, favorecendo a rotas de fermentação mais eficientes, como a formação do propionato no experimento com dieta de alto concentrado (CAPELARI; POWERS, 2017). Não foi constatado o efeito da combinação de óleos essenciais e monensina na inibição da metanogênese e na redução na contagem de protozoários em cultivo *in vitro* (YE et al., 2018). Contudo, a inclusão conjunta de tanino de carvalho (*Quercus robur*) e lúpulos (*Humulus lupulus*) em vacas alimentadas com dieta de baixo N e suplementadas com linhaça, reduziu em cerca de 7% a excreção de N na urina e melhorou o perfil de ácidos graxos do leite (FOCANT et al., 2019).

Além disso, o uso combinado de extrato de lúpulo e monensina, potencializou o efeito da monensina na modulação ruminal e alteração da microbiota do rúmen (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013). Enquanto a adição da mistura de β -ácidos obtido a partir de extrato de lúpulo afetou a produção de amônia por bactérias ruminais mistas e inibiu o crescimento de culturas puras de bactérias hiperprodutoras de amônia (FLYTHE, 2009). Os alfa e beta ácidos que estão presentes no extrato de lúpulo demonstram ter modos de ação diferentes e menos específicos em relação aos ionóforos convencionais, isto sugere que estes compostos possuem propriedades em potencial para a elaboração de estratégias, como o uso combinado de aditivos que

visam contornar o desenvolvimento de mecanismos de resistência (TEUBER; SCHMALRECK, 1973; FLYTHE et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **African journal of biotechnology**, v. 8, n. 17, 2009.
- ALGBURI, A. et al. Subtilisin prevents biofilm formation by inhibiting bacterial quorum sensing. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 9, n. 1, p. 81-90, 2017.
- ALMAGUER, C. et al. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- ANDRE, C. et al. Changes in the composition and architecture of staphylococcal biofilm by nisin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1083-1090, 2019.
- ANDREAZZI, A. S. R et al. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 8, p. 7199-7207, 2018.
- ARRIOLA, K. G. et al. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4513-4527, 2017.
- BABANDI, B. et al. The Roles of Ionophores in Ruminant Animals nutrition: A Review. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.13, p. 46-51, 2020.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of dairy science**, v. 88, p. E9-E21, 2005.
- BERCHIELLI, T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**. 2^a ed., Jaboticabal, 2011. 616p.
- BOSÁK, J. et al. Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 3, p. 309-322, 2021.
- BUSQUET, M. et al. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2508-2516, 2005.
- CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.
- CAPELARI, M.; POWERS, W. The effect of nitrate and monensin on in vitro ruminal fermentation. **Journal of animal science**, v. 95, n. 11, p. 5112-5123, 2017.
- CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1685-1691, 2008.
- CEOTTO-VIGODER, H. et al. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 1, p. 101-114, 2016.

- CHATTOPADHYAY, M. K. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 334, 2014.
- CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.
- CHUMCHALOVA, J.; SMARDA, J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. **Folia microbiologica**, v. 48, n. 1, p. 111-115, 2003.
- CHUNG, Y.H. et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1419-1427, 2012.
- CORR, S. C. et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 18, p. 7617-7621, 2007.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P; HILL, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95-105, 2013.
- DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International dairy journal**, v. 16, n. 9, p. 1058-1071, 2006.
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.
- DICKS, L. MT et al. A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut–blood barrier?. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2297, 2018.
- DIEP, D. B. et al. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2384-2389, 2007.
- 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, 2008.
- FIELD, D. et al. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. **Bioengineered**, v. 6, n. 4, p. 187-192, 2015.
- FINLAY, B. J. et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS microbiology letters**, v. 117, n. 2, p. 157-161, 1994.
- FOCANT, M. et al. The effect of oak tannin (*Quercus robur*) and hops (*Humulus lupulus*) on dietary nitrogen efficiency, methane emission, and milk fatty acid composition of dairy cows fed a low-protein diet including linseed. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 2, p. 1144-1159, 2019.
- FLYTHE, M. D. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 712-717, 2009.
- FLYTHE, M. D.; AIKEN, G. E. Effects of hops (*Humulus lupulus* L.) extract on volatile fatty acid production by rumen bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1169-1176, 2010.

- FLYTHER, M. D. et al. Hops (*Humulus lupulus* L.) bitter acids: modulation of rumen fermentation and potential as an alternative growth promoter. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 131, 2017.
- GALMESSA, U. et al. Rumen manipulation: one of the promising strategies to improve livestock productivity-review. **Dairy and Veterinary Sciences Journal**, v. 9, n. 2, p. 555758, 2019.
- GARSA, A. K. et al. Bovicins: the bacteriocins of streptococci and their potential in methane mitigation. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 4, p. 1403-1413, 2019.
- GEORGALAKI, M. D. et al. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5891-5903, 2002.
- GHALI, M. B.; SCOTT, P. T.; AL JASSIM, R. A. M. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. **Letters in applied microbiology**, v. 39, n. 4, p. 341-346, 2004.
- 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, 2006.
- GUINANE, C. M. et al. Impact of environmental factors on bacteriocin promoter activity in gut-derived *Lactobacillus salivarius*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 22, p. 7851-7859, 2015.
- HE, Z. X. et al. Using a fibrolytic enzyme in barley-based diets containing wheat dried distillers grains with solubles: ruminal fermentation, digestibility, and growth performance of feedlot steers. *Journal of Animal Science*, v. 92, n. 9, p. 3978-3987, 2014.
- HOANG, K. V.; STERN, N. J.; LIN, J. Development and stability of bacteriocin resistance in *Campylobacter* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1544-1550, 2011.
- HOULIHAN, A. J.; RUSSELL, J. B. Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to target bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 100, n. 1, p. 168-174, 2006.
- IQBAL, S. et al. Feeding barley grain steeped in lactic acid modulates rumen fermentation patterns and increases milk fat content in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 6023-6032, 2009.
- JOUANY, J.P.; MORGAVI, D. P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**, v. 1, n. 10, p. 1443-1466, 2007.
- KALMOKOFF, M. L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R. M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins?. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2297-2306, 1996.
- KIM, H. et al. Essential oil mixture on rumen fermentation and microbial community—an in vitro study. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 32, n. 6, p. 808, 2019.

- KRETH, J. et al. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7193-7203, 2005.
- LAVRENCIC, A. et al. Influence of two hop (*Humulus lupulus* L.) varieties on in vitro dry matter and crude protein degradability and digestibility in ruminants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1248-1252, 2014.
- LEE, S. S. et al. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. **FEMS microbiology letters**, v. 217, n. 1, p. 51-55, 2002.
- LILLEHOJ, H. et al. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 1-18, 2018.
- LIMA, J. R. et al. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. **FEMS microbiology letters**, v. 292, n. 1, p. 78-84, 2009.
- LIMEDE, A. C. et al. Effects of supplementation with narasin, salinomycin, or flavomycin on performance and ruminal fermentation characteristics of *Bos indicus* Nellore cattle fed with forage-based diets. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. 4, p. skab005, 2021.
- MANTOVANI, H. C. et al. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347-3352, 2002.
- MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247-2249, 2008.
- MAO, S. et al. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.
- MARQUES, R. S; COOKE, R. F. Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. *Animals*, v. 11, n. 10, p. 2871, 2021.
- MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 285-308, 2001.
- MEADE, E.; SLATTERY, M. A.; GARVEY, M. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 32, 2020.
- MINAMIKAWA, M. et al. Purification and characterization of warnericin RB4, anti-*Alicyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4. **Current microbiology**, v. 51, n. 1, p. 22-26, 2005.
- MOREIRA, S. M. et al. Stimulation of bovicin HC5 production and selection of improved bacteriocin-producing *Streptococcus equinus* HC5 variants. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 899-913, 2020.
- MORGAVI, D. P. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **animal**, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.

- NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2517-2522, 2013.
- NEGASH, A. W.; TSEHAI, B. A. Current applications of Bacteriocin. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.
- NES, I. F. et al. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2, p. 113-128, 1996.
- NEWBOLD, C. J. et al. The role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1313, 2015.
- OFTEDAL, T. F. et al. Ubericin K, a New Pore-Forming Bacteriocin Targeting mannose-PTS. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00299-21, 2021.
- OLIVEIRA, V. S. et al. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ciência Animal**, v.29, n.3, p.114-132, 2019.
- PAIVA, A. D. et al. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5284-5293, 2011.
- PAIVA, A. D. et al. Interaction with lipid II induces conformational changes in bovicin HC5 structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4586-4593, 2012.
- PARADA, J. L. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 512-542, 2007.
- PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2014.
- REN, Z. et al. Effects of antibacterial peptides on rumen fermentation function and rumen microorganisms in goats. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0221815, 2019.
- RETI, K. L. et al. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2013.
- RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.
- RUSSELL, James B.; RYCHLIK, Jennifer L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.
- 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, 2003.
- RUTKOWSKI, J.; BRZEZINSKI, B. Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

- SANTOS, F. G. et al. Efficacy of a ruminal bacteriocin against pure and mixed cultures of bovine mastitis pathogens. **Indian journal of microbiology**, v. 59, n. 3, p. 304-312, 2019.
- SANTOSO, B. et al. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. **Livestock Production Science**, v. 91, n. 3, p. 209-217, 2004.
- SAR, C. et al. Effect of nisin on ruminal methane production and nitrate/nitrite reduction in vitro. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 8, p. 803-810, 2005.
- SCHLEGEL, L. et al. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 631-645, 2003.
- SHEN, J. et al. Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently *in vitro*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1111, 2017.
- SHEN, Y. Z. et al. Feeding corn grain steeped in citric acid modulates rumen fermentation and inflammatory responses in dairy goats. **animal**, v. 13, n. 2, p. 301-308, 2019.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.
- SOLTANI, S. et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, p. fuaa039, 2021.
- TAMMINGA, S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3112-3124, 1996.
- TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal of environmental quality**, v. 32, n. 5, p. 1591-1602, 2003.
- UNGERFELD, E. M. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 37, 2015.
- VAN HEMERT, S. et al. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2010.
- TILBURG, A. Y. V. et al. Mini Bacillus PG10 as a Convenient and Effective Production Host for Lantibiotics. **ACS synthetic biology**, v. 9, n. 7, p. 1833-1842, 2020.
- VIECO-SAIZ, N. et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 57, 2019.

- VYAS, D.; BEAUCHEMIN, K. A.; KOENIG, K. M. Using organic acids to control subacute ruminal acidosis and fermentation in feedlot cattle fed a high-grain diet. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 8, p. 3950-3958, 2015.
- WANG, J. et al. Bovicin HJ50-like lantibiotics, a novel subgroup of lantibiotics featured by an indispensable disulfide bridge. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97121, 2014.
- WHITFORD, M. F. et al. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 569-574, 2001.
- XIAO, H. et al. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. **Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 103-108, 2004.
- YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 241, 2014.
- YANG, C. et al. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 137-156, 2015.
- YE, D. et al. Essential oil and monensin affect ruminal fermentation and the protozoal population in continuous culture. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 5069-5081, 2018.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **Apcbee Procedia**, v. 2, p. 50-56, 2012.
- ZHAO, F. F. et al. Tannic Acid-Steeped Corn Grain Modulates in vitro Ruminal Fermentation Pattern and Microbial Metabolic Pathways. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.
- ZHENG, S.; SONOMOTO, K. Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 10, p. 4243-4253, 2018.
- ZHOU, R. et al. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2303-2314, 2020.
- ZILIO, E. M. C et al. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4179-4189, 2019.

CAPÍTULO 2

2. Efeitos de bovicina HC5 e de alfa-ácidos do lúpulo na fermentação ruminal *in vitro*.

2.1. INTRODUÇÃO

A relação de simbiose entre os ruminantes e os microrganismos do rúmen propicia a degradação do substrato dietético, geração de energia e precursores que são assimilados pelo metabolismo dos animais (RUSSELL; WALLACE, 1997). Contudo, durante o processo de fermentação ocorrem perdas energéticas por meio da liberação de gases, como o metano, excreção de amônia, além do desbalanceamento entre a produção de amônia e a síntese de proteína microbiana (UNGERFELD, 2015; VAN LINGEN et al., 2016). A modulação da fermentação ruminal tem o intuito de melhorar o aproveitamento da dieta, otimizando a eficiência da fermentação ruminal e reduzindo os custos na produção de ruminantes (CALSAMIGLIA et al., 2007; UNGERFELD, 2015).

A utilização de antibióticos na cadeia produtiva de bovinos é uma prática recorrente para a profilaxia, metafilaxia e promoção de crescimento animal (CAMERON; MCALLISTER, 2016). No entanto, o uso dos promotores de crescimento vem sofrendo restrições, tendo em vista que estudos demonstram o aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibióticos no trato gastrointestinal dos animais de produção e no ambiente da fazenda (WICHMANN et al., 2014; HITCH et al., 2018). Neste contexto, as pesquisas por compostos alternativos aos antibióticos têm se intensificado.

Alguns produtos alternativos aos antibióticos tradicionais já demonstraram efeitos positivos como promotores de crescimento em ruminantes (YANG et al., 2015). No entanto, os resultados variam de acordo com as condições experimentais, havendo necessidade de estudos que avaliem o modo de ação de aditivos alternativos bem como a eficácia dos mesmos em diferentes tipos de dietas. Além disso, a combinação de compostos com diferentes mecanismos de ação pode potencializar a eficácia individual dos mesmos e contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo alimentar mais robustas (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013; LILLEHOJ et al., 2018).

Novas estratégias alimentares como o uso de extratos de lúpulos e peptídeos antimicrobianos são vistas como alternativas em potencial aos antibióticos

convencionais. A bovicina HC5 é um peptídeo antimicrobiano produzido por bactérias que possuem múltiplas aplicações e atuam na formação de poros na membrana celular de bactérias (PAIVA et al., 2011; NEGASH; TSEHAI, 2020). O uso das bacteriocinas resultam em redução da produção de metano, diminuição da desaminação e inibição de bactérias hiperprodutoras de amônia (LIMA et al., 2009; SHEN et al., 2017).

O lactoStab é um alfa-ácido derivado do lúpulo (*Humulus lupulus*), usualmente utilizado em cervejarias para o controle de bactérias lácticas, capaz de inibir a produção de ácido acético e lático. Os constituintes do lúpulo interferem de forma não seletiva no transporte e no fluxo de íons na membrana celular de bactérias Gram-positivas (TEUBER; SCHMALRECK, 1973; FLYTHE et al., 2017). A adição de compostos derivados de lúpulos favorece a produção de propionato, diminui a proporção acetato/propionato e a produção de amônia, (FLYTHE; AIKEN, 2010; FLYTHE et al., 2017). Além disso, foi evidenciado que o efeito de compostos bioativos de lúpulos pode ser potencializado quando aplicados de forma combinada (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013).

Embora peptídeos antimicrobianos e alfa-ácidos demonstrem potencial individualmente como aditivos capazes de reduzir as perdas de carbono e nitrogênio na fermentação ruminal, a associação desses compostos ainda não foi avaliada. Neste estudo será avaliada a hipótese de que o uso combinado de bovicina HC5 e lactoStab pode melhorar a eficiência de uso de substratos na fermentação ruminal, reduzindo as perdas de nitrogênio e carbono.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Produção, extração e purificação da bovicina HC5

A bovicina HC5 foi produzida a partir do cultivo anaeróbico (39 °C, 24h) da bactéria *S. equinus* HC5 em meio PC, contendo extrato de levedura (0,5 g / L), tripitacase (1 g / L), solução de carbonato de sódio 8%, glicose (8 g / L), solução A (40 mL / L) e solução B (40 mL / L) (MANTOVANI et al., 2002). Na etapa de extração o pH da cultura foi ajustado para 7,0, logo após foi aquecido a 70 °C por 30 minutos e centrifugado (10000 g, 20 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em cloreto de sódio ácido (100 mM, pH 2,0, 2 h, 4°C) (MANTOVANI et al 2003; MOREIRA et al., 2018). A purificação foi realizada por meio da técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando um cartucho de extração SPE C18, com a

adição do ácido fórmico para a remoção de interferentes e da acetonitrila para as etapas de condicionamento do cartucho e eluição da bovicina HC5, seguida de aquecimento em banho-maria a 90 °C por 30 min ou até metade do conteúdo do microtubo ter evaporado. Após a remoção dos solventes, a solução foi liofilizada e resuspendida em solução ácida de NaCl (100 mM, pH 2,0) e mantida à 4°C.

2.2.2. Coleta de líquido ruminal

As coletas foram realizadas nas instalações da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL) e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal da Universidade Federal de Viçosa. Todos os procedimentos de coleta e manejo seguiram o protocolo aprovado pelas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP), sob o Protocolo N° 01/2022.

O líquido ruminal foi coletado de duas vacas da raça Holandesa em lactação, peso médio de 530 kg e portadoras de fistula ruminal, escolhidas por meio de amostragem aleatória. Os animais foram alimentados com dieta à base de silagem de milho (62%) e feno de *Coast cross* (5%) como volumoso, fubá de milho (13%), farelo de soja (12%), caroço de algodão (15%), ureia e suplementação mineral (1,5 %).

Foi coletado aproximadamente 1 L de líquido ruminal na região dorsal e ventral do rúmen de cada animal, filtrado em quatro camadas de gaze, e acondicionado em caixa térmica, sendo imediatamente encaminhado para o laboratório, mantido a 39 °C na BOD por 30 min, após a separação de fases foi retirada a fase intermediária, e para a determinação da concentração subinibitória foi utilizado o líquido ruminal clarificado por centrifugação (10.000g, 10 min), mantidos sob aspensão de CO₂. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado.

2.2.3. Determinação da concentração subinibitória dos antimicrobianos

Diluições seriadas das soluções estoque de bovicina HC5 (3 mg / mL) e lactoStab® comercial (LNF, Rio Grande do Sul, Brasil) foram utilizadas para determinar *in vitro* o efeito dos antimicrobianos no crescimento de culturas mistas de microrganismos do rúmen. Utilizando o método de microdiluição (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). Foram realizadas diluições seriadas em placas de 96 poços, contendo líquido ruminal clarificado, meio PC suplementado com glicose a 1,4% (m/v) e o inóculo com densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Este experimento foi realizado com os tratamentos e

concentrações de antimicrobianos descritos na Tabela 1. Populações mistas de microrganismos sem exposição aos antimicrobianos foram utilizadas como controle.

Tabela 1. Distribuição dos tratamentos e controles na placa de 96 poços para avaliação do efeito de inibidores no crescimento de microrganismos do rúmen.

Tratamentos	Concentrações							
B¹	20 μM	10 μM	5 μM	2,5 μM	1,25 μM	0,625 μM	0,312 μM	0,15 μM
L²	2000 ppm	1000 ppm	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62,5 ppm	31,25 ppm	15,625 ppm
B + L³	20 μM + 500 ppm	10 μM + 500 ppm	5 μM + 500 ppm	2,5 μM + 500 ppm	1,25 μM + 500 ppm	0,625μ M+500 ppm	0,312 μM + 500 ppm	0,15μM+5 00 ppm
L + B⁴	2000 ppm + 5 μM	1000 ppm + 5 μM	500p pm + 5 μM	250 ppm + 5 μM	125 ppm + 5 μM	62,5 ppm + 5 μM	31,25p pm + 5 μM	15,625 ppm + 5 μM

¹B = Bovicina HC5 (20 μM a 0,15 μM); ²L = LactoStab (2000 ppm a 15,625 ppm); ³B + L = Bovicina HC5 e LactoStab (20 μM a 0,15 μM + 500 ppm); ⁴L + B = LactoStab e Bovicina HC5 (2000 ppm a 15,625 ppm + 5 μM)

O líquido ruminal utilizado nas incubações foi processado sob aspersão de CO₂. As microplacas foram incubadas nos tempos (6h, 18h e 24h) a 39 °C em câmara de anaerobiose e a leitura da DO₆₀₀ foi realizada nos tempos indicados em leitor (espectrofotômetro) de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan 60, Madison, WI, USA). Foram avaliadas a velocidade específica de crescimento e a DO máxima das culturas.

2.2.4. Análise bromatológica do substrato

A composição bromatológica da dieta experimental utilizada nas incubações, foi determinada conforme indicado na Tabela 2. A análise da matéria seca foi realizada de acordo com os procedimentos da Association of Analytical Chemists (AOAC, 2005). O extrato etéreo foi determinado em extrator Soxhlet (INCT-CA G-004/1, Detmann et al., 2012). A avaliação da proteína bruta pelo método de Kjeldahl, utilizando uma etapa de digestão, seguido pela etapa com a utilização de destilador a vapor do tipo Kjeldahl e titulação com HCl (0,05 N) (INCT-CA N-001/1, Detmann et al., 2012). Para a determinação da fibra em detergente neutro (FDN) foi utilizada α-amilase termoestável sem adição de sulfato de sódio (INCT-CA F-002/1, Detmann et al., 2012). O cálculo

do NDT foi obtido a partir da equação proposta pelo NRC (2001). O valor de PDR foi estimado em função da PB sendo calculada com a equação descrita por Orskov e McDonald (1979). A análise de PNDR foi realizada de acordo com Pereira et al. (2005).

Tabela 2. Proporção de ingredientes e composição química do substrato utilizado nos ensaios *in vitro* com adição de líquido ruminal.

Ingredientes	% da matéria seca
Silagem de milho	20,0
Fubá de milho	70,31
Farelo de soja	5,57
Ureia AS	1,0
Núcleo mineral	3,0
Virginiamicina	0,13

Composição Química	% da matéria seca
Proteína Bruta	13,0
Extrato Etéreo	3,49
FDN ¹	20,80
NDT ²	78,05
PDR ³	7,91
PNDR ⁴	5,09

¹FDN – Fibra em Detergente Neutro; ²NDT – Nutrientes Digestíveis Totais; ³PDR – Proteína Degradável no Rúmen; ⁴PNDR – Proteína não Degradável no Rúmen

2.2.5. Incubação *in vitro*

A incubação foi realizada em frascos de vidro de 50 mL, com tampas de borracha e lacres de alumínio, contendo 20 mL de volume final. Em cada frasco foi adicionada a solução tampão e o líquido ruminal na proporção 3:1, além de 250 mg do substrato. Todo procedimento foi realizado sob aspensão de CO₂, visando manter a condição de anaerobiose.

A solução tampão foi preparada com saliva artificial McDougall, citada por Silva e Queiroz (2005), constituída por: 9,80 g/L de NaHCO₃; 3,71 g/L de Na₂HPO₄ anidro; 0,57 g/L KCl; 0,47 g/L de NaCl; 0,12 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,05 g/L de CaCl₂.2H₂O. O preparo da solução foi realizado 24 h antes da coleta do líquido ruminal e armazenado

em estufa a 39 °C. Antes da utilização, a solução foi mantida em condição anaeróbia, sob aspersão de CO₂.

Os frascos foram distribuídos de forma aleatória e incubados a 39 °C sob agitação (180 rpm). Alíquotas de 1 mL de cada tratamento foram coletadas em diferentes tempos de incubação (0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h), e armazenadas a -80 °C para análise de ácidos orgânicos voláteis, amônia, proteína solúvel e proteína microbiana. A produção de gás também foi avaliada nos tempos supracitados (descrição no item 2.2.5.3.) e o pH ruminal foi mensurado em pHmetro de bancada (TecnoPON Company, Piracicaba, SP, Brasil) ao término da incubação (48 h). As incubações foram conduzidas com duas repetições biológicas e quatro replicatas técnicas.

2.2.5.1. Produção de Ácidos orgânicos

A análise de ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Alíquotas de 1 mL foram coletadas após 0 h, 6 h, 9 h e 24h de incubação e armazenadas a -80°C até a análise. Para a análise de ácidos orgânicos, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 10000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi tratado com 600 µL de hidróxido de cálcio e 300 µL de sulfato cúprico (SIEGFRIED et al.,1984). As amostras foram analisadas em cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 45°C, e coluna Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm mantida a 45°C. O ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5,0 mM com fluxo de 0,7 mL/min foi utilizado como fase móvel. Diluições seriadas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32) das seguintes soluções estoque de ácidos orgânicos foram utilizadas para calibração da curva padrão: ácido propiônico (60 mM), ácido acético (60 mM), ácido butírico (20 mM), ácido valérico (20 mM), ácido isovalérico (5 mM), ácido isobutírico (10 mM), e ácido láctico (50 mM) (SIEGFRIED et al.,1984). Ácido crotônico (12,5 mM) foi utilizado como padrão interno das amostras.

2.2.5.2. Concentração de amônia, proteína microbiana e proteína solúvel

A concentração de amônia foi determinada pelo método colorimétrico adaptado de Chaney e Marbach (1962), utilizando cloreto de amônio (NH₄Cl) como padrão. As amostras (5 µL) do sobrenadante foram tratadas com 100 µL de fenol, 100 µL hipoclorito de sódio, em placas de 96 poços, e mantidas a 39°C por 20 min. A absorbância foi medida a 630 nm, em espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan 60, Madison, WI, USA).

A proteína microbiana foi determinada a partir da centrifugação de 1 mL de amostra incubada, seguido pelo descarte do sobrenadante e digestão do *pellet* com NaOH (0,2 mol/L) a 100°C por 15 min. A quantificação da proteína microbiana e da proteína solúvel foi feita conforme descrito por Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

2.2.5.3. Produção de gás

A produção de gás foi estimada a partir da mensuração de gás dos frascos contendo 20 mL, incubados a 39 °C nos tempos (6h, 9h, 18h, 24h e 48h), utilizando o método adaptado da proveta invertida (VAZ; ACCIARI; CODARO, 2011). Foi utilizado um béquer de 500 mL, uma proveta de 50 mL, acoplada a uma mangueira e uma seringa contendo agulha. O volume da coluna de água utilizada foi de 300 mL, a tampa de borracha dos frascos era perfurada com auxílio da agulha e o volume da produção de gás era estimada de acordo com o deslocamento da coluna de água.

A curva cumulativa da produção de gás e os parâmetros cinéticos foram estimados de acordo com o modelo de Gompertz (SCHOFIELD; PITT; PELL, 1994):

$$GP_{(t)} = A \times e\{(-L \times e^{(-\mu \times T)})\}$$

Em que GP(t) é a produção cumulativa de gás (mL), A é o volume assintótico da produção de gás (mL), L é Tempo de atraso (h), μ é a taxa da produção de gás (%/h) e T é o tempo de incubação (h).

2.2.6. Digestibilidade *in vitro*

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram realizados em frascos de vidro de 50 mL, com tampas de borracha e lacres de alumínio, contendo 30 mL de volume final. Foi adicionado 375 mg do substrato (dieta), solução tampão (descrição no item 2.2.5) e o líquido ruminal na proporção 3:1. Todo procedimento foi realizado sob aspersão de CO₂ livre do oxigênio.

Foram avaliados quatro tratamentos: C (controle sem adição de antimicrobianos), B (bovicina HC5, 5 μ M), L (lactoStab, 100 ppm), e B+L (combinação bovicina HC5 5 μ M e lactoStab 100 ppm). As concentrações testadas foram selecionadas a partir de experimentos preliminares para avaliar a concentração desses inibidores capaz de reduzir o crescimento de culturas mistas de

microrganismos do rúmen. Cada tratamento foi conduzido com duas replicatas técnicas e duas réplicas biológicas.

Após 48 h de incubação a 39 °C e mantidos sob agitação (180 rpm), os frascos foram abertos, o conteúdo transferido para cadinhos de vidro (JS), com placa porosa nº 0, submetidos à filtração a vácuo, e adição de água destilada fervente para auxiliar a filtração. O resíduo foi seco em estufa a 105 °C por 24 h e a massa seca determinada em balança analítica (SILVA et al., 2017).

2.2.7. Análises estatísticas

Os dados das variáveis (DIVMS, pH, concentração de amônia, concentração de proteína solúvel, concentração de proteína microbiana, perfil de ácidos orgânicos voláteis produção cumulativa de gás e parâmetros cinéticos) foram previamente testados sobre as pressuposições da ANOVA e constatado a distribuição não normal. Os dados foram submetidos a análise não paramétrica e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste Kruskal Wallis, utilizando o software R (versão 4.1.0). Os efeitos com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo.

2.3. RESULTADOS

A seleção dos antimicrobianos avaliados neste estudo foi realizada em microplacas de 96 poços onde foram identificadas concentrações subinibitórias dos agentes antimicrobianos. A concentração de 5 μM de bovicina HC5 e 100 ppm de lactoStab, isoladamente e em combinação, reduziram parcialmente a formação de biomassa microbiana (Figura 1), e foram utilizadas nos experimentos *in vitro*.

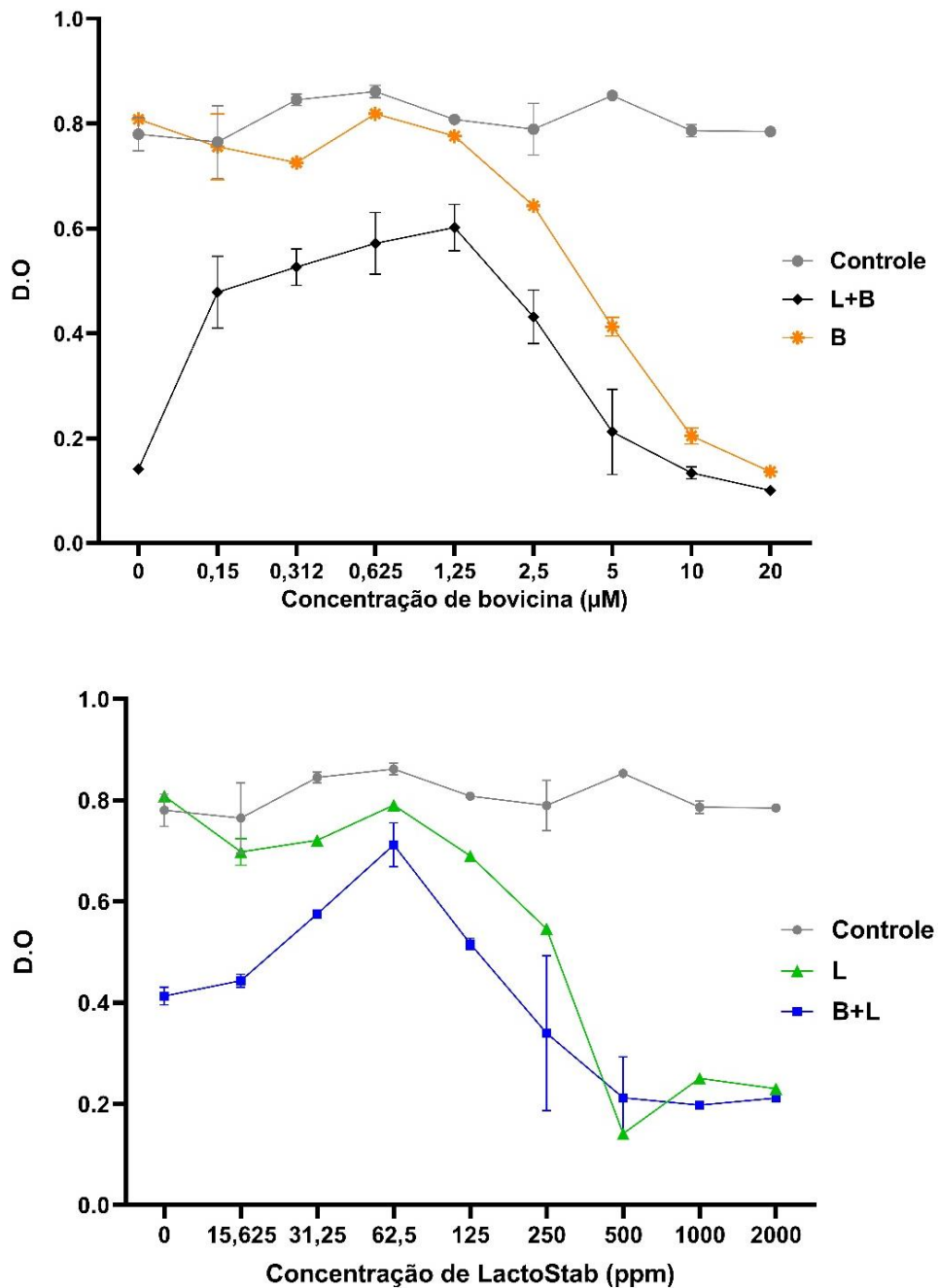


Figura 1. Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou as combinações bovicina HC5 e lactoStab (B + L), e lactoStab e bovicina HC5 (L+B) na Densidade Óptica (D.O) em cultura mista de microrganismos do rúmen.

Em incubação *in vitro* com substrato à base de fubá e silagem de milho não foi constatado efeito significativo dos antimicrobianos na digestibilidade *in vitro* da matéria seca e na produção de gás (Tabela 3). Os tratamentos com bovicina HC5 (B), lactoStab (L), e a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B+L) apresentaram redução de 2,85%, 2,55% e 3,9%, respectivamente, no pH em relação ao grupo controle. A combinação B+L reduziu significativamente ($p < 0,05$) o pH final da incubação em comparação com o controle.

Tabela 3 – Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L) sobre Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), pH ruminal (pH), Produção de gás (PG), Concentração de amônia (NH₃), Concentração de proteína solúvel, Concentração de proteína microbiana, Ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), Acetato, Propionato, Relação acetato / propionato (A / P), e as proporções de acetato (A), propionato (P) e butirato (B).

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	p-valor ³
	C	B	L	B + L		
DIVMS (%)*	64,50	64,36	63,82	64,52	0,16	0,39
pH*	6,66a	6,47ab	6,49ab	6,4b	0,03	<0,05
PG*	18,41	17,56	20,12	18,33	2,68	0,79
NH ₃ (mg/L)*	16,94	15,88	16,15	15,84	0,45	0,54
Proteína solúvel (µg/mL)*	263,59ab	268,16a	253,13bc	251,49c	2,65	<0,05
Proteína microbiana (µg/mL)*	247,29b	257,15a	253,16ab	256,70a	1,63	<0,05
AOV (mmol / L)**	34,72b	39,15a	36,74ab	36,99ab	0,64	<0,05
Acetato (mmol / L)**	17,08	17,59	17,42	15,99	0,55	0,56
Propionato (mmol / L)**	12,57c	16,62a	13,89b	16,25a	0,41	<0,05
Butirato (mmol / L)**	3,40a	2,97ab	3,32a	2,71b	0,09	<0,05
Isobutirato (mmol / L)**	0,29	0,29	0,29	0,34	0,02	0,96
Valerato (mmol / L)**	0,56	0,60	0,69	0,62	0,03	0,60
Isovalerato (mmol / L)**	0,29bc	0,35a	0,33ab	0,28c	0,01	<0,05
A:P#	1,47a	1,30ab	1,44a	1,17b	0,04	<0,05
A**	49,36a	46,51a b	48,21ab	43,38b	0,01	<0,05
P**	34,83b	38,96a	35,28b	41,80a	0,01	<0,05
B**	10,22a	8,71c	9,72b	7,07d	0,01	<0,05

¹Os tratamentos consistiram em **C** = controle (sem antimicrobiano), **B**= bovicina HC5 (5 µM), **L**= lactoStab (100 ppm) ou a combinação **B+L**= bovicina HC5 e lactoStab (5 µM + 100 ppm); ²Erro padrão da média; ³Médias seguidas pelas mesmas letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$); #Relação entre acetato e propionato; *Variáveis determinadas após 48 horas de incubação; **Perfil de ácidos orgânicos voláteis determinado após 24 horas de incubação.

Não houve diferença entre os tratamentos na produção cumulativa de gás durante 48 horas de incubação (Figura 2).

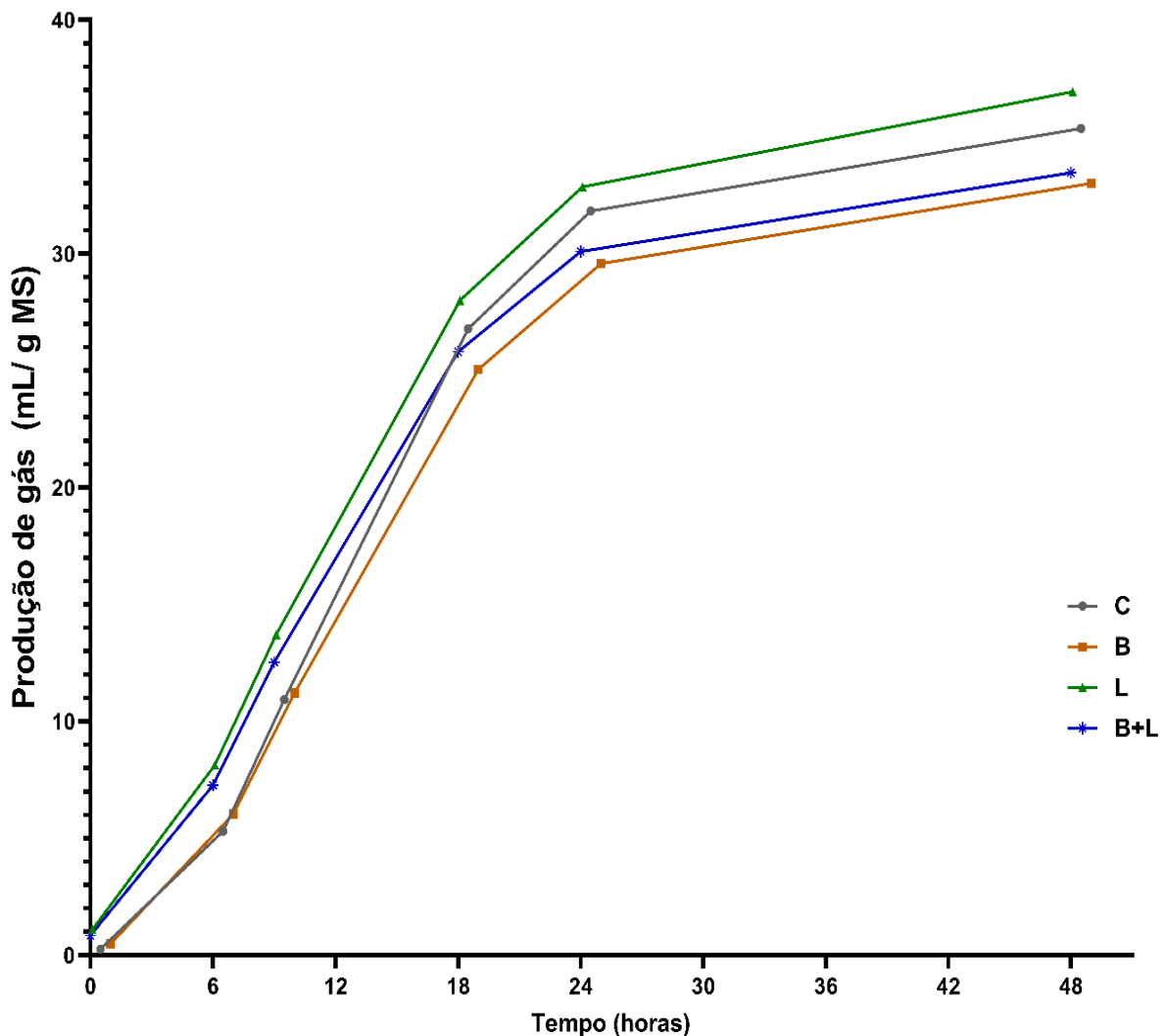


Figura 2. Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L) na produção de gás (mL / g MS), durante os intervalos (0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h) de incubação *in vitro*.

Os tratamentos contendo bovicina HC5 ou a combinação B+L, reduziram o volume de gás assintótico em 6,55 % e 5,28%, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 4). O valor da fase lag no grupo controle foi de 4,95 h, enquanto que o tempo no ponto de inflexão foi 10,01 h. No entanto, a adição dos antimicrobianos não afetou os parâmetros cinéticos da produção de gás em relação ao controle.

Tabela 4 – Estimativa dos parâmetros cinéticos da produção de gás *in vitro* após 48 horas de incubação com adição da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L).

Parâmetros ¹	Tratamentos ²				EPM ³	p-valor ⁴
	C	B	L	B+L		
A (mL) ⁵	35,53	33,08	37,03	33,55	0,70	0,20
L (h) ⁶	5,28	4,60	3,78	3,87	0,32	0,57
T1/2(h) ⁷	10,08	9,59	8,82	8,85	0,35	0,58
μ (%/h) ⁸	0,16	0,16	0,14	0,15	0,01	0,80

¹Os parâmetros da cinética da produção de gás foram estimados a partir do modelo de Gompertz (SCHOFIELD et al., 1994); ²Os tratamentos consistiram em **C** = controle (sem antimicrobiano), **B**= bovicina HC5 (5 μ M), **L**= lactoStab (100 ppm) ou a combinação **B+L**= bovicina HC5 e lactoStab (5 μ M + 100 ppm); ³Erro padrão da média; ⁴Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$); ⁵A = Volume assintótico da produção de gás; ⁶L = Tempo de atraso; ⁷T1/2 =Tempo no ponto de inflexão; ⁸ μ = Taxa da produção de gás

Não foi evidenciado efeito dos tratamentos na concentração de amônia em relação ao grupo controle (Tabela 3). Os valores da concentração média de amônia nos tratamentos com a adição da bovicina HC5 e a combinação B + L, foram 15,88 mg/L e 15,84 mg/L, respectivamente. No entanto a análise do acúmulo de amônia após 9 h e 48 h de incubação *in vitro*, revelou que o tratamento com bovicina HC5 reduziu a concentração total de amônia, quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 3A).

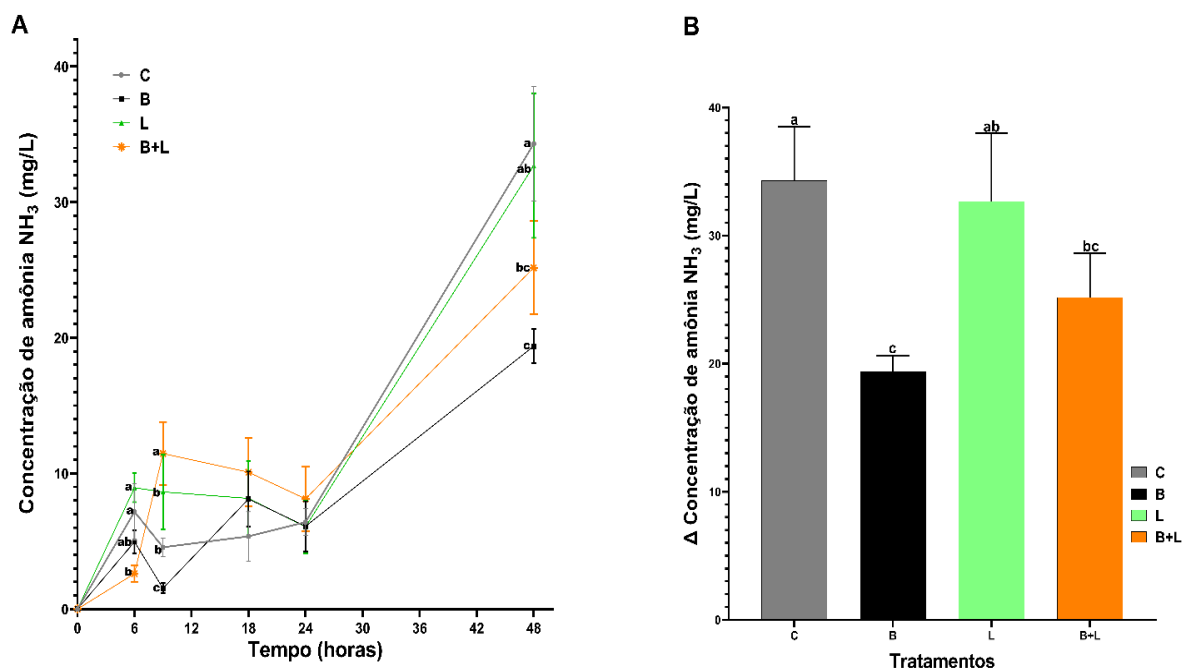


Figura 3. Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L), durante os intervalos (0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h) de incubação *in vitro* sobre **A**) A produção de amônia (mg / L); **B**) Δ Amônia. Significância ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos indicada pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. Δ = Valor final – Valor inicial.

Além disso, culturas tratadas com bovicina HC5 apresentaram menor valor de Δ Amônia (Figura 3B). A concentração total de proteína solúvel também foi maior no grupo controle e no tratamento com a bovicina HC5 ($p < 0,05$). Os tratamentos contendo lactoStab apresentaram redução ($p < 0,05$) na concentração de proteína solúvel (Tabela 3). No entanto, não foi constatado efeito dos antimicrobianos no Δ Proteína solúvel (Figura 4B). A concentração de proteína solúvel apresentou pico entre 6 e 9 h de incubação e aumentou novamente após 18 h (Figura 4A).

A concentração mais elevada de proteína solúvel ocorreu após 9 h de incubação no tratamento com adição da bovicina HC5 ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram concordância com o ponto de inflexão da produção de gás no tratamento com a bovicina HC5, o qual foi atingido após 9,53 h de incubação. Esse resultado sugere maior degradação do substrato, com conseqüente aumento na produção de gás e maior disponibilização de proteína solúvel (Figura 3A e Tabela 4).

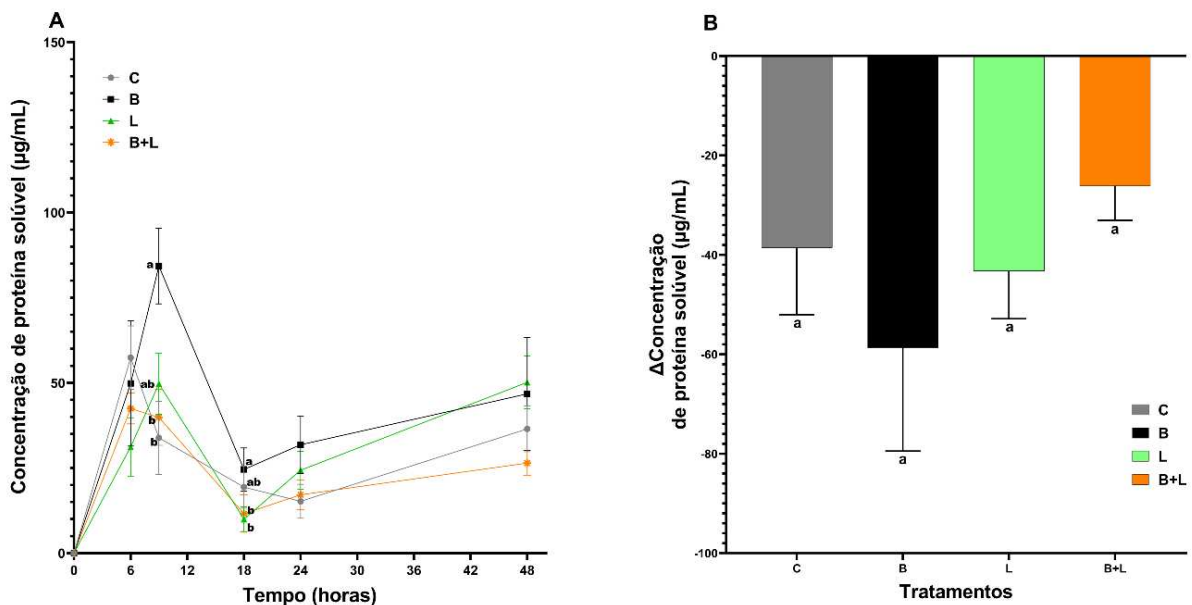


Figura 4. Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L), durante os intervalos (0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h) de incubação *in vitro* sobre **A**) A concentração de proteína solúvel ($\mu\text{g} / \text{mL}$); **B**) Δ Concentração de proteína solúvel. Significância ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos indicada pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Houve aumento da concentração total de proteína microbiana ($p < 0,05$) nos tratamentos com bovicina HC5 e na combinação com lactoStab, em que a concentração total de proteína foi de 257,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 256,70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Tabela 3).

Os tratamentos com os aditivos demonstram aumento significativo no acúmulo de proteína microbiana em relação ao controle. Após 9 h e 48 h o tratamento contendo

bovicina HC5 demonstrou maior concentração de proteína microbiana e menor concentração de amônia (Figura 5A, Figura 3A; $p < 0,05$), sugerindo redução da atividade de desaminação e aumento do direcionamento de amônia para a síntese de biomassa microbiana. Os antimicrobianos aumentaram a concentração da proteína microbiana resultando em maior valor de Δ Proteína microbiana quando comparado ao controle ($p < 0,05$; Figura 5B).

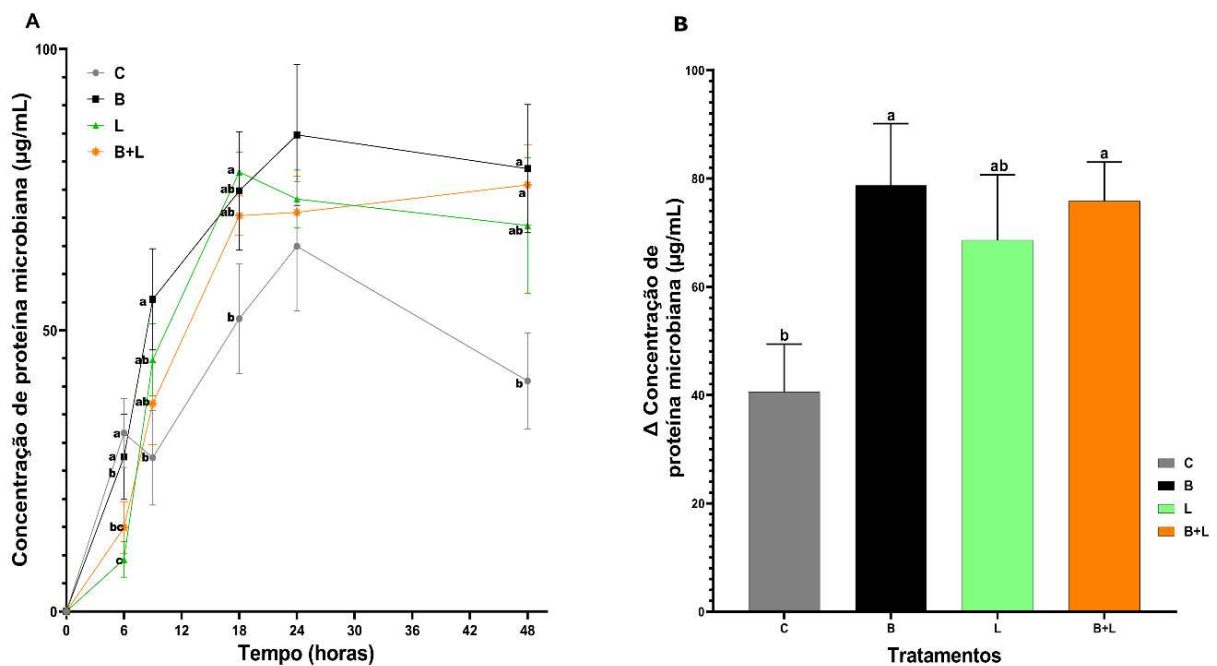


Figura 5. Efeito da bovicina HC5 (B), lactoStab (L) ou a combinação bovicina HC5 e lactoStab (B + L), durante os intervalos (0 h, 6 h, 9 h, 18 h, 24 h e 48 h) de incubação *in vitro* sobre **A**) A concentração de proteína microbiana ($\mu\text{g} / \text{mL}$); **B**) Δ Concentração de proteína microbiana. Significância ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos indicada pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

O cultivo de microrganismos ruminais na presença de bovicina HC5 resultou em aumento ($p < 0,05$) da concentração total de ácidos orgânicos totais (AOV) nos sistemas *in vitro* em relação ao controle (Tabela 3). Bovicina HC5 e a combinação, causaram aumento da concentração de propionato ($p < 0,05$). Enquanto, apenas a combinação reduziu da concentração de butirato ($p < 0,05$) e a relação acetato/propionato (Tabela 3).

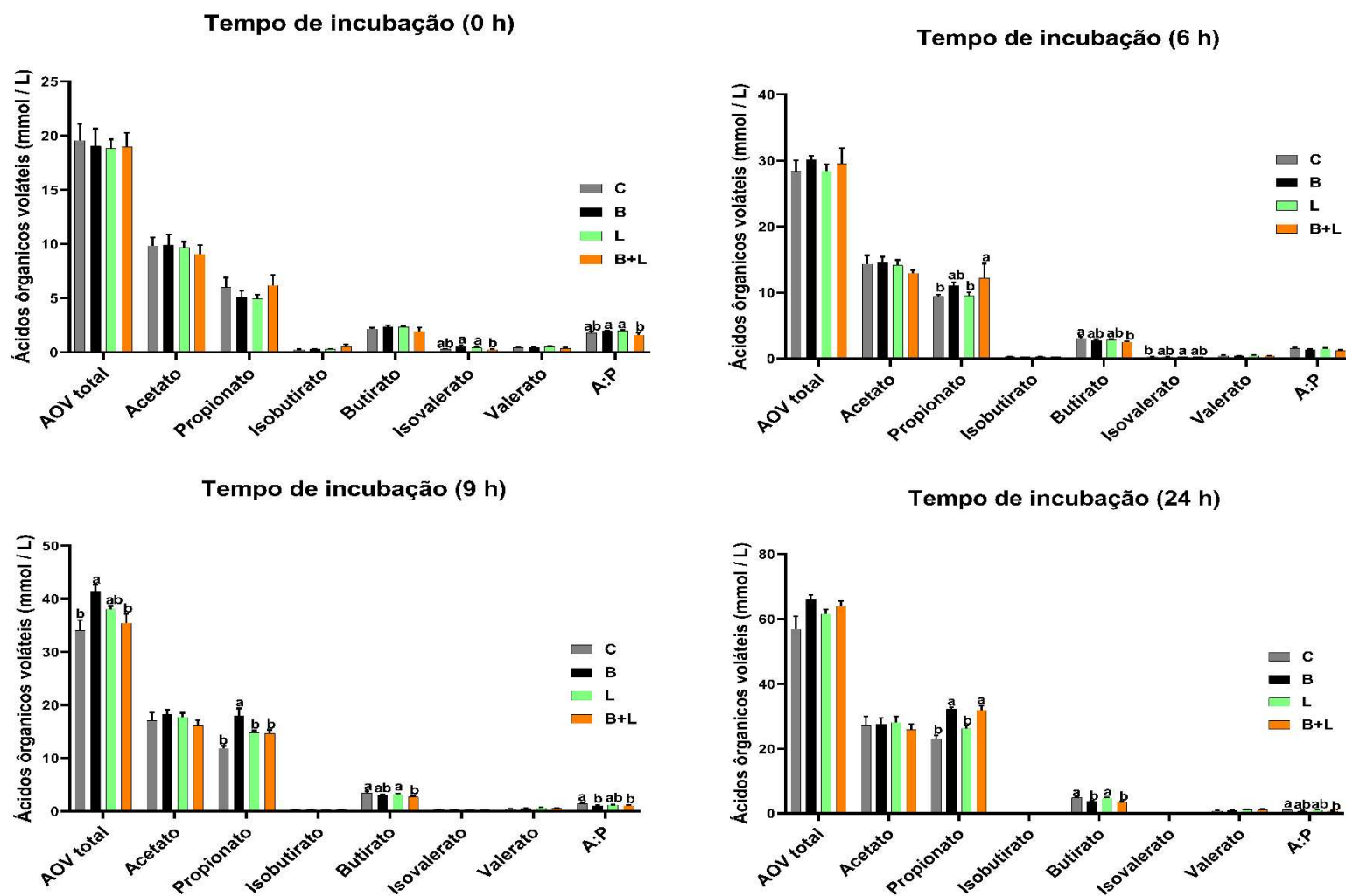


Figura 6. Efeito da bovicina HC5 (B, 5 μ M), lactoStab (L, 100 ppm) e a combinação bovicina HC5 e lactoStab (L+B, 5 μ M +100 ppm) no perfil de ácidos orgânicos voláteis (AOV; mmol / L), nos tempos 0h, 6h, 9h e 24h de incubação *in vitro*. Significância ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos indicada pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nos tempos 0 h, 9 h e 24 h a combinação reduziu ($p < 0,05$) a relação acetato/propionato (Figura 6), esse efeito foi refletido na redução ($p < 0,05$) da proporção de acetato e no aumento ($p < 0,05$) da proporção de propionato na combinação B+L (Tabela 3). No período de 6 h a 24 h o grupo B + L diminuiu ($p < 0,05$) a concentração de butirato (Figura 6). Os antimicrobianos afetaram ($p < 0,05$) a concentração de isovalerato nos tempos 0h e 6 h. Além disso, no período de 9 h a 24 h de incubação, a concentração de propionato foi maior ($p < 0,05$) no tratamento com bovicina HC5 (Figura 6). Não houve diferença na concentração de acetato dentre as amostras avaliadas (Figura 6).

Contudo, houve diferença no efeito dos antimicrobianos na proporção de AOV ($p < 0,05$; Tabela 3). A proporção de acetato foi menor no grupo B+L, enquanto a proporção de propionato foi maior nos tratamentos bovicina HC5 e B+L, com 38,96 % e 41,80 %, respectivamente. Foi observado a redução na concentração de butirato entre os inibidores testados. Semelhantemente, o tratamento com adição do lactoStab e o grupo controle apresentaram maior relação acetato/ propionato em comparação ao tratamento da combinação B + L ($p < 0,05$; Tabela 3).

2.4. DISCUSSÃO

As bactérias lácticas representam um grupo de microrganismos considerados seguros para uso em alimentos, além de serem reconhecidos como produtores de metabólitos multifuncionais, como as bacteriocinas. Os peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) tem sido sugerido como potenciais moléculas alternativas ao uso de antibióticos na produção animal (VIECO-SAIZ et al., 2019). Neste trabalho, foi avaliado *in vitro* o efeito da bacteriocina bovicina HC5 (B, 5 μ M), do composto lactoStab (L, 100 ppm) e da combinação bovicina HC5 e lactoStab (B+L, 5 μ M+100 ppm) sobre o crescimento e metabolismo de populações mistas de microrganismos ruminais incubados em anaerobiose.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca é um parâmetro importante para estimar o aproveitamento da dieta fornecida ao animal e indicar o grau de eficiência na fermentação ruminal. O presente estudo demonstrou que a adição dos antimicrobianos não diminuiu a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (Tabela 3). Em estudo anterior, foi reportado que o lantibiótico nisina, reduziu a produção de metano *in vitro*, sem afetar a digestibilidade da matéria seca (SHEN et al., 2017). O mesmo estudo indicou que a nisina demonstra ter potencial para

substituir a monensina, um ionóforo utilizado como promotor de crescimento em dietas de ruminantes (SHEN et al., 2017). Tipicamente, o uso de inibidores da metanogênese, resulta em redução da produção de gases pela microbiota ruminal e diminuição da digestibilidade da matéria seca (UNGERFELD, 2015; SHEN et al., 2017). No entanto, não existem dados na literatura sobre os efeitos *in vitro* da bovicina HC5 na digestibilidade dos alimentos fornecidos aos ruminantes.

As unidades experimentais tratadas com a combinação B + L, apresentaram menor valor de pH em relação ao controle após 48 horas de incubação (Tabela 3). No entanto, esta redução se manteve dentro do valor de pH ideal do rúmen, mesmo utilizando um substrato com maior proporção de concentrado na incubação *in vitro*. Em estudo desenvolvido a partir da Técnica de Simulação de Rúmen (RUSITEC), foi avaliado a influência da adição de linhagens de *S. bovis* no ambiente ruminal, sendo evidenciado efeito na redução do pH (APHALE et al., 2019). O uso da virginiamicina e de bovicina HC5 em cultivo *in vitro* com líquido ruminal acrescido de Trypticase, também demonstrou efeito na redução do pH ruminal (MOREIRA et al., 2018). Contudo, a utilização de extrato de lúpulo na dieta de ruminantes *in vivo* não afetou o pH ruminal (UWITUZE et al., 2010). Isto sugere que o uso de forma combinada dos inibidores analisados no presente estudo pode controlar a redução do pH ruminal.

Em contraste aos trabalhos descritos na literatura, os inibidores avaliados não afetaram a produção de gás e os parâmetros cinéticos de produção de gás (Tabela 3 e Tabela 4). Estudos anteriores de cultivo *in vitro* demonstraram que a adição de lúpulo (*Humulus lupulus*) na suplementação de dietas de ruminantes, reduziram a produção de gás (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013; LAVRENCIC et al., 2015), e efeitos similares foram reportados para a bovicina HC5, a qual reduziu cerca de 32 % a produção de gás durante a fermentação ruminal *in vitro* (MOREIRA et al., 2018). Os grupos suplementados com os inibidores apresentaram taxa da produção de gás (μ) e o valor do tempo no ponto de inflexão (T1/2) similares ao controle. Estudos sugerem que a taxa de degradação do substrato, e a atividade fermentativa estão relacionadas com a taxa de produção de gás e o ponto de inflexão. Portanto, demonstram que maior valor de μ e menor T1/2 pode sinalizar a ocorrência de inibição seletiva de determinados grupos microbianos, redução da taxa de crescimento microbiano, menor adesão dos microrganismos ao substrato e diminuição da atividade fermentativa (FRANCE et al., 2000; KHODABANDEHLOO et al., 2019).

A amônia produzida durante a fermentação ruminal pode ser incorporada a biomassa da microbiota do rúmen. No entanto, quando essa produção ocorre de forma excessiva, acarreta distúrbios metabólicos nos animais, além de gastos energéticos na reciclagem e excreção de nitrogênio (HAILEMARIAM et al., 2021). Estudos demonstram que certos aditivos podem reduzir as perdas decorrentes da desaminação de aminoácidos. Anteriormente, foi observado que a bovicina HC5 foi capaz de reduzir a desaminação e produção de amônia por bactérias mistas do rúmen (LIMA et al., 2009; MOREIRA et al., 2018). Embora no presente estudo, com substrato à base de fubá e silagem de milho, os tratamentos contendo bovicina HC5 ou lactoSatb, ou a combinação desses inibidores, não tenha afetado a concentração média de amônia *in vitro* (Tabela 3), observou-se que a combinação B+L reduziu a concentração de amônia após 6 h (3,08 mg/L) e 48 h (25,16 mg/L) de incubação.

Um estudo *in vitro* demonstrou redução na produção de amônia com o uso de lúpulo seco e extrato de lúpulos em culturas puras de bactérias hiperprodutoras de amônia e de bactérias ruminais mistas de vacas leiteiras (FLYTHE, 2009). No presente trabalho, os tratamentos com a bovicina HC5 apresentaram, nos tempos 9 h e 48 h, menor valor de concentração de amônia 8,63 mg / L e 19,38 mg / L, respectivamente (Figura 3A). O menor valor de Δ amônia para o tratamento contendo bovicina HC5 (Figura 3B), corrobora as observações anteriores indicando que a bovicina HC5 pode inibir a desaminação de aminoácidos por bactérias ruminais (LIMA et al., 2009). Este dado também sugere que a bovicina HC5 pode favorecer o fluxo de nitrogênio, em que há o consumo de compostos nitrogenados à medida que é disponibilizado pela degradação da proteína, conseqüentemente, reduz o acúmulo de amônia.

A concentração de proteína solúvel no tempo inicial não diferiu entre os tratamentos (Figura 4A). Isto pode ser explicado pelo substrato utilizado na incubação, a base de fubá e silagem de milho (Tabela 2). O uso de alimentos ensilados aumenta a degradabilidade ruminal do amido em cerca de 80%. Além disso, a fermentação anaeróbia que ocorre durante a ensilagem, degrada a matriz amido-proteína pela ação proteolítica dos microrganismos presentes no silo, disponibilizando compostos nitrogenados e melhorando o seu valor nutricional (JURJANZ; MONTEILS, 2005; YANG, 2005; HOFFMAN et al., 2011).

A degradação da proteína no rúmen disponibiliza peptídeos e aminoácidos contidos na dieta. Neste processo ocorre perda de energia envolvida na excreção de amônia. No entanto, estas perdas podem ser reduzidas quando há sincronia entre a

velocidade de degradação e o consumo de compostos nitrogenados (RUSSELL, 1993). No presente estudo, o tratamento com o lactoStab e a combinação B+L demonstraram ter afetado a degradação da proteína do substrato utilizado na incubação, resultando em menor concentração total de proteína solúvel em relação ao controle e a bovicina HC5. Há evidências que o uso de extrato de lúpulos em ensaios *in vitro* foi capaz de inibir a proteólise e a fermentação de aminoácidos por bactérias ruminais (FLYTHE et al., 2017). No presente trabalho, o tratamento contendo bovicina HC5 aumentou a concentração de proteína solúvel no período de 9 h a 18 h de incubação e não afetou a variação da concentração total de proteína solúvel (Figura 4A; Figura 4B).

Neste estudo também foi evidenciado que a bovicina HC5 não afetou o catabolismo de proteínas pelas bactérias ruminais, refletido pela ausência de efeito na concentração de amônia. Os tratamentos com bovicina HC5 e a combinação B+L demonstraram, no entanto, aumento da concentração total de proteína microbiana (Tabela 3). Além disso, foi evidenciado neste estudo que a adição dos antimicrobianos afetou a diferença entre a concentração inicial e final da proteína microbiana (Figura 5B). Isso indica que a bovicina HC5 e alfa-ácidos de lúpulo apresentam potencial como aditivo alimentar para otimizar a produção de proteína microbiana em ruminantes.

Foi constatado o efeito da adição da bovicina HC5 nos tempos 9 h e 48 h de incubação, com a redução da produção de amônia e aumento na produção da proteína microbiana (Figura 3A e Figura 5A). As bactérias ruminais podem assimilar amônia em biomassa microbiana, contudo, aminoácidos e compostos nitrogenados hidrolisados estimulam o crescimento de grande parte da população microbiana do rúmen (RUSSELL, 1993). A biomassa microbiana é a principal fonte de aminoácidos para os ruminantes, além de fornecer vitaminas que são sintetizadas pela população microbiana do rúmen (WALLACE; ONODERA; COTTA, 1997). Além disso, nos ruminantes a otimização das reações que convertem o nitrogênio fornecido na dieta em produtos de origem animal, como carne e leite é um indicativo de maior eficiência na fermentação ruminal e, conseqüentemente melhora no desempenho animal.

Entretanto, a desaminação de aminoácidos no ambiente ruminal é uma rota metabólica de desvio ao aporte de nitrogênio que deveria ser direcionado para a síntese de proteína microbiana. Conseqüentemente, reduz o aproveitamento da dieta e aumenta a excreção de amônia em forma de ureia por meio da urina (DORANALLI; PENNER; MUTSVANGWA, 2011). O uso de aditivos como estratégia de manejo

alimentar, visa otimizar a utilização dos compostos nitrogenados na incorporação de proteína microbiana ou como fonte de energia, além de minimizar as implicações com o meio ambiente (ZHANG et al., 2021).

Contudo, é possível destacar o efeito dos inibidores no aumento da concentração total de AOV (Tabela 3). Bovicina HC5 e a combinação B+L resultaram em maior produção de propionato, indicando maior eficiência fermentativa. O aumento da produção de propionato no rúmen contribui para conservar a energia dos substratos da dieta em um precursor gliconeogênico para os ruminantes (CAPELARI; POWERS, 2017). Um estudo *in vivo* com vacas leiteiras alimentadas com dieta à base de silagem de capim, demonstrou que a suplementação com ácido propiônico aumentou a produção de propionato ruminal e a maior oferta de precursores gliconeogênicos afetou positivamente o teor de proteína e a produção de leite em ruminantes (RIGOUT et al., 2003).

Além disso, em experimento realizado com bezerros alimentados com milho e soja extrusada e suplementados com propionato de cálcio, evidenciou que o aumento da conversão de propionato em glicose pode ter favorecido a melhora no desempenho e crescimento animal (ZHANG et al., 2017). Contudo, os produtos gerados a partir da degradação e fermentação do substrato não se restringem a produção de AOV, pois também ocorre a produção de precursores e geração de energia em forma de ATP que pode ser utilizada na produção de biomassa microbiana (UNGERFELD, 2020). No presente estudo, foi evidenciado que a adição de bovicina HC5 e alfa-ácidos de lúpulo afeta a produção de propionato e a concentração da proteína microbiana acumulada pela microbiota ruminal, sugerindo aumento na eficiência da fermentação ruminal.

Não houve aumento significativo na produção de acetato entre os tratamentos analisados, fator que pode ser explicado pela maior proporção de concentrado no substrato utilizado para as incubações *in vitro* (Tabela 2). O perfil de ácidos orgânicos é influenciado pela composição da dieta, a baixa disponibilidade de ingredientes fibrosos na dieta favorece a produção de ácido propiônico, diminui a acetogênese e reduz a formação de metano (CH₄) (UNGERFELD, 2013). Além disso, no presente estudo, a adição da bovicina HC5 na combinação B+L em líquido ruminal contendo substrato a base de fubá e silagem de milho resultou em maior produção de propionato e menor relação acetato/propionato, isto sinaliza que o tratamento interfere no perfil de produção de ácidos orgânicos voláteis no rúmen.

O H₂ possui um papel importante no fluxo de hidrogênio nas vias de síntese de AOV no rúmen, o acetato gera hidrogênio que pode ser utilizado pelas arqueas metanogênicas, enquanto, o propionato compete com metano como via de consumo de H₂ (UNGERFELD, 2020). Portanto, neste estudo foi evidenciado que a adição de bovicina HC5 influenciou no perfil de produção de AOV e favoreceu a produção de propionato como sumidouro de H₂. Estes resultados sugerem que os inibidores testados podem ser úteis como aditivos alternativos não antibióticos e promotores de crescimento na modulação da fermentação ruminal.

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da bovicina HC5 isoladamente demonstrou efeito positivo na produção de proteína microbiana e na proporção de propionato. Além disso, a bovicina HC5 não favoreceu o acúmulo de amônia, apresentando menor valor de Δ amônia. O lactoStab reduziu a concentração total de proteína solúvel e a produção de propionato. No entanto, não afetou a relação acetato/propionato. Contudo, a bovicina HC5 parece ter potencializado o efeito do lactoStab quando utilizados em conjunto, resultando em menor valor de pH ruminal, maior produção de proteína microbiana, aumento na produção de propionato e redução da relação acetato/propionato. Neste estudo, a produção de acetato pode ter sido afetada pela maior proporção de concentrado na dieta utilizada. A adição dos antimicrobianos em substrato à base de fubá e silagem de milho aumentou a concentração total de ácidos orgânicos voláteis, no entanto, não interferiu na digestibilidade *in vitro* da matéria seca, não afetou a produção de gás e nem a concentração total de amônia.

REFERÊNCIAS

AOAC. (2005). AOAC Official Methods of Analysis. **Association of Official Agricultural Chemists**. Washington, D.C.

APHALE, D. et al. Administration of *Streptococcus bovis* isolated from sheep rumen digesta on rumen function and physiology as evaluated in a rumen simulation technique system. **Veterinary world**, v. 12, n. 9, p. 1362, 2019.

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

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CAMERON, A; MCALLISTER, T. A. Antimicrobial usage and resistance in beef production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2016.

CAPELARI, M.; POWERS, W. The effect of nitrate and monensin on *in vitro* ruminal fermentation. **Journal of animal science**, v. 95, n. 11, p. 5112-5123, 2017.

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

DETMANN, E. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214p., 2012.

DORANALLI, K.; PENNER, Gregory B.; MUTSVANGWA, Timothy. Feeding oscillating dietary crude protein concentrations increases nitrogen utilization in growing lambs and this response is partly attributable to increased urea transfer to the rumen. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 4, p. 560-567, 2011.

FLYTHE, M. D. The antimicrobial effects of hops (*Humulus lupulus* L.) on ruminal hyper ammonia-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 712-717, 2009.

FLYTHE, M. D.; AIKEN, G. E. Effects of hops (*Humulus lupulus* L.) extract on volatile fatty acid production by rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1169-1176, 2010.

FLYTHE, M. D. et al. Hops (*Humulus lupulus* L.) bitter acids: modulation of rumen fermentation and potential as an alternative growth promoter. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 131, 2017.

FRANCE, J. et al. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. **British Journal of Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 143-150, 2000.

HAILEMARIAM, S. et al. Urea transport and hydrolysis in the rumen: A review. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 989-996, 2021.

HITCH, T. C. A et al. Deep sequence analysis reveals the ovine rumen as a reservoir of antibiotic resistance genes. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 571-575, 2018.

- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.
- JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal research**, v. 54, n. 1, p. 3-15, 2005.
- KHODABANDEHLOO, M. et al. In vitro evaluation of aflatoxin B1 effect on gas production and ruminal fermentation parameters. **Iranian journal of veterinary research**, v. 20, n. 4, p. 263, 2019.
- LAVRENCIC, A. et al. *In vitro* gas production kinetics and short-chain fatty acid production from rumen incubation of diets supplemented with hop cones (*Humulus lupulus* L.). **animal**, v. 9, n. 4, p. 576-581, 2015.
- LILLEHOJ, H. et al. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 1-18, 2018.
- LIMA, J. R. et al. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria *in vitro*. **FEMS microbiology letters**, v. 292, n. 1, p. 78-84, 2009.
- MANTOVANI, H. C. et al. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347-3352, 2002.
- MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International journal of food microbiology**, v. 89, n. 1, p. 77-83, 2003.
- MOREIRA, S. M. et al. Distinct effects of bovicin HC5 and virginiamycin on *in vitro* ruminal fermentation and microbial community composition. **Journal of Agricultural Science (Toronto)**, v. 10, n. 8, p. 156-165, 2018.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle** 7.ed.rev. Washington, D.C.: National Academic Press, 2001. 381p.
- NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (rusitec). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 45-52, 2013.
- NEGASH, A. W; TSEHAI, B. A. Current applications of Bacteriocin. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- PAIVA, A. D. et al. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5284-5293, 2011.
- PEREIRA, M. L. A. et al. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1029-1039, 2005.

RIGOUT, S. et al. Lactational effect of propionic acid and duodenal glucose in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 243-253, 2003.

RUSSELL, J. B. Effect of amino acids on the heat production and growth efficiency of *Streptococcus bovis*: balance of anabolic and catabolic rates. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1747-1751, 1993.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer, Dordrecht, p. 246-282, 1997.

SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of animal science**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.

SHEN, J. et al. Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently *in vitro*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1111, 2017.

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

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de Alimentos. Métodos químicos e biológicos. 3.ed. Editora UFV, 2005.

SILVA, T. E. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1635-1644, 2017.

TEUBER, M.; SCHMALRECK, A. F. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 94, n. 2, p. 159-171, 1973.

UNGERFELD, E. M. A theoretical comparison between two ruminal electron sinks. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 319, 2013.

UNGERFELD, Emilio M. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 37, 2015.

UNGERFELD, E. M. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 589, 2020.

UWITUZE, S. et al. Beta acid extracts of hops have a modest effect on ruminal metabolism and apparent total tract digestibility by steers fed high-concentrate diets. 2010.

VAN LINGEN, H. J. et al. Thermodynamic driving force of hydrogen on rumen microbial metabolism: a theoretical investigation. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0161362, 2016.

VAZ, E. L. S.; ACCIARI, H. A.; CODARO, E. N. Um método para avaliar a taxa de corrosão. **Química Nova**, v. 34, p. 1288-1290, 2011.

VIECO-SAIZ, N. et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 57, 2019.

ZHANG, X. et al. Growth performance and development of internal organ, and gastrointestinal tract of calf supplementation with calcium propionate at various stages of growth period. **Plos one**, v. 12, n. 7, p. e0179940, 2017.

ZHANG, N. et al. Oscillating dietary crude protein concentrations increase N retention of calves by affecting urea-N recycling and nitrogen metabolism of rumen bacteria and epithelium. **PloS one**, v. 16, n. 9, p. e0257417, 2021.

WALLACE, R. J.; ONODERA, R.; COTTA, M. A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer, Dordrecht, p. 283-328, 1997.

WICHMANN, F. et al. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e01017-13, 2014.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

YANG, C.M.J. Proteolysis, fermentation efficiency, and *in vitro* ruminal digestion of peanut stover ensiled with raw or heated corn. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 8, p. 2903-2910, 2005.

YANG, C. et al. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. **Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 137-156, 2015.