

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

**PROBIÓTICOS E IONÓFORO COMO ADITIVOS PARA
NOVILHOS DE CORTE**

Camila da Silva Zornitta

CAMPO GRANDE, MS

2022

ZORNITTA, C. S.	PROBIÓTICOS E IONÓFORO COMO ADITIVOS PARA NOVILHOS DE CORTE	2022
-----------------	--	------

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

PROBIÓTICOS E IONÓFORO COMO ADITIVOS PARA
NOVILHOS DE CORTE

Probiotics and ionophore as feed additives for beef steers

Camila da Silva Zornitta

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo

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

CAMPO GRANDE, MS 2022



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



Certificado de aprovação

Camila da Silva Zornitta

Probióticos e ionóforo como aditivos para novilhos de corte
Probiotics and ionophore as feed additives for beef steers

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito para obtenção do título
de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 07-03-2022

BANCA EXAMINADORA:

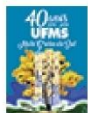
Dr. Luis Carlos Vinhas Itavo
(UFMS) – (Presidente)

Dr. Alexandre Menezes Dias
(UFMS)

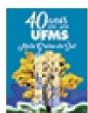
Dr. Fabiano Ferreira da Silva
(UESB)

Dr. Gumerindo Lorian Franco
(UFMS)

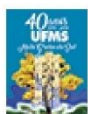
Dr. Luciano da Silva Cabral
(UFMT)



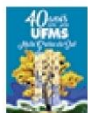
Documento assinado eletronicamente por **Luis Carlos Vinhas Itavo, Professor do Magisterio Superior**, em 07/03/2022, às 17:18, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gumerindo Lorian Franco, Professor do Magisterio Superior**, em 07/03/2022, às 17:23, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Ferreira da Silva, Usuário Externo**, em 08/03/2022, às 10:28, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Menezes Dias, Professor do Magisterio Superior**, em 14/03/2022, às 15:27, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano da Silva Cabral, Usuário Externo**, em 28/09/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3126678** e o código CRC **8A7054C1**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 3126678

Dedicatória

*Dedico esta tese ao meu “eu” passado.
Conseguimos!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que é meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente nas provas e tribulações.

Aos meus pais Jose de Jesus Pereira e Maria Cleide da Silva Pereira, meus exemplos de pessoas simples, mas que desde cedo me mostraram o que é ser uma pessoa integra e firme de palavra.

Ao meu amado esposo, Fabio Willian Zornitta, por me apoiar, incentivar e me ensinar uma das maiores lições de vida “se vai fazer algo, faça bem no capricho!”.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo, a quem devo muito por toda a paciência e acolhimento que recebi desde o momento em que me aceitou como orientada, meu muitíssimo obrigada.

A todos os colegas do grupo de estudos NPR-UFMS (nutrição e produção de ruminantes da UFMS) e do Laboratório de nutrição aplicada – UFMS, que foram essenciais para a realização deste projeto.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e todos os professores, servidores e técnicos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) e da Fazenda Escola da UFMS que de alguma forma participaram na realização do projeto de pesquisa ou que contribuíram de alguma forma ao longo do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos, que possibilitou a dedicação exclusiva ao curso de doutorado.

A todos os não mencionados diretamente nessa seção, mas que fizeram parte dessa etapa da minha caminhada, muito obrigado.

*“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas.”
(Luis Fernando Verissimo.)*

Resumo

ZORNITTA, C. S. Probióticos e ionóforo como aditivos para novilhos de corte. 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

O propósito da revisão de literatura foi discorrer sobre alguns aditivos alimentares para uso em bovinos, sendo abordado duas classes, os probióticos e os antibióticos, seus mecanismos de ação e efeitos quando adicionados na dieta de bovinos. No artigo 1, foram testados diferentes modelos de ajustes da produção de gás *in vitro* da silagem de milho e o efeito do uso da combinação de três aditivos na dieta de novilhos de corte. Com isso, o objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos do inóculo ruminal de novilhos recebendo diferentes combinações de ionóforo e probióticos em suas dietas sobre a produção de gás *in vitro* de silagem de milho. Foram utilizados o líquido ruminal de quatro novilhos mestiços com cânula ruminal e designados ao quadrado latino 4×4 nos seguintes tratamentos: (1) Monensina; (2) Monensina + *Bacillus toyonensis*; (3) Monensina + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*; e (4) *Bacillus toyonensis* + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Os dados de produção de gás foram ajustados nos modelos de Gompertz, Groot, Ørskov, Brody, Richards e Logístico Bicompartimental. A adição dos tratamentos provocou alterações no líquido ruminal extraído dos animais, a ponto de alterar a cinética da produção de gás *in vitro*, sendo que os tratamentos Monensina e *B. toyonensis* + *S. boulardii* apresentaram melhor cinética de degradação da silagem de milho. Já os modelos Groot e Richards tiveram o melhor ajuste para estimativas dos dados que os demais avaliados. No artigo 2, o objetivo foi avaliar os efeitos da combinação de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Bacillus toyonensis* e monensina sobre o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, variáveis ruminais e sanguíneas de novilhos recebendo dieta 70% de concentrado. Foram utilizados quatro novilhos mestiços *Bos taurus* × *B. indicus* com cânula ruminal e alojados individualmente, em um delineamento quadrado latino 4×4 . Os animais receberam ração totalmente misturada contendo relação volumoso concentrado de 30:70, respectivamente silagem de milho e concentrado, com os seguintes tratamentos misturados em sua alimentação diária: Monensina apenas (MO), Monensina + *Bacillus toyonensis* (MBT), Monensina + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (MSB) e *Bacillus toyonensis* + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (BTSB). Observou-se que o tratamento BTSB, quando fornecido aos animais aumentou o consumo de ração e resultou em

concentrações semelhantes ao tratamento MO nas variáveis sanguíneas, urinárias, pH ruminal, nitrogênio amoniacal ruminal, ácidos graxos totais e balanço de nitrogênio. Porém quando associados os probióticos à monensina sódica não foi observado efeito benéfico nas variáveis avaliadas. Com base nas observações promissoras da associação de *Bacillus toyonensis* com *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* obtidos nesta tese, são sugeridos mais estudos com esta associação de probióticos sobre os aspectos produtivos para que seja recomendado como melhorador de desempenho alternativo para os bovinos.

Palavras-chave: aditivos naturais; ensaio metabólico; modelagem; produção de gás *in vitro*; ruminantes

Abstract

ZORNITTA, C.S. Probiotics, and ionophore as feed additives for beef steers. 2022. Thesis (Doctorate) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

The purpose of the literature review was to discuss some feed additives for use in cattle, addressing two classes, probiotics, and antibiotics, their mechanisms of action, and their effects when added to the diet of cattle. In article 1, different models for adjusting the *in vitro* gas production of corn silage and the effect of using the combination of three additives in the diet of beef steers were tested. Therefore, the objective of this work was to examine the effects of ruminal inoculum of steers receiving different combinations of ionophore and probiotics in their diets on the *in vitro* gas production of corn silage. Ruminal fluid from four crossbred steers with rumen cannula and assigned to a 4×4 Latin square were used in the following treatments: (1) Monensin; (2) Monensin + *Bacillus toyonensis*; (3) Monensin + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*; and (4) *Bacillus toyonensis* + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. The gas production data were fitted to the models Gompertz, Groot, Ørskov, Brody, Richards, and Dual Pool Logistic. The addition of treatments caused changes in the rumen fluid extracted from the animals to the point of altering the kinetics of gas production *in vitro*, and the treatments Monensina and B. toyonensis + S. boulardii showed better kinetics of corn silage degradation. The Groot and Richards models had the best fit for data estimates than the others evaluated. In article 2, the objective was to evaluate the effects of the combination of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Bacillus toyonensis*, and monensin on the intake and apparent digestibility of nutrients, ruminal and blood variables of steers receiving a 70% concentrate diet. Four crossbred *Bos taurus* $\times$ *B. indicus* steers with a ruminal cannula and housed individually in a 4×4 Latin square design were used. The following treatments were mixed in their daily diet: Monensin only (MO), Monensin + *Bacillus toyonensis* (MBT), Monensin + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (MSB), and *Bacillus toyonensis* + *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (BTSB). It was observed that the BTSB treatment, when provided to the animals, increased feed intake, and resulted in similar concentrations values to the OM treatment in blood, urinary, ruminal pH, ruminal ammoniacal nitrogen, total fatty acids, and nitrogen balance. However, when probiotics were associated with sodium monensin, no beneficial effect was observed in the evaluated variables. Based on the promising observations of the association of *Bacillus toyonensis* with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* obtained

in this thesis, further studies are suggested with this association of probiotics on the productive aspects so that it is recommended as an alternative performance enhancer for cattle.

Keywords: *in vitro* gas production; natural additives; metabolic assay; modeling; ruminants

Lista de ilustrações

Revisão de literatura

Figura 1 - Esquema dos efeitos dos probióticos na população microbiana e trato gastrointestinal.....	19
Figura 2 - Principais marcos no desenvolvimento da taxonomia de <i>Lactobacillus</i> e os efeitos resultantes na colocação taxonômica de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	25
Figura 3 - Árvore filogênica das 170 espécies de <i>Lactobacillus</i> agrupadas com base na sequência do gene piruvato quinase.....	26
Figura 4 - Uso de antibióticos na pecuária em miligramas de uso total por quilograma de produção de carne em 2010.....	31
Figura 5 - Modo de ação da monensina em bactérias Gram-positivas.....	34

Artigo 1

Figura 1 - Curvas da produção de gás <i>in vitro</i> cumulativa da silagem de milho com combinação de probióticos e ionóforo ajustadas em diferentes modelos.....	65
Figura 2 - Potencial máximo da produção de gás <i>in vitro</i> (V_F) da silagem de milho realizada com inoculo de novilhos recebendo diferentes aditivos nutricionais estimados pelo modelo logístico bicompartimentado.....	68

Artigo 2

Figura 1 - Valores médios de pH ruminal e nitrogênio amoniacal (NH_3-N) em diferentes horários de coleta de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.....	104
--	-----

Lista de tabelas

Revisão de literatura

Tabela 1 - Resumo de algumas diferenças e semelhanças entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
---	----

Artigo 1

Tabela 1 - Composição da dieta experimental oferecida aos novilhos sem os aditivos nutricionais.....	59
Tabela 2 - Modelos não lineares considerados neste estudo para descrever a produção de gás <i>in vitro</i> da silagem de milho combinada com diferentes aditivos.....	61
Tabela 3 - Avaliação do ajuste dos modelos para estimar a produção de gás <i>in vitro</i> da silagem de milho combinada com diferentes aditivos.....	63
Tabela 4 - Estimativa dos parâmetros da produção de gás <i>in vitro</i> da silagem de milho com diferentes combinações de aditivos obtidos pelo modelo de Groot.....	66
Tabela 5 - Estimativa dos parâmetros da produção de gás <i>in vitro</i> de silagem de milho com diferentes aditivos obtidos pelo modelo logístico bicompartimentado.....	67

Artigo 2

Tabela 1 – Participação dos ingredientes e química da dieta experimental oferecida aos novilhos sem os aditivos.....	99
Tabela 2 - Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.....	100
Tabela 3 - Variáveis ruminais de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.....	101
Tabela 4 - Variáveis sanguíneas de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.....	102
Tabela 5 - Variáveis urinárias e balanço de nitrogênio de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.....	103

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1. Probióticos.....	18
2.1.1. <i>Saccharomyces</i> spp.....	20
2.1.1.1. Uso de <i>Saccharomyces</i> em dietas para bovinos.....	22
2.1.2. <i>Bacillus</i> spp.	23
2.1.2.1. Uso de <i>Bacillus</i> em dietas para bovinos.....	24
2.1.3. <i>Lactobacillus</i> spp.....	24
2.1.3.1. Uso de <i>Lactobacillus</i> em dietas para bovinos.....	26
2.1.4. <i>Megasphaera elsdenii</i>	25
2.1.4.1. Uso de <i>Megasphaera elsdenii</i> em dietas para bovinos.....	28
2.1.5. Tipos de apresentação dos probióticos.....	29
2.1.5.1. Leveduras vivas.....	29
2.1.5.2. Cultura de levedura.....	29
2.1.5.3. Esporos.....	29
2.1.5.4. Resíduos de bioprodutos.....	30
2.2. Antibióticos promotores de crescimento.....	30
2.2.1. Ionóforos.....	32
2.2.1.1. Uso de monensina em dietas para bovinos.....	34
2.2.1.2. Uso de salinomicina em dietas para bovinos.....	35
2.2.1.3. Uso de lasalocida em dietas para bovinos.....	36
2.2.2. Não ionóforos.....	36
2.2.2.1. Uso de virginamicina em dietas para bovinos.....	37
2.2.2.2. Uso de flavomicina em dietas para bovinos.....	37
3. Referências Bibliográficas.....	38
ARTIGO 1 - Cinética da produção de gás <i>in vitro</i> e ajuste de modelos matemáticos da silagem de milho.....	54
Resumo.....	55
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	62

Discussão.....	68
Conclusão.....	72
Referências.....	73
ARTIGO 2 – Associação de probióticos com a monensina sódica sobre a ingestão, digestibilidade aparente, variáveis ruminais e urinárias, bioquímica sanguínea e balanço de nitrogênio em novilhos de corte.....	
	79
Resumo.....	80
Introdução.....	82
Material e Métodos.....	83
Resultados.....	87
Discussão.....	89
Referências.....	95
Materiais suplementares.....	105
4. Implicações e considerações finais.....	112
5. Anexos.....	113
Anexo I – Artigo publicado (Capítulo 1) no periódico científico <i>Fermentation</i> (ISSN: 2311-5637). DOI: https://doi.org/10.3390/fermentation7040298	
	113

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente por carne bovina, assim como carne de demais espécies de animais de produção, pressionam constantemente a pecuária para atender tal demanda, em 2010 a produção mundial de carne bovina e bubalina foi de 66,55 milhões de toneladas, já em 2018 contabilizou 71,61 milhões de toneladas, ao qual deste montante 12,22 milhões de toneladas foram produzidos pelos Estados Unidos da América, ocupando o primeiro lugar, e em segundo lugar com a produção de 9,90 milhões de toneladas sendo produzidos pelo Brasil (FAO, 2020).

Apesar do grande volume da demanda por carne bovina, a qualidade deste produto também é requerida pelo mercado consumidor, para atender tais demandas os bovinos abatidos devem atender a uma série de requerimentos, como sanidade, peso da carcaça, acabamento de gordura e idade do animal. No Brasil a idade de abate dos animais é em média 30 meses, ao longo dos anos os animais abatidos com mais de 36 meses vêm sendo reduzido, em 1997 era 52,18% já em 2015 foi de 6,94% (ABIEC, 2020). Para alcançar a conformidade nos lotes, atender as exigências do mercado e ter sustentabilidade econômica são necessários aplicar diversas tecnologias na criação dos bovinos, como o uso de aditivos na alimentação dos bovinos (VIANA *et al.*, 2021).

O uso de aditivos na alimentação dos bovinos se dá pela melhora na eficiência alimentar, modulação da fermentação ruminal e aumento no desempenho (DUFFIELD; MERRILL; BAGG, 2012; ITAVO *et al.*, 2020). As principais categorias de aditivos utilizado na bovinocultura são: antibióticos ionóforos, antibióticos não-ionóforos, probióticos, tamponantes e extrato de plantas (MARINO; MEDEIROS, 2015). Apesar da grande variedade de aditivos alimentares disponíveis para os bovinos, destaca-se os antibióticos promotores de crescimento, com efeitos bem estabelecidos na literatura e usado em larga escala global, contudo proibições recentes de alguns países e programas de controle e redução na utilização desenfreada dos antibióticos vem desafiando pesquisadores a encontrar novas formas de melhorar o desempenho dos animais por meio de aditivos com menor risco de causar resistência bacteriana (CHATTOPADHYAY, 2014; GETABALEW; ALEMNEH; ZEWDIE, 2020; NRC, 2000).

Apesar da generalização dos antibióticos usados como aditivos alimentares serem conotados negativamente, alguns deles têm se mostrado ferramentas valiosas que tornam possível a utilização de dietas com alto teor de concentrado ou mesmo sem a utilização de volume nos bovinos, melhorando o desempenho dos animais e reduzirem o risco de acidose ruminal nos animais submetidos a estas dietas (GONZÁLEZ *et al.*, 2012). Encontrar novos aditivos ou combinações que promovam não apenas melhores desempenhos dos animais visando atender

ao mercado consumidor, mas que também sejam capazes de promover a saúde e bem-estar dos mesmos são os desafios atuais.

Desta forma, o objetivo desta revisão de literatura foi discorrer sobre alguns aditivos alimentares que são permitidos pela legislação vigente no país para uso em bovinos, sendo abordado duas classes, os probióticos e os antibióticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Probióticos

O termo probióticos é derivado de *pro* do Latim “a favor” e *biótico* adjetivo Grego de *bios* “vida”, utilizado primeiramente por Werner Kollath 1953 (PARK, 2009), ainda definindo que probióticos são “substâncias ativas essenciais para um desenvolvimento saudável da vida”. Contudo muito antes da definição dessas substâncias, Ilya Ilyich Metchnikov, também escrito como Elie Metchnikoff, pelo convite de Louis Pasteur, iniciou estudos em Paris no Instituto Pasteur em 1888, desenvolvendo a teoria de que o envelhecimento é causado por bactérias tóxicas no intestino e que o ácido láctico poderia prolongar a vida, popularizando assim o consumo de iogurte na Europa (MACKOWIAK, 2013).

Atualmente assume-se a definição proposta pela FAO/WHO (2001), em que probióticos são “Organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas confere benefícios na saúde do hospedeiro”. Ao longo dos anos o uso de probióticos na alimentação humana se popularizou, na atualidade é encontrando facilmente produtos farmacêuticos a base de probióticos para tratar alguns casos, como cepas que auxiliam no reestabelecimento da flora intestinal após episódios de diarreia. Naturalmente este uso foi expandido para os animais de produção, com o intuito de melhorar a saúde e também melhorar outros parâmetros, tanto em animais jovens como em adultos (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012).

Apesar da grande variedade de microrganismos os principais gêneros usados como probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Escherichia coli* (UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015). Destacando-se entre as cepas mais utilizadas como probióticos para bezerros estão *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp., já para bovinos adultos estão *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Propionobacterium* spp., *Megasphaera elsdenii* e *Saccharomyces cerevisiae* (HRISTOV *et al.*, 2013; UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015).

Assim como esquematizado na Figura 1, vários são os efeitos positivos do fornecimento de probióticos aos bovinos, que desempenham ação tanto ruminal quanto intestinal. Algumas cepas utilizadas como probióticos melhoram o ambiente ruminal para outros microrganismos, como com a retirada do oxigênio do meio, que acaba resultando em aumento da viabilidade bacteriana, aumento da estabilidade do pH e aumenta a quantidade e função bacteriana (GHAZANFAR *et al.*, 2017; UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015). Já a função intestinal dos probióticos se deve pela produção de compostos de ação bactericida específica, que ao melhorar o perfil da flora bacteriana melhora indiretamente a saúde intestinal e consequentemente a saúde do animal (GHAZANFAR *et al.*, 2017).

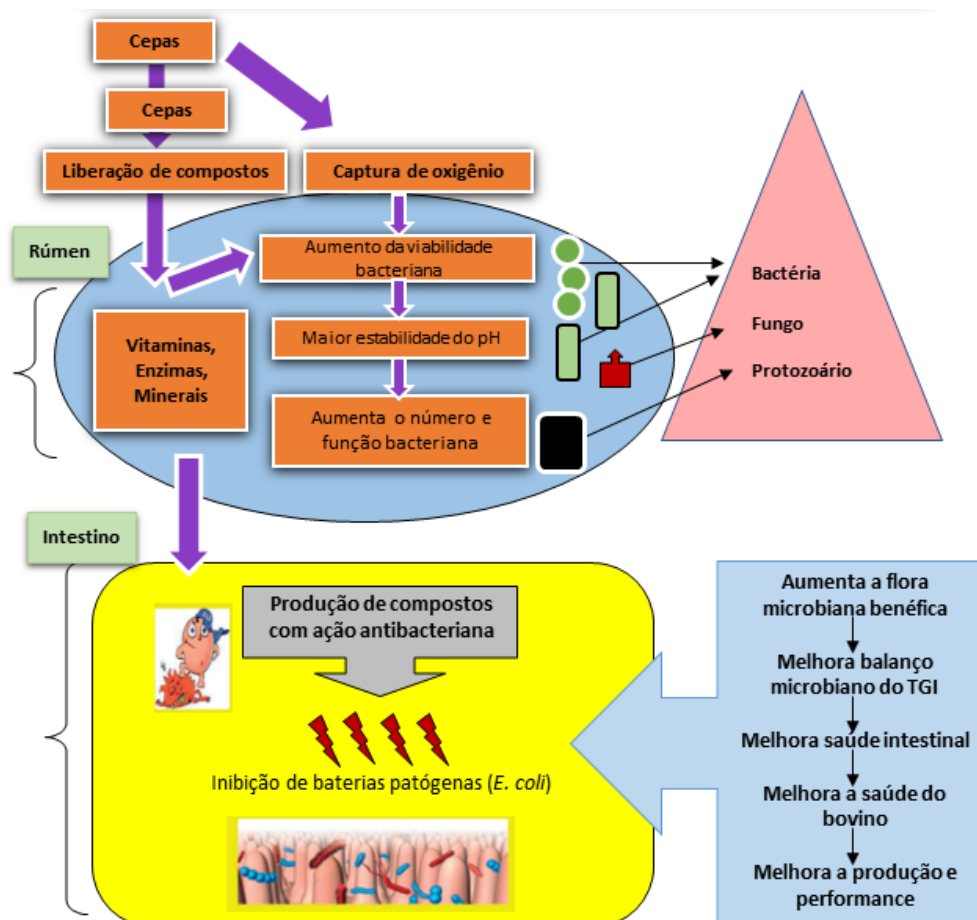


Figura 1. Esquema dos efeitos dos probióticos na população microbiana e trato gastrointestinal (Adaptado de Ghazanfar *et al.*, 2017).

2.1.1. *Saccharomyces* spp.

Henri Boulard na busca por alimentos bons para a saúde, ao visitar a Indochina em 1920 durante o surto de cólera em que milhares de pessoas morreram, observou algumas pessoas mascando casca de lichia e mangostim ou preparando chás, e que estas pessoas não

desenvolviam os sintomas da cólera ou mesmo melhoravam da diarreia, de volta à França, Henri Boulard foi capaz de isolar a cepa de uma levedura, nomeando-a de *Saccharomyces boulardii* (LIU *et al.*, 2016; ŁUKASZEWICZ, 2012).

O grupo *Saccharomyces sensu stricto* é composto por oito espécies de cepas distintas, pertencentes ao reino dos fungos, ao qual todas são fermentativas, sendo *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. uvarum*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arborícola* e *S. eubayanus* (NASEEB *et al.*, 2017). As leveduras do gênero *Saccharomyces* continuam sendo as mais estudadas e usadas como microrganismos fornecidos diretamente através do alimento (do inglês “direct-feed microbials”) para animais, devido a sua efetividade em promover ou restaurar a saúde em humanos mesmo após um século de sua descoberta (GARCIA-MAZCORRO *et al.*, 2019). Como apresentado por Łukaszewicz (2012), uma grande expansão no número de pesquisas envolvendo apenas cepas de *Saccharomyces boulardii* pode ser percebido ao longo dos anos, em que em 1987 havia apenas 7 publicações e já em 2011 passou para 822 publicações no ano.

Na descoberta de Henry Boulard a levedura foi classificada taxonomicamente como *Saccharomyces boulardii*, como considerada uma nova espécie da família *Saccharomyces*, contudo, após a utilização de novas técnicas de genotipagem e caracterizações físicas, foi identificado que apesar de algumas diferenças, *S. boulardii* seria uma cepa pertencente à espécie *S. cerevisiae*, levando ao nome taxonômico de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (CROWCH, 2017; EDWARDS-INGRAM *et al.*, 2007). Dentre as diferenças entre *S. cerevisiae* var. *boulardii* de *S. cerevisiae* estão uma maior temperatura ótima de crescimento, maior resistência a pH ácido, não utilização de galactose, entre outras diferenças genotípicas (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo de algumas diferenças e semelhanças entre *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* (Adaptado de Łukaszewicz, 2012)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Temperatura de crescimento ótima ~37 °C	Temperatura de crescimento ótima ~30 °C
Maior resistência a pH baixo	Menor resistência a pH baixo
Os cariótipos de <i>Sb</i> são muito similares dos que estão no <i>S. cerevisiae</i>	Tipagem RFLPs ou PCR-(ex. 5.8S rDNA) falharam de distinguir o <i>Sb</i> do <i>S. cerevisiae</i>
Não usa galactose	Usa galactose
Asporogênica em contraste do <i>S. cerevisiae</i> , mas pode produzir híbridos férteis com cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Esporogênico
Perdeu todos os elementos Ty1/2 intactos	Contém vários elementos Ty1/2
Tipagem de microssatélites mostra diferenças genotípicas	
Trissômico para o cromossomo IX	Existem cepas estáveis com várias ploidias

Um dos modos de ação do *Saccharomyces cerevisiae* se dá no rúmen, parcialmente, por sua atividade respiratória em retirar o oxigênio dissolvido no meio, favorecendo as bactérias anaeróbicas, resultando no aumento de bactérias totais no ambiente ruminal (NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996). Scott *et al.* (1983), aferindo a concentração de O₂ no líquido ruminal, foram capazes de contabilizar 1,630 nmol/l O₂ dissolvido. Ainda, considerando que a entrada de oxigênio é constante pelo animal, ao ingerir água e alimento, a presença do O₂ pode se tornar prejudicial ao desenvolvimento de alguns microrganismos anaeróbicos, como parte do ecossistema ruminal, os microrganismos metanogênicos utilizam o H₂ na formação do metano, mas são altamente sensíveis ao O₂ presente no meio (MARINO; MEDEIROS, 2015; NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996).

Outro método de ação do *S. cerevisiae* é que esta cultura provê fatores de crescimento solúveis aos microrganismos digestores de celulose, com ácidos orgânicos, vitamina B e aminoácidos (CALLAWAY; MARTIN, 1997; MARINO; MEDEIROS, 2015). Assim como *S. cerevisiae*, a *S. cerevisiae* var. *boulardii* tem tido seu modo de ação relacionado com aumento na diversidade microbiana, contudo ainda não está totalmente esclarecido seu modo de ação no trato gastrointestinal dos bovinos (BROUSSEAU *et al.*, 2015; KEYSER *et al.*, 2007; VILLOT *et al.*, 2019).

2.1.1.1. *Uso de Saccharomyces em dietas para bovinos*

O efeito da utilização de *Saccharomyces cerevisiae* em vacas não lactantes, alimentadas com 63 % silagem de milho e 37% concentrado, monitoradas continuamente através de um dispositivo wireless no rúmen, apontou maior pH ruminal de animais que receberam o aditivo quando comparadas aos que não receberam (controle), também em menor redox potencial no rúmen (KŘÍŽOVÁ *et al.*, 2011). Também, Diaz *et al.* (2018) observaram um aumento no pH ruminal de novilhos recebendo dieta com 5% de bagaço de cana e 95% concentrado bovinos de corte, ao serem suplementados com *S. cerevisiae*. Já quando o uso de *S. cerevisiae* foi combinado com ionóforos (virginiamicina e salinomicina) e uma fonte de nitrogênio não proteico em bovinos machos não castrados, terminados no sistema de pastejo intensivo, ao qual recebiam 17,5 g de concentrado/kg de peso corporal, foi observado estímulo no crescimento de bactérias fibrolíticas, que consequentemente podem contribuir com a redução de distúrbios digestivos e metabólicos que dietas de alto concentrado podem causar (MOMBACH *et al.*, 2021).

Com relação à produtividade, vacas de leite em meio de lactação obtiveram resultados positivos ao serem suplementadas com *S. cerevisiae* durante a estação de calor, onde foi observado aumento na digestibilidade da parede celular e uma melhora na porcentagem de gordura do leite (DEHGHAN-BANADAKY *et al.*, 2013). Já Magrin *et al.* (2018) apesar de não observarem diferenças no ganho de peso de touros terminados em confinamento que receberam suplementação com *S. cerevisiae*, os animais que receberam tiveram uma melhora na transição para a dieta de terminação, que continha 29,7 % de silagem de milho e 70,3% ingredientes concentrados, melhor score de conformação de carcaça e foi observado que a suplementação com o probiótico agiu na preservação das papilas ruminais contra a hiper queratinização, que é diretamente relacionado com a ocorrência de acidose ruminal.

Com relação aos efeitos da *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* no desempenho de novilhos de leite, foi observado que com a adição de probiótico no sucedâneo de leite os animais tiveram melhora no crescimento e saúde (VILLOT *et al.*, 2018). Similar ao encontrado por Renaut *et al.* (2019) ao avaliar a suplementação *S. cerevisiae* var. *boulardii* antes da desmama de bezerros, apesar de não encontrarem diferença entre os grupos na mortalidade, escore fecal e desenvolvimento da doença respiratória bovina, observaram que a suplementação com 10 gramas/dia do probiótico melhorou o ganho de peso diário dos 42 aos 56 dias após a chegada, comparado com os animais não tratados.

Resultados similares também foram obtidos quando suplementado um rebanho de novilhas com alto risco de desenvolver a acidose ruminal devido à dieta de confinamento com *S. cerevisiae* var *boulevardii*. Foi observado que nos primeiros 45 dias houve uma redução do número de animais com doença respiratória e uma melhoria no ganho de peso diário, relação consumo:ganho, custo por peso ganho, porcentagem de carcaças avaliadas na categoria “Choice” (USDA quality grade) e redução de abscessos no fígado (THEURER *et al.*, 2019).

Da mesma forma, Kayser *et al.* (2019) obtiveram resultados indicativos de que a suplementação com *S. cerevisiae* var. *boulevardii* alterou a concentração de leucócitos no sangue em resposta a administração intranasal do vírus herpes bovina-1, sugerindo um aumento na resposta imunológica de novilhas de corte que recebiam a suplementação com o probiótico.

2.1.2. *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* foi proposto por Ferdinand Cohn em 1872, após a descoberta e classificação do *Bacillus subtilis*, com características de bacilo quimioheterotrófico, aeróbico e formador de esporo (MANDIC-MULEC; STEFANIC; VAN ELSAS, 2015). Há aproximadamente 370 espécies de bactérias no gênero *Bacillus*, onde a maioria são Gram-positivas, aeróbicas ou aeróbicas facultativas, de morfologia de bastões retos ou curvados, são organismos que apresentam motilidade por flagelos, peritríquios ou sem meios de mobilidade (OREM, 2018).

As cepas do gênero *Bacillus* em que se tem conhecimento como possíveis probióticos para animais são: *B. coagulans*, *B. subtilis* e *B. cereus* (FIJAN, 2014). Há uma crescente tendência no uso de probióticos dessa bactéria em animais devido ao seu efeito estar associado com a redução de algumas doenças e melhoria na performance animal, além da capacidade de seus esporos serem resistentes tanto a altas como baixas temperaturas (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018; SOUZA *et al.*, 2017).

Para selecionar possíveis espécies e cepas deste gênero e futuramente utilizá-las como probióticos, são realizados estudos das espécies de bactérias que já se encontram naturalmente no trato gastrointestinal dos animais para que posteriormente sejam avaliadas em diferentes condições de cultura. A partir destes estudos já foram possíveis apontar novos potenciais probióticos para bovinos, sendo eles o *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus tequilensis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (DU *et al.*, 2018; KWEON *et al.*, 2012; NAEEM *et al.*, 2018).

Com relação a cepa BCT-7112, ela foi isolada em 1966 no Japão, primeiramente sendo identificada como *Bacillus cereus* var. *toyoi*, e desde 1975 vem sendo utilizado na formulação do produto Toyocerin®, que desde então tem sido fornecido a uma grande variedade de animais

de produção como probiótico, contudo, estudos genéticos mais recentes apontaram que esta bactéria se trata de uma nova espécie de *Bacillus*, sendo renomeada de *Bacillus toyonensis* (JIMÉNEZ *et al.*, 2013a, 2013b). Seu uso em animais foi liberado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos desde 2012 e reavaliado em 2014, reafirmando a não patogenicidade da cepa e efeito probiótico quando testados em diferentes espécies animais (EFSA, 2014).

2.1.2.1. *Uso de Bacillus em dietas para bovinos*

O uso de probióticos a base de *Bacillus* em ruminantes tem se mostrado promissor, tanto para bovinos jovens como em adultos. Nos animais jovens, como bezerros separados de suas mães precocemente nas criações intensivas de leite, ou mesmo bezerros em fase de desmama, a não colonização correta da flora microbiana nos intestinos destes animais ou eventos estressantes os tornam susceptíveis aos casos de diarreia e subsequentes morbidade e até mesmo mortalidade (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018). Resultados benéficos e similares foram encontrados com o fornecimento de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* no crescimento e melhoria no desenvolvimento intestinal e ruminal de bezerros com crescimento retardado (DU *et al.*, 2018). Efeito positivo também foi encontrado quando bezerros pré-ruminantes receberam probióticos contendo *Lactobacillus* e dois tipos de *Bacillus* juntamente com sucedâneo de leite, eles apresentaram melhor crescimento sem afetar o consumo de alimento (BOWMAN *et al.*, 2021).

Também, ao suplementar bezerros lactentes com *B. megaterium*, houve efeito benéfico no crescimento, função imunológica e status oxidativo intestinal (YAO *et al.*, 2020). Contudo ainda é contraditório os benefícios, pois como observado por Torrezan *et al.* (2016), o uso de probiótico a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* não proporcionou melhoras no crescimento, no metabolismo e nem na redução de ocorrência de diarreia em bezerros alimentados com sucedâneo de leite.

Já em ruminantes adultos, probióticos a base de *Bacillus* têm sido selecionados com o objetivo de melhorar a digestão da fibra no rúmen, visto que a maior parte dos alimentos ingeridos pelo animal é fermentada e degradada nesta porção do trato gastrointestinal e pressupõe-se que a flora intestinal já tenha sido estabelecida nestes animais (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018). Em estudo realizado com a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* em vacas de leite, foi observado efeito positivo na produção, nos teores de proteína e sólidos totais do leite (SOUZA *et al.*, 2017).

2.1.3. *Lactobacillus* spp.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* pertencem a família *Lactobacillaceae*, em sua maioria são Gram-positivas, psicrófilas, anaeróbicas facultativas, não esporuladoras, sem meios de motilidade e em forma de bastões (FEINER, 2006). A descrição da primeira bactéria deste gênero foi o *Lactobacillus acidófilos*, primeiramente classificada como *Bacillus acidophilus* em 1900 por Moro, sendo propriamente renomeada em 1929 (BULL *et al.*, 2013). Com a criação do gênero *Lactobacillus* ocorrendo somente em 1901 por Beijerinck, possibilitando então a reclassificação do *Lactobacillus acidófilos*, já em 2007 a quantidade de espécies de *Lactobacillus* já classificadas eram de 109 (Figura 2) e atualmente são mais de 200 cepas pertencentes somente ao grupo *L. acidophilus* (BEIJERINCK, 1901; DUAR *et al.*, 2017).

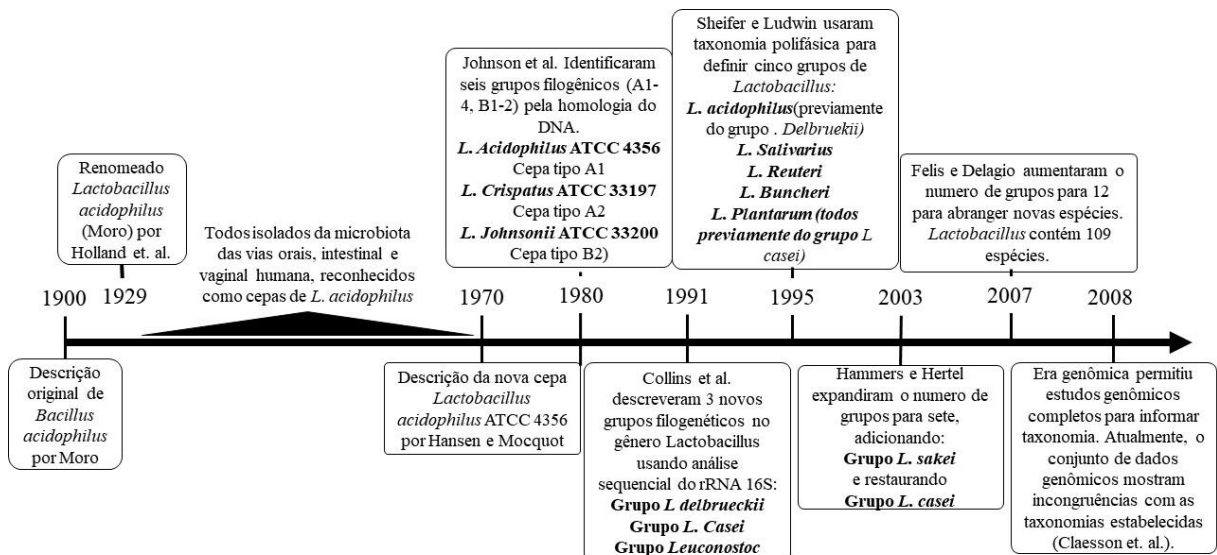
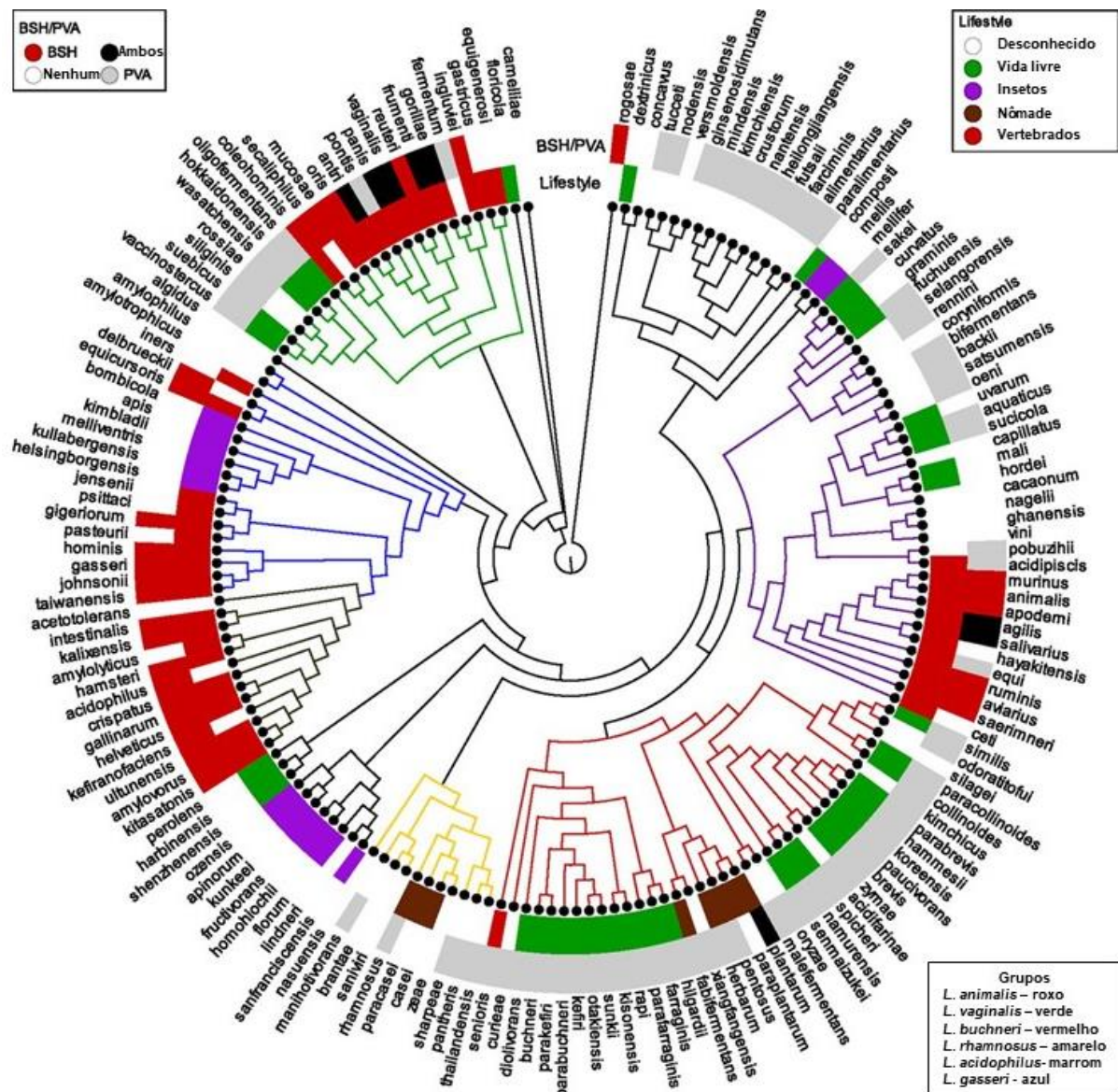


Figura 2. Principais marcos no desenvolvimento da taxonomia de *Lactobacillus* e os efeitos resultantes na colocação taxonômica de *Lactobacillus acidophilus* (adaptado de Bull *et al.*, 2013).

Com relação ao grupamento, outro método proposto por Duar *et al.* (2017), foi segundo o método do sequenciamento genético do gene Piruvato-quinase (Figura 3). Contudo a definição de grupos e subgrupos ainda vem sendo constantemente alterada e o modo em que os *Lactobacillus* são agrupados diferem, sendo dependentes de qual avaliação as espécies são submetidas, os mais utilizados são por características fenotípicas tradicionais, padrão fermentativo de açúcares e análise da sequência genética (BULL *et al.*, 2013). Todavia,



2.1.3.1. *Uso de Lactobacillus em dietas para bovinos*

este probiótico. Contudo, Alawneh *et al.* (2020), utilizando um produto comercial contendo a mistura de *L. paracasei*, *L. buchneri* e *L. casei* em forma de spray nos tetos de vacas de leite como tratamento pós ordenha, obtiveram resultados sugestivos de melhoria nos tetos, esfíncter dos tetos e saúde do úbere.

Ainda, Xu *et al.* (2017) suplementando vacas de leite com *Lactobacillus casei* Zhang e *Lactobacillus plantarum*, observaram que vacas que receberam os probióticos apresentaram aumento na produção de leite, na concentração de imunoglobulina G, lactoferrina, lisossomos e lactoperoxidase, e redução na quantidade de células somáticas no leite, além de reduzir algumas bactérias intestinais patógenas.

Já ao avaliar o efeito do fornecimento do *Lactobacillus acidophilus* cepa NP51 em bovinos de corte, Peterson *et al.* (2007) foram capazes de observar a redução presença de *Escherichia coli* O157:H7 nas fezes dos novilhos. Também, resultados positivos em bezerros desmamados, em crescimento e bezerros amamentados por vacas foram encontrados por Kelsey e Colpoys (2018), havendo melhoria na performance destes animais quando receberam suplementação com produto comercial contendo uma mistura de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*.

Todavia, quando o *Lactobacillus acidophilus* foi submetido a avaliação *in vitro* em quatro concentrações (0 ; $0,25 \times 10^7$; $0,50 \times 10^7$; e $0,75 \times 10^7$ UFC/ml), usando líquido ruminal bovino e testado com dois substratos, a palha de arroz e a palha de milho, foi obtido maiores concentrações de $\text{NH}_3\text{-N}$ e produção de gás *in vitro* com o maior nível de suplementação do probiótico (CHEN *et al.*, 2017).

Potenciais cepas são constantemente descobertas, caracterizadas e testadas como possíveis probióticos para o uso em animais, especialmente em bovinos, algumas destas bactérias que foram sugeridas são o *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum* e *L. mucosae* (DAMODHARAN *et al.*, 2016; JOBBY *et al.*, 2020; MALDONADO *et al.*, 2018).

2.1.4. *Megasphaera elsdenii*

Megasphaera elsdenii é uma bactéria do filo *Firmicutes* pertencem a família *Veillonellaceae* e ao gênero *Megasphaera* (MARCHANDIN; JUMAS-BILAK, 2014; ROGOSA, 1971). Como principal característica são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas em formato de *coccus*, nos ruminantes estão presentes no rúmen e nos intestinos, onde fermentam carboidratos e ácidos orgânicos, sendo considerado um dos principais organismos envolvidos no catabolismo do ácido láctico e desaminação de aminoácidos (MAROUNEK; FLIEGROVA; BARTOS, 1989).

Os primeiros a isolar a cepa de *Megasphaera elsdenii* foram Elsdén e Lewis (ELSDEN; LEWIS, 1953), que a descreveram como uma grande bactéria, estritamente anaeróbica, Gram-negativa, produtora de ácidos graxos voláteis, em forma de coccus e sem motilidade isolada no rúmen de ovinos. Contudo, as características descritivas desta cepa não se enquadravam nas demais já conhecidas passando a ser chamada como bactéria “LC” por Elsdén et al. (1956). Já em 1959, Gutierrez et al. (1959) encontraram um organismo similar à bactéria “LC” no rúmen de bovinos, concluindo ser do gênero *Peptostreptococcus* e propuseram a criação de uma nova espécie, a *P. elsdenii*, contudo Rogosa (1971) demonstrou que *P. elsdenii* isolada por Gutierrez et al. (1959) não era Gram-negativa, não podendo assim pertencer ao gênero *Peptostreptococcus*, propondo a transferência de *P. elsdenii* para um novo gênero, o *Megasphaera* e classificou o isolado “LC” de Elsdén et al. (1956) como sendo um cepa do *M. elsdenii*.

2.1.4.1. Uso de *Megasphaera elsdenii* em dietas para bovinos

Estudando o efeito da infusão ruminal via sonda (drench) com *Megasphaera elsdenii* no pH reticular, e dinâmicas na lactação de vacas de leite em acidose ruminal subaguda, Mazon et al. (2020), observaram efeito potencialmente benéfico da utilização do probiótico fornecido via sonda na dinâmica do pH, resiliência á acidose e possivelmente na produção de leite e consumo de alimento, contudo o horário da administração pareceu influenciar o estabelecimento do *M. elsdenii* e na eficácia da suplementação.

Já Lopes et al. (2021), avaliando touros que receberam uma única administração de *M. elsdenii* antes do início da dieta de adaptação de confinamento, ao qual a dieta final era composta por 91,5% de concentrado e 8,5% de volumoso, não encontraram desempenhos diferentes entre animais que receberam ou não o probiótico. Todavia, esta estratégia de fornecer *Megasphaera elsdenii* como probiótico em dose única no início da adaptação à dieta de confinamento, se mostrou útil, ao se observar que os animais que o receberam tiveram uma adaptação mais rápida ao concentrado (dieta com 7% feno de alfafa e 93% concentrado), e nenhum sinal de acidose foi observada neles no estudo de Veloso et al. (2021). Concordando com os achados de DeClerck et al. (2020), onde a utilização *M. elsdenii*, também em dose única, para vacas submetidas a dieta de confinamento com 10% de resíduo de algodão e 90% concentrado, sem adaptação previa, resultou em maior área de superfície absorptiva e maior razão entre área de papila e área de superfície absorptiva que as demais, sugerindo que o fornecimento de *M. elsdenii* atuou favoravelmente à ecologia do rúmen e possivelmente também na mitigação da acidificação do pH ruminal.

2.1.5. Tipos de apresentação dos probióticos

2.1.5.1. *Leveduras vivas*

Um dos métodos disponíveis para a suplementação com probióticos são através de leveduras vivas ou como também são chamadas “direct-feed microbials (DFM)”, em que cepas específicas são submetidas a câmaras fermentativas para crescimento e multiplicação, após atingido o volume desejado são separadas do meio de cultura e secas em baixa temperatura ($\sim -54\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou liofilizadas (FLYNN; ADAMS, 1981; LALLEMAND, 2022). Este tipo de processamento garante a viabilidade das leveduras, mantendo sua capacidade em formar novas colônias, permitindo assim o seu uso como probiótico (SHURSON, 2018). As leveduras vivas puras têm uma composição de 15-25 bilhões de células viáveis por grama de produto ($15\text{-}25 \times 10^9$ UFC/g), alguns produtos à base de leveduras vivas também podem levar em sua composição outros ingredientes, muitos destes produtos a concentração de células viáveis são de 5×10^9 UFC/g (STONE, 2006).

2.1.5.2. *Cultura de leveduras*

As culturas de leveduras geralmente são compostas pelo meio de cultura, leveduras e seus metabólitos produzidos durante o processo de fermentação, apesar de conterem células viáveis do fungo não são devidamente considerados como fonte de biomassa da levedura, por conter um número reduzido de células viáveis devido à sua diluição ao meio (SHURSON, 2018). Este tipo de probiótico é utilizado por proporcionar benefícios nutricionais e efeito na saúde dos animais por conter diversos metabolitos oriundos da fermentação das leveduras, como peptídeos, ésteres, álcoois e ácidos orgânicos (SHURSON, 2018).

2.1.5.3. *Esporos*

Os esporos de certas bactérias são utilizados principalmente quando há essa possibilidade, visto que são células em estado vegetativo, capazes de sobreviver em condições adversas de temperatura e desidratação, e quando em contato com o trato gastrointestinal dos animais são capazes de germinar, proliferar e esporular novamente, quando os recursos (nutrientes) são exauridos do meio (HONG; LE; CUTTING, 2005). Esta habilidade de alguns microrganismos em formar esporos permite tanto o armazenamento por maior tempo, quanto a uma maior viabilidade quando comparado a outros métodos utilizados em probióticos não esporulados, como é o caso do processo de liofilização ou secagem em câmaras frias, em que naturalmente

reduzem a viabilidade de algumas unidades de microrganismos (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018).

2.1.5.4. Resíduos de bioprodutos

No mundo é produzido uma grande quantidade de subprodutos ou resíduos formados nos processos de produção de etanol e bebidas alcoólicas, obtidas pela fermentação de grãos de cereais e outros ingredientes. Estes subprodutos ou resíduos de destilarias são secos, dando origem ao DDG (distillers dried grains) onde não apenas contém os grãos e ingrediente utilizados para a formação do produto principal (etanol ou bebidas alcoólicas) mas também as leveduras utilizadas (SHURSON, 2018). Apesar dos diferentes processos de fabricação, viabilidade das leveduras e composições químicas, alguns destes subprodutos têm se mostrado benéficos à saúde dos animais e são utilizados como ingredientes na formulação da dieta para animais (WAMBUI; ABDULRAZAK, 2010).

2.2. Antibióticos promotores de crescimento

A descoberta do efeito promotor de crescimento de alguns antibióticos foi em meados de 1940 (CASTANON, 2007). Já as publicações mais antigas apontando os efeitos benéficos são de Moore e Everson (1946), que estudaram o uso de sulfasuxidina, estreptotricina e estreptomicina em aves e de Jukes *et al.* (1950) que estudaram o uso de aureomicina em suínos. A aprovação pela agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (US-FDA) do uso de antibióticos nos animais sem prescrição médica foi realizada em 1951, enquanto que na Europa entre 1950 e 1960, cada país aprovou e regulou individualmente o uso dos antibióticos para utilização na alimentação dos animais de produção (CASTANON, 2007; JONES; RICKE, 2003).

A popularização do uso de antibióticos como aditivos alimentares se deu pela grande influência no trato gastrointestinal dos animais, suprimindo a competição de microrganismos indesejáveis que utilizam nutrientes e produzem substâncias indesejáveis ou tóxicas e melhorando o desempenho animal (GETABALEW; ALEMNEH; ZEWDIE, 2020). Assim, o uso de antibióticos utilizados de maneira não terapêutica, ou seja, com a função de promotor de crescimento tornou-se numa prática globalmente praticada (CHATTOPADHYAY, 2014). Desde então grande parte da produção de carne no mundo tem utilizado antibióticos promotores de crescimento, como observado na Figura 4, em 2010 a Espanha utilizou cerca de 259,5 mg de antibióticos por kg de carne produzida (corrigido por número e tipo de animal, PCU),

enquanto a Itália utilizou 421,1 mg/PCU, Estados Unidos da América utilizou 84,5 mg/PCU e Brasil 44,5 mg/PCU.

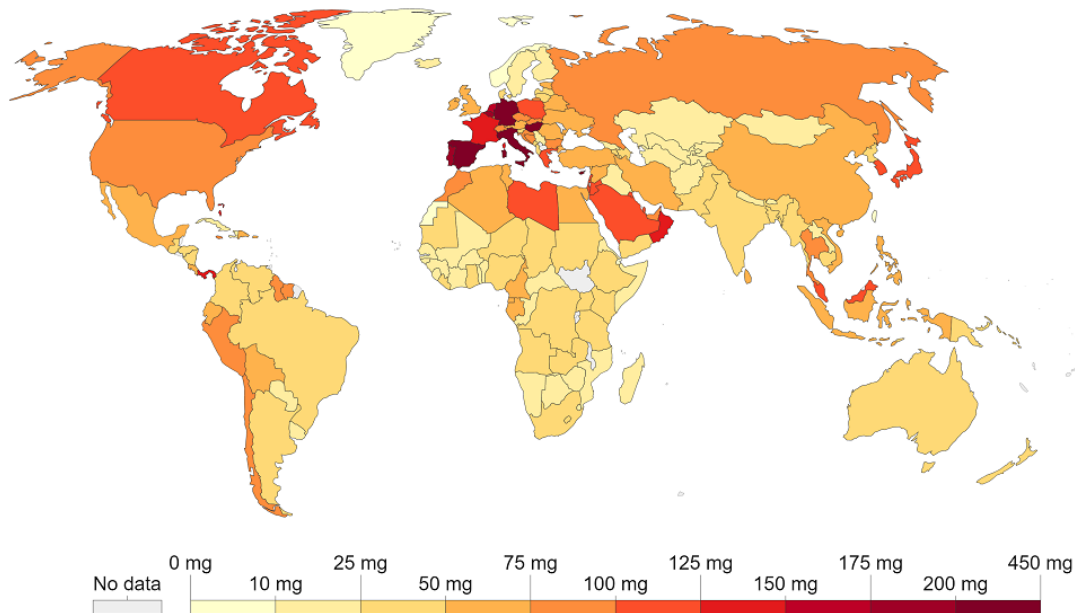


Figura 4. Uso de antibióticos na pecuária em miligramas de uso total por quilograma de produção de carne em 2010. (Adaptado de Broadfoot *et al.*, 2017; EMA, 2017; Van Boeckel *et al.*, 2015)

Como consequência do uso desenfreado de antibióticos na alimentação dos animais de produção (principalmente bovinos, aves e suínos) foi notado aumento em casos hospitalares de pessoas que tinham infecções bacterianas resistente à alguns antibióticos usados pela medicina humana, ocorrendo em primeiro momento a proibição do uso de antibióticos utilizados em humanos como aditivos nos alimentos dos animais por alguns países (CHATTOPADHYAY, 2014). Porém, a Suécia foi um dos primeiros países a banir o uso de antibióticos como promotores de crescimento, em 1986, seguido pela Dinamarca em 1998 e na sequência pela união europeia em 2006, todos pelo mesmo motivo: “a precaução do desenvolvimento de resistência bacteriana” (CASTANON, 2007). Porém o uso de monensina sódica foi reavaliado em 2007 e autorizado para ser utilizado como coccidiostático em aves (EMA, 2017).

Russell e Houlihan (2003), notaram que não foram identificados genes responsáveis por resistências das bactérias ruminais aos ionóforos, e que o uso desses na alimentação animais é pouquíssimo provável em transferir a resistência bacteriana aos humanos. Neumann *et al.* (2018), avaliaram resíduo de monensina sódica em tecidos e órgãos pós abate e concluíram que

o uso deste ionóforo em bovinos confinados além de melhorar a produtividade e performance econômica, não deixa resíduos nos tecidos consumíveis.

Atualmente, na união europeia é permitido o uso de monensina em vacas de leite na forma de dispositivo intraruminal de liberação contínua (Kexxtone®, Elanco GmbH, Cuxhaven, Alemanha) como forma de prevenir cetose nos animais (EMEA; VETERINARY MEDICINES AND INSPECTIONS, 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil é proibido o uso das seguintes substâncias na alimentação animal: Organoclorados (Portarias nº 329/1985 e 191/1986); Avoparcina (Of. Circ. DFPA nº 047/1998); Arsenicais e antimoniais (Portaria nº 31, 29/01/2002); Cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003); Substâncias com efeito tireostático, androgênico, estrogênico, gestagênico e β -agonista em aves (IN nº 17, 18/06/2004); Olaquinox (IN nº 11, 24/11/2004); Carbadox (IN nº 35, 14/11/2005); Violeta de Genciana (IN nº 34, 13/09/2007); Anfenicois, tetraciclins, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (IN nº 26, 9/07/2009 (Portaria nº 193/1998)); Substâncias, naturais ou artificiais, com atividade anabolizante hormonal em bovinos de abate (IN nº 55, 01/12/2011); Espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012); β -agonista em bovinos (Ato nº 01, 01/11/2012); Colistina (como aditivo melhorador de desempenho) (IN nº 45, 22/11/2016); Tilosina, lincomicina e tiamulina (como aditivo melhorador de desempenho)(IN nº 01, de 13/01/2020).

Os aditivos antimicrobianos permitidos e mais utilizados como promotores de crescimento para bovinos no Brasil são: bacitracina, flavomicina, lasalocida, monensina, narasina, salinomicina e virginiamicina (BRESSLAU, 2017). No Canadá, é aprovado o uso dos seguintes medicamentos para bovinos: amprolim, cloridrato de clortetraciclina, decoquinato, fenbendazol, lasalocida sódica, lubabergon, acetato de melengestrol, monensina sódica, tartarato de morantel, cloridrato de oxitetraciclina, poloxaleno, cloridrato de ractopamina, salinomicina sódica, tilmicosina, fosfato de tilosina, virginiamicina e cloridrato de zilpaterol (CFIA, 2018). Já nos EUA a lista de medicamentos liberados inclui os principais antibióticos promotores de crescimento como propionato de salinomicina, lasalocida, maduramicina, monensina sódica e narasina (NOVILLA, 2011; SHIELDS, 2009).

2.2.1. Ionóforos

Ionóforos são uma classe de antibióticos de origem bacteriana (*Streptomyces*), caracterizados principalmente por facilitarem o movimento de íons inorgânicos monovalentes e divalentes através de membranas biológicas. São compostos de baixa massa molecular, solúveis em

lipídeos, onde cada ionóforo atua em íons específicos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) carregando-o através da membrana, e são divididos em duas classes, os carreadores iônicos móveis e os carreadores formadores de canal (DEVLIN, 2004; MARCUCCI *et al.*, 2014). Os carreadores iônicos móveis difundem facilmente na membrana e passam a transportar os íons de um lado para o outro, como exemplo se tem a monensina, com ação “antiporte” e eletroneutro e a valinomicina, com ação “uniporte” e eletrogênico, já os formadores de canal formam um canal que atravessa a membrana e através dessa estrutura que conseguem difundir os íons, como exemplo a gramicidina e nistatina (DEVLIN, 2004).

Os principais ionóforos utilizados como aditivos na alimentação de bovinos são salinomicina, monensina e lasalocida (NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009). A monensina sódica possui maior preferência pelo Na^+ e apenas afinidade por íons monovalente, a salinomicina possui maior afinidade por íons K^+ e pouca afinidade por íons bivalentes, e a lasalocida têm afinidade tanto por cátions bivalentes como por monovalentes (Na^+ e K^+) (MARCUCI *et al.*, 2014; SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006).

Nos ruminantes o mecanismo de ação dos ionóforos no rúmen é realizado com a ligação do mesmo aos cátions de preferência, e os transportam pela membrana celular das bactérias, com a entrada destes cátions no interior das células, a bactéria tenta manter sua osmolaridade acionando seus mecanismos de bomba iônica, contudo utiliza suas reservas de energia, sendo levada à exaustão pelo continuo fluxo de íons carregados pelos ionóforos, afetando principalmente bactérias Gram-positivas, favorecendo o crescimento das Gram-negativas por serem mais resistentes à ação dos ionóforos, que acabam por dominar o meio, já que é reduzida a competição por substratos no rúmen (Figura 5) (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015; MARCUCCI *et al.*, 2014).

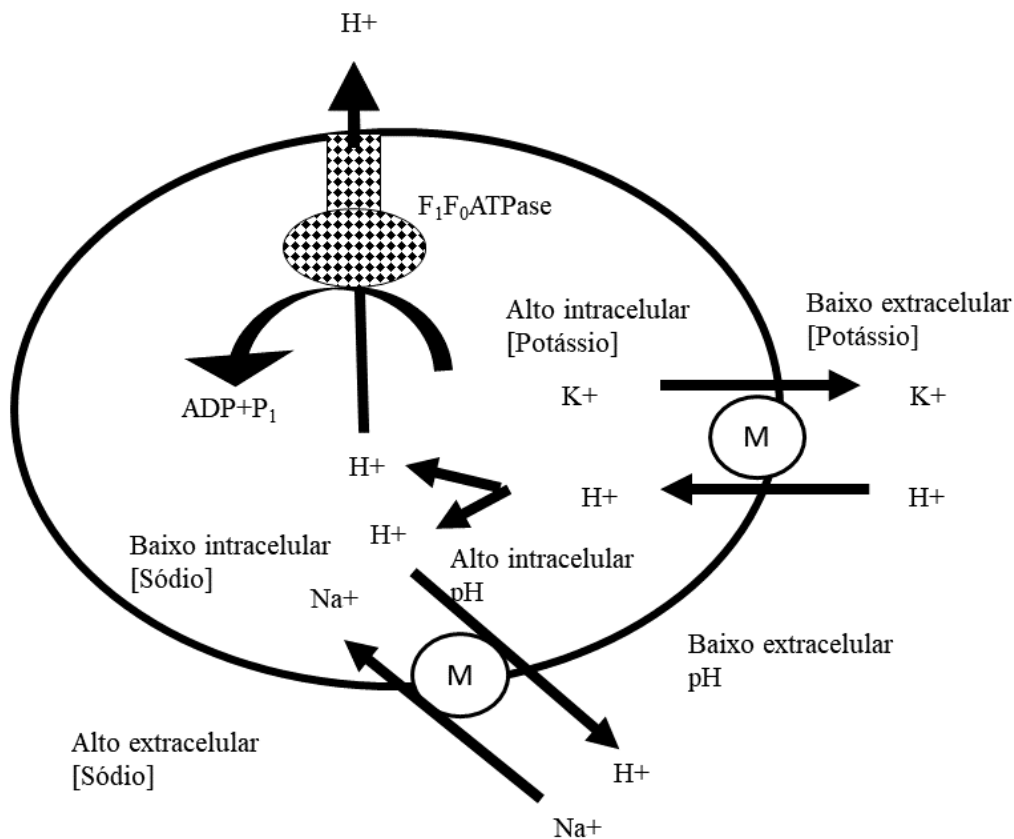


Figura 5. Modo de ação da monensina em bactérias Gram-positivas (Adaptado de Azzaz *et al.*, 2015).

2.2.1.1. Uso de monensina em dietas para bovinos

A monensina sódica desde a sua descoberta como promotor de crescimento para bovinos se tornou um dos aditivos mais utilizados em todo o mundo, sua ação direta na população microbiana ruminal seleciona determinados grupos de bactérias. Isto ocasiona em mudanças na quantidade e perfil de ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos, com aumento na produção de propionato, redução na produção de acetato e melhoria na eficiência alimentar (GONZÁLEZ *et al.*, 2012; HRISTOV *et al.*, 2013; WEISS *et al.*, 2020).

Parte da sua popularização como aditivo alimentar se deve pela utilidade nos rebanhos em confinamento, que recebem uma dieta com alta concentração energética proveniente de grãos amiláceos, que podem causar distúrbios metabólicos como a acidose ruminal nesses animais (VIANA *et al.*, 2021). Sua recomendação para as dietas desses rebanhos ocorre por dois mecanismos distintos de ação dos ionóforos, o primeiro é pela capacidade deles em reduzir a população de bactérias formadoras de ácido láctico como a *Streptococcus bovis* e o segundo mecanismo é pela alteração no consumo de alimento, com modificações no comportamento ingestivo dos animais, tanto reduzindo a velocidade de entrada de carboidratos rapidamente

fermentáveis no rúmen quanto reduzindo o consumo total de alimento, e como consequência da combinação destes dois mecanismos é melhorada a eficiência de utilização do alimento (ALMEIDA *et al.*, 2019; AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015; SILVA *et al.*, 2021). Outro efeito importante é na redução da produção de metano, pois a monensina atua na redução da disponibilidade de hidrogênio e formato, elementos fundamentais para as bactérias metanogênicas (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015; THOMPSON *et al.*, 2019). Como apresentado na metanálise de Appuhamy *et al.* (2013), ao qual foi observado efeito consistente da monensina sódica em reduzir a produção de metano em ruminantes. Além disso, na metanálise de Duffield *et al.* (2012), são relatados efeito linear na melhoria da eficiência alimentar, redução consumo de matéria seca e maior ganho de peso médio dos animais com a utilização da monensina sódica.

2.2.1.2. Uso de salinomicina em dietas para bovinos

A preferência de utilização da salinomicina se dá para bovinos manejados em pastos (BAGLEY *et al.*, 1988; ITAVO *et al.*, 2020; MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015; MOMBACH *et al.*, 2021), principalmente por este ionóforo afetar menos o consumo de alimento em comparação com a monensina sódica, pois devido a menor densidade energética da dieta consumida, a redução no consumo poderia resultar em menor desempenho dos animais.

Estudando o efeito da salinomicina em vacas de leite, Matloup *et al.* (2017) observaram aumento na ingestão de alimento, digestibilidade dos nutrientes, produção de leite e eficiência na produção de leite. Ainda, Neumann *et al.* (2016) avaliando o desempenho produtivo e inocuidade da carne de bovinos terminados em confinamento que receberam salinomicina, observaram que o aditivo não alterou o consumo de alimento em comparação com animais que não receberam o aditivo, também melhor ganho de peso e conversão alimentar foram obtidos nos animais que receberam salinomicina. Com relação a inocuidade da carne, Neumann *et al.* (2016) relataram que o jejum pré-abate de 16 horas foi suficiente para que tecidos consumíveis não apresentassem resíduo significantes do ionóforo.

Todavia, quando a salinomicina foi avaliada na dieta de bovinos de corte a pasto não causou efeito significativo no pH ruminal, nitrogênio amoniacal, nem na degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente ácido (FERREIRA *et al.*, 2019). Também, no estudo de Limede *et al.* (2021) não foi observado melhor ganho de peso, peso vivo final (corrigido para peso vazio), consumo de alimento e nem eficiência de utilização do alimento em novilhos com dieta a base de forragem e suplementados com salinomicina.

2.2.1.3. Uso de lasalocida em dietas para bovinos

A utilização da lasalocida, assim como da monensina sódica se deve pela melhoria no desempenho dos animais, por meio da seleção de microrganismos ruminais resultando no aumento da produção de propionato (BERGER; RICKE; FAHEY, 1981; GOLDER; LEAN, 2016). Contudo, o efeito na redução do consumo e palatabilidade da salinomomicina é menor que o da monensina sódica (BARRERAS *et al.*, 2013; ERICKSON *et al.*, 2004).

Quando avaliada a suplementação com lasalocida em novilhas de corte sob estresse por calor em dieta de terminação, foi observado aumento no ganho de peso, eficiência alimentar sem afetar o consumo de alimento esperado (BARRERAS *et al.*, 2013). Similar ao descrito na metanálise de Golder e Lean (2016), ao analisar a lasalocida em função da dose administrada e duração da administração, foi obtido efeito linear do ganho de peso diário, eficiência do ganho e eficiência alimentar conforme aumento da dose, porém foi observado redução linear no consumo de alimento de acordo com aumento da dose. Todavia, quando avaliado em bovinos criados a pasto, a suplementação com lasalocida não se mostrou efetiva em melhorar o ganho de peso (PICKETT; GUNTER, 2019; PICKETT *et al.*, 2020).

2.2.2. Não-ionóforos

Os antibióticos não-ionóforos utilizados para bovinos e autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil são a virginiamicina e a flavomicina (BRESSLAU, 2017). A virginiamicina é um antibiótico, produzido pelo microrganismo *Streptomyces virginiae*, formado por dois componentes químicos (fator M e fator S) que inibem a formação de ligações peptídicas, ao entrarem em contato com bactérias Gram-positivas bloqueiam a síntese de proteínas no interior da célula, ocasionando no impedimento do crescimento delas (MARINO; MEDEIROS, 2015). O efeito apenas em bactérias do tipo Gram-positivas se deve a impermeabilidade da parede celular das bactérias Gram-negativas, as tornando mais resistente à virginiamicina (VIANA *et al.*, 2021).

Já a flavomicina (em inglês *Bambermycin*) é um complexo recuperado a partir do *Streptomyces bambergiensis* que contém principalmente *Moenomycin A* e *C*, é um inibidor da síntese da camada peptidoglicana, que atua primariamente contra bactérias Gram-positivas e apresentam parede externa formada por peptidoglicanos, permeável a esse aditivo (HUBER; NESEMANN, 1968; NCBI, 2022).

2.2.2.1. Uso de virginiamicina em dietas para bovinos

Ítavo *et al.* (2020) observaram melhor desempenho e maior rentabilidade econômica em novilhos de corte em regime de pastagem que foi fornecido suplemento concentrado com virginiamicina, do que os animais que receberam salinomicina ou sem aditivo. Já quando a virginiamicina foi comparada a suplementação com monensina em estudo de metanálise, ambos os aditivos resultaram em melhores ganho de peso diário comparado ao controle (sem aditivo), porém não diferindo entre si, mas quando ajustado para a mesma dose, animais que receberam a virginiamicina apresentaram melhor ganho de peso em comparação aos que receberam monensin, sem que causassem redução no consumo de alimento (GOROCICA; TEDESCHI, 2017).

Quando a virginiamicina foi combinada com a salinomicina na dieta de terminação de novilhos de corte, foi possível observar redução no consumo de alimento, mas manutenção do ganho médio diário e melhoria na estimativa de consumo de energia líquida de manutenção e energia líquida de ganho em comparação a animais que receberam apenas a salinomicina (NUÑEZ *et al.*, 2013).

2.2.2.2. Uso de flavomicina em dietas para bovinos

Ao avaliar o uso de flavomicina em novinhos na fase de terminação, Smith *et al.* (2020) obtiveram resultados de maior consumo de alimento, marmoreio e carcaças classificadas como “Choice” (USDA quality grade) nos animais que receberam flavomicina comparado aos que receberam monensina + tilosina. Porém, em outro estudo avaliando a inclusão de flavomicina e salinomicina em bovinos a pasto, não foi observado melhor eficiência alimentar, nem no consumo de matéria seca, nutrientes ou digestibilidade dos nutrientes com a utilização destes aditivos (LIMEDE *et al.*, 2021).

Quando combinado flavomicina ou virginiamicina com monensina na dieta de novilhos em terminação com dieta sem volumoso, Lemos *et al.* (2016) não obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos para os índices produtivos de ganho de peso, nem para digestibilidade, pH ruminal, N-NH₃, AGV e número de protozoários.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC, A. B. D. I. E. D. C. Perfil da pecuária no Brasil. **BeefREPORT**, p. 49, 2020. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2022.
- ALAWNEH, J. I.; JAMES, A. S.; PHILLIPS, N.; FRASER, B.; JURY, K.; SOUST, M.; OLCHOWY, T. W. J. Efficacy of a Lactobacillus-Based Teat Spray on Udder Health in Lactating Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 584436, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.584436>
- ALMEIDA, M. T. C.; PASCHOALOTO, J. R.; PEREZ, H. L.; CARVALHO, V. B.; HOMEM JUNIOR, A. C.; FAVARO, V. R.; BLAIR, H. T.; EZEQUIEL, J. M. B. Effect of adding crude glycerine to diets with feed additives on the feed intake, ruminal degradability, volatile fatty acid concentrations and in vitro gas production of feedlot Nellore cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, n. 4, p. 988–996, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jpn.13105>
- APPUHAMY, J. R. N. A. D.; STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J.; KEBREAB, E. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5161–5173, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; MORSY, T. A. Utility of ionophores for ruminant animals: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 6, p. 254–265, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ajas.2015.254.265>
- BAGLEY, C. P.; FEAZEL, J. I.; MORRISON, D. G.; LUCAS, D. M. Effects of Salinomycin on Ruminal Characteristics and Performance of Grazing Beef Steers. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 3, p. 792, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1988.663792x>
- BARRERAS, A.; CASTRO-PÉREZ, B. I.; LÓPEZ-SOTO, M. A.; TORRENTERA, N. G.; MONTAÑO, M. F.; ESTRADA-ANGULO, A.; RÍOS, F. G.; DÁVILA-RAMOS, H.; PLASCENCIA, A.; ZINN, R. A. Influence of ionophore supplementation on growth performance, dietary energetics and carcass characteristics in finishing cattle during period of heat stress. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1553–1561, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13216>

- BEIJERINCK, M. Anhaufungsversuche mit Ureumbakterien. **Centralblatt f. Bakteriologie**, n. 7, p. 33–61, 1901. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10010576539/>. Acesso em: 14 jan. 2022.
- BERGER, L. L.; RICKE, S. C.; FAHEY, G. C. Comparison of two forms and two levels of lasalocid with monensin on feedlot cattle performance. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1440–1445, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1982.5361440x>
- BOWMAN, S. M.; QUANTZ, S. T.; REHBERGER, T.; HABIB, K.; SMITH, K.; BOOMER, W.; TARPOFF, A. J.; BRADFORD, B. J.; GRAGG, S. E.; JONES, C. K. 47 Effects of Lactobacillus and Bacillus Probiotics on Pre-ruminating Calf Growth Performance and Efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. Supplement_1, p. 149–150, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/skab054.255>
- BRESSLAU, S. **Seminário CBPA/DEPROS/SMC e ENAGRO sobre boas práticas na suinocultura - Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos**. Brasília: [s. n.], 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/bem-estar-animal/eventos/arquivos/SUZANA.MAPACPRASeminrioSMCBPAsuinoculturamaro2017.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2022.
- BROADFOOT, F.; HEALEY, K.; BROWN, S.; VIDAL, A. **UK-VARSS 2016 UK-Veterinary Antibiotic Resistance and Sales Surveillance Report**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.nationalarchives.gov.uk/doc/open-government-licence/version/3/oremailPSI@nationalarchives.gsi.gov.uk. Acesso em: 27 jan. 2022.
- BROUSSEAU, J. P.; TALBOT, G.; BEAUDOIN, F.; LAUZON, K.; ROY, D.; LESSARD, M. Effects of probiotics *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M and *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* strain SB-CNCM I-1079 on fecal and intestinal microbiota of nursing and weanling piglets. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 11, p. 5313–5326, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9190>
- BULL, M.; PLUMMER, S.; MARCHESI, J.; MAHENTHIRALINGAM, E. **The life history of Lactobacillus acidophilus as a probiotic: A tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success**. [S. l.]: Oxford Academic, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12293>
- CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Ruminal Bacteria that Utilize Lactate and Digest Cellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2035–2044,

1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(97\)76148-4](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(97)76148-4)

CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466–2471, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/PS.2007-00249>

CFIA. Medication sequencing guideline for management of drug carryover - Canadian Food Inspection Agency. **Canadian Food Inspection Agency**, p. 1, 2018. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/inspection-program/medication-sequencing/eng/1389362488069/1389362490053>

CHATTOPADHYAY, M. K. Use of antibiotics as feed additives: A burning question. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JULY, p. 334, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00334>

CHEN, L.; REN, A.; ZHOU, C.; TAN, Z. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation for improving in vitro rumen fermentation characteristics of cereal straws. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 1, p. 52–60, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1262753>

CROWCH, M. **Classification of *Saccharomyces boulardii* | Professionals**. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://www.optibacprobiotics.com/professionals/latest-research/general-health/classification-of-saccharomyces-boulardii>. Acesso em: 11 jan. 2022.

DAMODHARAN, K.; PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; SUH, J. W. Functional probiotic characterization and in vivo cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus helveticus* isolated from fermented cow milk. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1675–1686, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03005>

DECLERCK, J. C.; REEVES, N. R.; MILLER, M. F.; JOHNSON, B. J.; DUCHARME, G. A.; RATHMANN, R. J. The influence of *Megasphaera elsdenii* on rumen morphometrics of cull cows immediately stepped up to a high-energy finishing diet. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 194–205, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/TAS/TXZ185>

DEHGHAN-BANADAKY, M.; EBRAHIMI, M.; MOTAMENY, R.; HEIDARI, S. R. Effects of live yeast supplementation on mid-lactation dairy cows performances, milk composition, rumen digestion and plasma metabolites during hot season. **Journal of Applied Animal Research**, v. 41, n. 2, p. 137–142, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09712119.2012.739085>

- DEVLIN, T. M. **BIOQUIMICA: LIBRO DE TEXTO CON APLICACIONES CLINICAS (VOL. 2) (4ª ED.)** -. 4. ed. Barcelona: Reverté, 2004.
- DIAZ, T. G.; BRANCO, A. F.; JACOVACI, F. A.; JOBIM, C. C.; BOLSON, D. C.; DANIEL, J. L. P. Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharides in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193313>
- DU, R.; JIAO, S.; DAI, Y.; AN, J.; LV, J.; YAN, X.; WANG, J.; HAN, B. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 2006, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02006>
- DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PÉREZ-MUÑOZ, M. E.; LEULIER, F.; GÄNZLE, M.; WALTER, J. **Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus***. [S. l.]: Oxford Academic, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>
- DUFFIELD, T. F.; MERRILL, J. K.; BAGG, R. N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 12, p. 4583–4592, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-5018>
- EDWARDS-INGRAM, L.; GITSHAM, P.; BURTON, N.; WARHURST, G.; CLARKE, I.; HOYLE, D.; OLIVER, S. G.; STATEVA, L. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2458–2467, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02201-06>
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fat. **EFSA Journal**, v. 12, n. 7, p. 17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3766>
- ELSDEN, S. R.; LEWIS, D. The production of fatty acids by a gram-negative coccus. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 1, p. 183–189, 1953. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj0550183>
- ELSDEN, S. R.; VOLCANI, B. E.; GILCHRIST, F. M. C.; LEWIS, D. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. **Journal of Bacteriology**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 1956.

Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.72.5.681-689.1956>

EMA (EUROPEAN MEDICINE AGENCY). **Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. (EMA/184855/2017)Seventh ESVAC report.** London.

EMEA. **COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR VETERINARY USE MONENSIN (Cattle, including dairy cows). EMEA/CVMP/185123/2007-Fina.** London: [s. n.], 2007. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu>. Acesso em: 1 fev. 2022.

ERICKSON, P. S.; DAVIS, M. L.; MURDOCK, C. S.; PASTIR, K. E.; MURPHY, M. R.; SCHWAB, C. G.; MARDEN, J. I. Ionophore taste preferences of dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3314–3320, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/2004.82113314x>

FAO. **World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020.** Rome: FAO, 2020. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb1329en>

FEINER, G. The microbiology of specific bacteria. *In: Meat Products Handbook.* [S. l.]: Woodhead Publishing, 2006. p. 595–615. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845691721.3.595>

FERREIRA, S. F.; DE RESENDE FERNANDES, J. J.; PADUA, J. T.; BILEGO, U. O.; DE FREITAS NETO, M. D.; FURTADO, R. G. Use of virginiamycin and salinomycin in the diet of beef cattle reared under grazing during the rainy season: Performance and ruminal metabolism. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-26867>

FIJAN, S. **Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature.** [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>

FLYNN, G.; ADAMS, M. R. **An industrial profile of yeast production.** London: Tropical Products Institute, 1981.

GARCIA-MAZCORRO, J. F.; ISHAQ, S. L.; RODRIGUEZ-HERRERA, M. V; GARCIA-HERNANDEZ, C. A.; KAWAS, J. R.; NAGARAJA, T. G. Review: Are there indigenous *Saccharomyces* in the digestive tract of livestock animal species? Implications for health, nutrition and productivity traits. **Animal**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119001599>

GETABALEW, M.; ALEMNEH, T.; ZEWDIE, D. Types and Uses of Growth Promoters in Beef Cattle.

Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2020.

GHAZANFAR, S.; KHALID, N.; AHMED, I.; IMRAN, M. Probiotic Yeast: Mode of Action and Its Effects on Ruminant Nutrition. In: **Yeast - Industrial Applications**. [S. l.]: IntechOpen, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.70778>. Acesso em: 7 jan. 2022.

GOLDER, H. M.; LEAN, I. J. A meta-analysis of lasalocid effects on rumen measures, beef and dairy performance, and carcass traits in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 306–326, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9694>

GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; FERRET, A. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, n. 1–2, p. 66–79, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.009>

GOROCICA, M. A.; TEDESCHI, L. O. 145 A meta-analytical approach to evaluate the performance of cattle fed virginiamycin or monensin under feedlot conditions from seven European countries. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. suppl_4, p. 71–71, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/asasann.2017.145>

GREENE, W. A.; GANO, A. M.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; TODHUNTER, D. A. Comparison of Probiotic and Antibiotic Intramammary Therapy of Cattle with Elevated Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 2976–2981, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78483-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78483-X)

GUTIERREZ, J.; DAVIS, R. E.; LINDAHL, I. L.; WARWICK, E. J. Bacterial Changes in the Rumen During the Onset of Feed-lot Bloat of Cattle and Characteristics of *Peptostreptococcus elsdenii* n. sp. **Applied Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 16–22, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/am.7.1.16-22.1959>

HONG, H. A.; LE, H. D.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 813–835, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001>

HRISTOV, A. N.; OH, J.; FIRKINS, J. L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H. P. S.; ADESOGAN, A. T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P. J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J. M. SPECIAL TOPICS — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from

- animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options1. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5045–5069, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- HUBER, G.; NESEMAN, G. Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, n. 1, p. 7–13, 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90704-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90704-3)
- ÍTAVO, L. C. V.; ÍTAVO, C. C. B. F.; DIAS, A. M.; FRANCO, G. L.; MORAIS, M. D. G.; SOUZA, A. R. D. L.; PEREIRA, C. da S.; INACIO, A. G.; MATEUS, R. G.; PEREIRA, L. C. The Effect of Nutritional Additives and Nitrogen Supplements Used for Nellore Steers During Growth Phase Fed on Deferred Pasture. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 2, p. 820, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5296/jas.v8i2.17226>
- JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØ, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383–391, 2013 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- JIMÉNEZ, G.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; ROSSELLÓ-MORA, R. Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, p. 1080–1093, 2013 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01080-13>
- JOBBY, R.; FLORA, Y.; BORA, A.; JHA, P.; KAWALKAR, H.; DESAI, N. Exploring Probiotic Activity of *Lactobacillus* sp. Isolated from Indigenous Breeds of Cattle Milk and Fecal Samples in Bhatan Village, MH., IN. **Current Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 1184–1190, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01910-x>
- JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. In: 2003, **Poultry Science**. [S. l.: s. n.] p. 613–617. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.613>
- JUKES, T. H.; STOKSTAD, E. L. R.; TAYLOE, R. R.; CUNHA, T. J.; EDWARDS, H. M.; MEADOWS, G. B. Growth-promoting effect of aureomycin on pigs. **Archives of biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 324–325, 1950.

- KAYSER, W. C.; CARSTENS, G. E.; WASHBURN, K. E.; WELSH, T. H.; LAWHON, S. D.; REDDY, S. M.; PINCHAK, W. E.; CHEVAUX, E.; SKIDMORE, A. L. Effects of combined viral-bacterial challenge with or without supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii strain CNCM I-1079 on immune upregulation and DMI in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 3, p. 1171–1184, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/sky483>
- KELSEY, A. J.; COLPOYS, J. D. Effects of dietary probiotics on beef cattle performance and stress. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 27, p. 8–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.05.010>
- KEYSER, S. A.; MCMENIMAN, J. P.; SMITH, D. R.; MACDONALD, J. C.; GALYEAN, M. L. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* subspecies boulardii CNCM I-1079 on feed intake by healthy beef cattle treated with florfenicol and on health and performance of newly received beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 5, p. 1264–1273, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2006-751>
- KŘÍŽOVÁ, L.; RICHTER, M.; TRÍNÁCTÝ, J.; ŘÍHA, J.; KUMPRECHTOVÁ, D. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, n. 1, p. 37–45, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/39/2010-cjas>
- KWEON, C. H.; CHOI, S. Y.; KWON, H. Y.; KIM, E. H.; KANG, H. M.; MOON, J. S.; JANG, G. C.; LEE, H. S.; KANG, S. W.; KIM, J. M.; PYO, S.; RHEE, D. K. Isolation, characterization, and evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolated from cow milk. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 3, p. 169–176, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.14405/kjvr.2012.52.3.169>
- LALLEMAND. **Leveduras e Bactérias: nossas Unidades de Produção | Lallemand Animal Nutrition**. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://lallemandanimalnutrition.com/pt-br/brazil/sobre-nos/unidades-de-producao/>. Acesso em: 11 jan. 2022.
- LEMONS, B. J. M.; CASTRO, F. G. F.; SANTOS, L. S.; MENDONÇA, B. P. C.; COUTO, V. R. M.; FERNANDES, J. J. R. Monensin, virginiamycin, and flavomycin in a no-roughage finishing diet fed to zebu cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 10, p. 4307–4314, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0504>
- LIMEDE, A. C.; MARQUES, R. S.; POLIZEL, D. M.; CAPPELLOZZA, B. I.; MISZURA, A. A.; BARROSO, J. P. R.; STORTI MARTINS, A.; SARDINHA, L. A.; BAGGIO, M.; PIRES, A. V. 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. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/skab005>
- LIU, J. J.; KONG, I. I.; ZHANG, G. C.; JAYAKODY, L. N.; KIM, H.; XIA, P. F.; KWAK, S.; SUNG, B. H.; SOHN, J. H.; WALUKIEWICZ, H. E.; RAO, C. V.; JIN, Y. S. Metabolic engineering of probiotic *Saccharomyces boulardii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2280–2287, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-16>
- LOPES, A. L.; SANTOS, F. A. P.; MESCHIATTI, M.; DE OLIVEIRA, M. O.; FERNANDES, J. J. R.; DROUILLARD, J. S.; CAPPELLOZZA, B. I. Effects of *Megasphaera elsdenii* administration on performance and carcass traits of finishing *Bos indicus* feedlot cattle. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/tas/txab091>
- ŁUKASZEWICZ, M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* – Probiotic Yeast. In: **Probiotics**. [S. l.]: InTech, 2012. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/50105>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- MACKOWIAK, P. A. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. **Frontiers in Public Health**, v. 1, n. NOV, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>
- MAGRIN, L.; GOTTARDO, F.; FIORE, E.; GIANESSELLA, M.; MARTIN, B.; CHEVAUX, E.; COZZI, G. Use of a live yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* in a high-concentrate diet fed to finishing Charolais bulls: effects on growth, slaughter performance, behavior, and rumen environment. **Animal Feed Science and Technology**, v. 241, p. 84–93, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.04.021>
- MALDONADO, N. C.; FICOSECO, C. A.; MANSILLA, F. I.; MELIÁN, C.; HÉBERT, E. M.; VIGNOLO, G. M.; NADER-MACÍAS, M. E. F. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. **Livestock Science**, v. 212, p. 99–110, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.003>
- MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; VAN ELSAS, J. D. Ecology of Bacillaceae. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013>
- MARCHANDIN, H.; JUMAS-BILAK, E. The Family Veillonellaceae. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. v. 9783642301p. 433–453. *E-book*. Disponível em:

https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_361

MARCUCCI, M. T.; TOMA, H. S.; SANTOS, M. D. dos; ROMERO, J. V.; MONTEIRO TOMA, C. D.; CARVALHO, A. de M.; CAMARGO, L. M. de. Efeito Do Aditivo Monensina Sódica No Metabolismo Ruminal De Bovinos De Corte. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 22, p. 21, 2014. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ZfyhETSlhGfeowy_2014-2-8-9-35-10.pdf. Acesso em: 27 jan. 2022.

MARINO, C. T.; MEDEIROS, S. R. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. **Embrapa Gado de Corte**, p. 95–106, 2015. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1011225/1/NutricaoAnimalCAPITULO07.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2022.

MAROUNEK, M.; FLIEGROVA, K.; BARTOS, S. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1570–1573, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.55.6.1570-1573.1989>.

MATLOUP, O. H.; ABD EL TAWAB, A. M.; HASSAN, A. A.; HADHOUD, F. I.; KHATTAB, M. S. A.; KHALEL, M. S.; SALLAM, S. M. A.; KHOLIF, A. E. Performance of lactating Friesian cows fed a diet supplemented with coriander oil: Feed intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood chemistry, and milk production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 226, p. 88–97, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.012>

MAZON, G.; CAMPLER, M. R.; HOLCOMB, C.; BEWLEY, J. M.; COSTA, J. H. C. Effects of a *Megasphaera elsdenii* oral drench on reticulorumen pH dynamics in lactating dairy cows under subacute ruminal acidosis challenge. **Animal Feed Science and Technology**, v. 261, p. 114404, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114404>

MEDEIROS, S. R.; GOMES, R. C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. Brasília: Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 2015. Acesso em: 18 jan. 2022.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 6, p. 1334–1346, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13690>

- 964 MOMBACH, M. A.; DA SILVA CABRAL, L.; LIMA, L. R.; FERREIRA, D. C.; PEDREIRA, B. C.;
 965 PEREIRA, D. H. Association of ionophores, yeast, and bacterial probiotics alters the abundance of
 966 ruminal microbial species of pasture intensively finished beef cattle. **Tropical Animal Health and**
 967 **Production**, v. 53, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02617-2>
 968
- 969 MOORE, P. R.; EVENSON, A. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional
 970 studies with the chick. **The Journal of biological chemistry**, v. 165, n. 2, p. 437–441, 1946. Disponível
 971 em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)41154-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)41154-9)
 972
- 973 NAEEM, M.; AHMED, I.; AHMED, S.; AHMED, Z.; RIAZ, M. N.; GHAZANFAR, S. Screening of
 974 cattle gut associated *Bacillus* strains for their potential use as animal probiotic. **Indian Journal of**
 975 **Animal Research**, n. of, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18805/ijar.b-948>
 976
- 977 NASEEB, S.; JAMES, S. A.; ALSAMMAR, H.; MICHAELS, C. J.; GINI, B.; NUENO-PALOP, C.;
 978 BOND, C. J.; MCGHIE, H.; ROBERTS, I. N.; DELNERI, D. *Saccharomyces jurei* sp. Nov., isolation
 979 and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. **International Journal of**
 980 **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2046–2052, 2017. Disponível em:
 981 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>
 982
- 983 NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 6433554, Bambermycins**. [s. l.], 2022. Disponível
 984 em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bambermycins>. Acesso em: 2 fev. 2022.
 985
- 986 NEUMANN, M.; UENO, R. K.; HEKER, J. C.; ASKEL, E. J.; DE SOUZA, A. M.; VIGNE, G. L. D.;
 987 POZYNEK, M.; COELHO, M. G.; ETO, A. K. Growth performance and safety of meat from cattle
 988 feedlot finished with monensin in the ration. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 697–709, 2018.
 989 Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p697>
 990
- 991 NEUMANN, M.; UENO, R. K.; HORST, E. H.; KOWALSKI, L. H.; ETO, A. K.; BARCELLOS, J. O.
 992 J.; MIZUBUTI, I. Y. Production performance and safety of meat from beef cattle finished in feedlots
 993 using salinomycin in the diet. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 4221–4234, 2016. Disponível
 994 em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p4221>
 995
- 996 NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces*
 997 *cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 249–261, 1996.
 998 Disponível em: <https://doi.org/10.1079/bjn19960029>
 999
- 1000 NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. **Intoxicação por antibióticos ionóforos em**

- animais**. [S. l.]: Colégio Brasileiro de Patologia Animal - CBPA, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000300001>
- NOVILLA, M. N. Ionophores. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. [S. l.]: Elsevier, 2011. p. 373–384. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10029-3>
- NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.17226/9791>
- NUÑEZ, A. J. C.; CAETANO, M.; BERNDT, A.; DEMARCHI, J. J. A. de A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nellore steers fed high concentrate diets. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 229–236, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400002>
- O’FLAHERTY, S.; BRINER CRAWLEY, A.; THERIOT, C. M.; BARRANGOU, R. The Lactobacillus Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. **mSphere**, v. 3, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msphere.00140-18>
- OREM, J. C. de. **Diversidades funcional e filogenética de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo**. 2018. - Universidade de Brasília, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/35948>. Acesso em: 18 jan. 2022.
- PARK, Y. W. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1–12. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780813821504.ch1>
- PETERSON, R. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; FOLMER, J.; HINKLEY, S.; MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R. Effect of Lactobacillus acidophilus strain NP51 on Escherichia coli O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 287–291, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.287>
- PICKETT, A.; GUNTER, S. 172 Effect of energy and lasalocid supplementation on stocker cattle performance grazing winter-wheat pasture. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. Supplement_1, p. 59–60, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/skz053.134>
- PICKETT, A. T.; KEGLEY, E.; BECK, P. A.; GUNTER, S. A. 163 The effects of energy and lasalocid supplementation on forage intake and energetics of cattle grazing wheat pasture. **Journal of Animal**

- Science**, v. 98, n. Supplement_2, p. 11–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/skz397.026>
- RENAUD, D. L.; SHOCK, D. A.; ROCHE, S. M.; STEELE, M. A.; CHEVAUX, E.; SKIDMORE, A. L. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 fed before weaning on health and growth of male dairy calves. **Applied Animal Science**, v. 35, n. 6, p. 570–576, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15232/aas.2019-01889>
- ROGOSA, M. Transfer of *Peptostreptococcus elsdenii* Gutierrez et al. to a New Genus, *Megasphaera* [M. elsdenii (Gutierrez et al.) comb. nov.]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 2, p. 187–189, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-21-2-187>
- 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. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00019-6)
- SALMAN, A. K. D.; PAZIANI, S. F.; SOARES, J. P. G. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. **Embrapa - Documentos** 101, p. 24, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAF-RO-2010/14287/1/doc101-ionoforos.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2022.
- SCOTT, R. I.; YARLETT, N.; HILLMAN, K.; WILLIAMS, A. G.; LLOYD, D.; WILLIAMS, T. N. The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 1, p. 143–149, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02658.x>
- SHIELDS, T. Animal Drugs @ FDA. **Journal of the Medical Library Association : JMLA**, v. 97, n. 2, p. 158–158, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3163/1536-5050.97.2.021>
- SHURSON, G. C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 60–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>
- SILVA, S. N. S.; CHABRILLAT, T.; KERROS, S.; GUILLAUME, S.; GANDRA, J. R.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, F. F.; MESQUITA, L. G.; GORDIANO, L. A.; CAMARGO, G. M. F.; RIBEIRO, C. V. DI M.; ARAÚJO, M. L. G. M. L.; ALBA, H. D. R.; SILVA, R. D. G.; FREITAS JUNIOR., J. E. Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 275, p. 114886,

2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114886>

SMITH, Z. K.; CRAWFORD, G. I.; LOE, E. R. Effect of bambermycin and dietary distillers grains concentration on growth performance and carcass characteristics of finishing steers¹. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 95–101, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/tas/txz166>

SONG, D.; IBRAHIM, S.; HAYEK, S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In: **Probiotics**. [S. l.]: InTech, 2012. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/50121>

SOUZA, V. L.; LOPES, N. M.; ZACARONI, O. F.; SILVEIRA, V. A.; PEREIRA, R. A. N.; FREITAS, J. A.; ALMEIDA, R.; SALVATI, G. G. S.; PEREIRA, M. N. Lactation performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. **Livestock Science**, v. 200, p. 35–39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.03.023>

STONE, C. W. **Yeast Products in the Feed Industry: A Practical Guide for Feed Professionals**. [s. l.], 2006. Disponível em: <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/yeast-products-in-feed-industry-t33489.htm>. Acesso em: 24 mar. 2022.

THEURER, M. E.; FOX, J. T.; AGUILAR, A.; NIELSEN, H.; SIMPSON, J.; LAWRENCE, T. E. Effect of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae* boulandii CNCM I-1079) feed additive on health and growth parameters of high-risk heifers in a commercial feedlot. **Bovine Practitioner**, v. 53, n. 2, p. 117–127, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.21423/bovine-vol53no2p117-127>

THOMPSON, L. R.; BECK, M. R.; GUNTER, S. A.; WILLIAMS, G. D.; PLACE, S. E.; REUTER, R. R. An energy and monensin supplement reduces methane emission intensity of stocker cattle grazing winter wheat. **Applied Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 433–440, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15232/aas.2018-01841>

TORREZAN, T. M.; SILVA, J. T. da; MIQUEO, E.; ROCHA, N. B.; SILVA, F. L. M.; BALDASSIN, S.; BITTAR, C. M. M. Desempenho de bezerros leiteiros recebendo probiótico contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 3, p. 508–519, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-99402016000300016>

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. **Microbes and environments**, v. 30, n. 2, p. 126–132, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176>

- VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- VELOSO, V. de A.; VAN BIBBER-KRUEGER, C. L.; HORTON, L. M.; KARGES, K. K.; DROUILLARD, J. S. Effects of ruminally-protected lysine and *Megasphaera elsdenii* on performance and carcass characteristics of finishing cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 275, p. 114837, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114837>
- VIANA, C. H. R.; VALENTIM, J. K.; DE RESENDE, G. A.; DE CASTILHO, V. A. R.; PANTOJA, J. de C.; PIETRAMALE, R. T. R.; PRZYBULINSKI, B. B.; ZIEMNICZAK, H. M. Utilização de Aditivos para Bovinos de Corte em Confinamento. **Ensaio e Ciência**, v. 24, n. 5- esp., p. 536–543, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2020v24n5-esp.p536-543>
- VILLOT, C.; MA, T.; RENAUD, D. L.; GHAFARI, M. H.; GIBSON, D. J.; SKIDMORE, A.; CHEVAUX, E.; GUAN, L. L.; STEELE, M. A. *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 affects health, growth, and fecal microbiota in milk-fed veal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 7011–7025, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16149>
- VILLOT, C.; RENAUD, D.; SKIDMORE, A.; AGUILAR, A.; CHEVAUX, E.; STEELE, M. 239 Effect of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii supplementation on the health and performance of male Holstein calves. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. suppl_3, p. 22–23, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/sky404.052>
- WAMBUI, C.; ABDULRAZAK, S. Effect of yeast supplementation on in vitro ruminal degradability of selected browse species from Kenya. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 553–557, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1234/4.2010.1754>
- WEISS, C. P.; BECK, P. A.; GADBERRY, M. S.; RICHESON, J. T.; WILSON, B. K.; ROBINSON, C. A.; ZHAO, J.; HESS, T.; HUBBELL, D. Effects of intake of monensin during the stocker phase and subsequent finishing phase on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. **Applied Animal Science**, v. 36, n. 5, p. 668–676, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02031>
- WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) AND FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION (FAO). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. **Probiotics in food**, p. 2, 2001.

1149

1150 XU, H.; HUANG, W.; HOU, Q.; KWOK, L. yu; SUN, Z.; MA, H.; ZHAO, F.; LEE, Y. K.; ZHANG,
1151 H. The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria
1152 microbiota of dairy cows. **Science Bulletin**, v. 62, n. 11, p. 767–774, 2017. Disponível em:
1153 <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.04.019>

1154

1155 YAO, J.; WANG, L.; ZHANG, W.; LIU, M.; NIU, J. Effects of *Bacillus megaterium* on growth
1156 performance, serum biochemical parameters, antioxidant capacity, and immune function in suckling
1157 calves. **Open Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1033–1041, 2020. Disponível em:
1158 <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0106>

1159

1160

ARTIGO 1

Cinética da produção de gás *in vitro* e ajuste de modelos matemáticos da silagem de milho

Kinetics of in vitro gas production and fitting mathematical models of corn silage

Camila da Silva Zornitta ¹, Luis Carlos Vinhas Ítavo ^{2*}, Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo ², Geraldo Tadeu dos Santos ², Alexandre Menezes Dias ², Gelson dos Santos Difante ² e Antonio Leandro Chaves Gurgel ¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande—MS 79070-900, Brasil; camikasilva@gmail.com (C.d.S.Z.); antonioleandro09@gmail.com (A.L.C.G.)

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande—MS 79070-900, Brasil; camila.itavo@ufms.br (C.C.B.F.Í.); geraldo.tadeu@ufms.br (G.T.d.S.); alexandre.menezes@ufms.br (A.M.D.); gelson.difante@ufms.br (G.d.S.D.)

* Correspondente: luis.itavo@ufms.br; Tel.: +55-67-3345-3572; Fax: +55-67-3345-3600

Redigido conforme normas da revista Fermentation, com exceção do idioma

Artigo publicado no periódico científico Fermentation (ISSN: 2311-5637).

DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040298>

Resumo

O objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos do inóculo ruminal de novilhos recebendo diferentes combinações de ionóforo e probióticos em suas dietas sobre a produção de gases *in vitro* de silagem de milho. O ajuste da produção de gás foi realizado com cinco modelos matemáticos e sua cinética foi avaliada. Quatro novilhos mestiços ($403,0 \pm 75,5$ kg de peso corporal) com cânula ruminal foram designados para um desenho em quadrado latino 4×4 . Os aditivos utilizados foram Monensina sódica (Rumensin[®] 100, 3 g / dia), *Bacillus toyonensis* (Micro-Cell Platinum[®] 10⁹, 1 g / dia) e *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (ProTernative[®]20, 0,5 g / dia). Os aditivos foram combinados nos seguintes tratamentos, fornecidos diariamente na ração totalmente misturada: (1) Monensina; (2) Monensina + *B. toyonensis*; (3) Monensina + *S. boulardii*; e (4) *B. toyonensis* + *S. boulardii*. Os dados de produção de gás foram ajustados nos modelos de Gompertz, Groot, Ørskov, Brody, Richards e Logístico Bicompartimentado. Nos modelos de Groot e Richards, observou-se perfeita concordância entre os valores observados e previstos nas curvas de produção de gases *in vitro* acumulada com maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,770$ e $0,771$, respectivamente), coeficiente de correlação e concordância (CCC = $0,871$ e $0,870$, respectivamente), e a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (RQMEP = $1,14$ e $1,15$, respectivamente). Avaliando os aditivos ao longo do modelo Groot, o tratamento *B. toyonensis* + *S. boulardii* apresentou maior V_F ($12,08$ ml / 100 mg de MS; $p = 0,0022$) do que Monensina e Monensina + *S. boulardii* ($9,16$ e $9,22$ ml / 100 mg de MS, respectivamente). Além disso, a taxa específica de produção de gases (k) foi maior ($p = 0,0193$) em *B. toyonensis* + *S. boulardii* do que em Monensina, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) dos outros dois tratamentos. Além disso, no tempo para iniciar a produção de gás, a fase de latência (λ), foi maior ($p < 0,001$) com Monensina e Monensina + *B. toyonensis* do que com Monensina + *S. boulardii* e *B. toyonensis* + *S. boulardii*. Os tratamentos Monensina e probióticos (*B. toyonensis* + *S. boulardii*) resultaram em melhor cinética de degradação da silagem de milho, sendo que os modelos de Groot e Richards tiveram o melhor ajuste para estimativas dos dados de produção de gás *in vitro* da silagem de milho testada com diferentes combinações de aditivos para rações.

Palavras-chave: aditivos naturais, ionóforo, modelos matemáticos, ruminantes, técnica da produção de gás

Abstract

This study aimed at examining the effects of rumen inoculum of steers receiving different combinations of ionophore and probiotics in their diets on *in vitro* gas production of corn silage. The fitting of gas production was performed with five mathematical models and its kinetics was evaluated. Four crossbred steers (403.0 ± 75.5 kg body weight) with ruminal cannula were assigned to a 4×4 Latin square design. The additives used were Monensin sodium (Rumensin[®] 100, 3 g/day), *Bacillus toyonensis* (Micro-Cell Platinum[®] 10⁹, 1 g/day) and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (ProTer-native[®]20, 0.5 g/day). Additives were arranged into the following treatments, supplied daily into total mixed diet: (1) Monensin; (2) Monensin + *B. toyonensis*; (3) Monensin + *S. boulardii*; and (4) *B. toyonensis* + *S. boulardii*. The gas production data were fitted into the models of Gompertz, Groot, Ørskov, Brody, Richards, and Dual-pool Logistic. A perfect agreement between observed and predicted values in curves of accumulated *in vitro* gas production was observed in the Groot and Richards models, with higher coefficient of determination ($R^2 = 0.770$ and 0.771 , respectively), o correlation concordance coefficient (CCC = 0.871 and 0.870 , respectively), and root mean square error of prediction (RMSEP = 1.14 and 1.15 , respectively). Evaluating the feed additives throughout the Groot model, the *B. toyonensis* + *S. boulardii* treatment presented higher V_F (12.08 mL/100 mg of DM; $p = 0.0022$) than Monensin and Monensin + *S. boulardii* (9.16 and 9.22 mL/100 mg of DM, respectively). In addition, the fractional rate of gas production (k) was higher ($p = 0.00193$) in *B. toyonensis* + *S. boulardii* than in Monensin, not presenting a statistical difference ($p > 0.05$) from the other two treatments. Additionally, with the time of beginning to gas production, the lag time (λ), was greater ($p < 0.001$) with Monensin and Monensin + *B. toyonensis* than with Monensin + *S. boulardii* and *B. toyonensis* + *S. boulardii*. The combination of Monensin and probiotics (*B. toyonensis* + *S. boulardii*) resulted in better kinetics of degradation of corn silage, being that the Groot and Richards models had the best fit for estimates of the *in vitro* gas production data of corn silage tested with different feed additive combinations.

Keywords: gas production technique, ionophore, mathematical models, natural feed additive, ruminants

Introdução

Ao longo dos anos, vários modelos matemáticos foram desenvolvidos para descrever fenômenos biológicos. Por exemplo, Brody [1] propôs um modelo para descrever o crescimento após um ponto de inflexão ou ação inibidora do crescimento, comumente relacionado ao crescimento humano após o nascimento. No entanto, para estudar o crescimento em plantas, foi necessária uma adaptação de um modelo existente usado para o crescimento animal [2], resultando no modelo de Richard [3]. Apesar de antigo, o modelo desenvolvido por Benjamin Gompertz em 1825, para estudar as leis da mortalidade e natalidade em humanos [4], foi considerado um dos modelos mais utilizados para descrever o crescimento de animais, embriões, plantas, tumores e populações de organismos [5].

A partir desses modelos propostos, foi necessário expandir e elucidar novas técnicas de análise, por meio do desenvolvimento de novos modelos específicos, como os modelos que explicam a cinética da produção de gases *in vitro* em pesquisas com ruminantes [6–8]. Esta variedade de modelos matemáticos ainda é utilizada para ajustar a produção de gás *in vitro* de rações, aditivos ou condições diversas devido a que a complexidade dos fatores biológicos se enquadra perfeitamente em um único modelo para posterior análise estatística dos tratamentos estudados. No entanto, o modelo Logístico Bicompartimentado [8] tem sido amplamente utilizado para ajustar a produção de gás *in vitro* de alimentos e dietas para ruminantes [9–13]. Porém, deve-se notar que um único modelo não deve ser usado para todos os tipos de alimentos; em vez disso, é essencial que diferentes modelos sejam ajustados para cada situação nutricional [14].

Uma linha de pesquisa comum para bovinos são os aditivos alimentares. A monensina sódica, ou apenas monensina, é um ionóforo amplamente utilizado como aditivo nutricional para melhorar a eficiência alimentar, desempenho, modulação ruminal e redução da emissão de metano [15-17]. No entanto, em 2006, a União Europeia proibiu seu uso como aditivo alimentar para bovinos, instigando os pesquisadores a testar aditivos alternativos para rações, a fim de sustentar uma alta demanda de produção animal [18].

Probióticos são aditivos nutricionais naturais, relacionados à melhoria da saúde, aumento da ingestão de alimentos e digestibilidade dos nutrientes [19-22]. *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, é membro do reino dos fungos, e tem sido relacionado ao aumento da degradabilidade ruminal *in vitro* de forragens e associado à capacidade da levedura de estimular o crescimento e a atividade das bactérias de degradação da fibra [23,24]. Além disso, a inclusão de *S. cerevisiae* em dieta rica em concentrado ou rica em fibras e diferentes processamentos do

probiótico (extrato de levedura inativada ou célula de levedura viva) apresentaram efeito das leveduras codependente da dieta, sendo mais evidente no substrato rico em fibras [25].

Bacillus toyonensis, um membro do reino bacteriano, não foi muito estudado em ruminantes, especialmente em bovinos, embora tenha sido liberado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos desde 2012 e reavaliado em 2014 [26]. Ovelhas que receberam a vacina contra o herpes vírus bovino tipo 5 e foram suplementadas com *B. toyonensis* tiveram uma melhora na resposta imune à vacina [27].

Devido aos probióticos estarem relacionados a melhorias em dietas ricas em fibras, e a silagem de milho ser considerada o alimento mais comum usado como volumoso por vacas leiteiras e gado de confinamento [23,28,29], estudamos os efeitos de diferentes combinações de ionóforo e probióticos em dietas para novilhos na cinética de produção de gases *in vitro* de silagem de milho. Este trabalho teve como objetivo avaliar a cinética da produção de gases *in vitro* e ajustar modelos matemáticos de silagem de milho, utilizando líquido ruminal de novilhos alimentados com diferentes combinações de ionóforo e probióticos.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil (20 ° 26'50 ' ' S, 54 ° 50'21 ' ' W, altitude 417 m). Neste estudo, todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal [30] do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo 1186/2021).

Animais, delineamento experimental e tratamentos

O inóculo ruminal foi obtido de quatro novilhos mestiços (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) com peso corporal médio inicial de 403 ± 75,5 kg, munidos de cânula ruminal e alojados individualmente em baias cobertas (3 m × 4,5 m) com piso de concreto, cocho de concreto e bebedouro *ad libitum*. Eles foram atribuídos a um design de quadrado latino 4 x 4, consistindo em quatro períodos de vinte e um dias e quatro tratamentos.

Uma vez ao dia às 09h 00 min, os novilhos recebiam uma ração totalmente misturada contendo 300 g/kg de silagem de milho e 700 g/kg de concentrado (Tabela 1) mais os aditivos, permitindo 10% de sobras. Os aditivos alimentares utilizados foram Monensina sódica (Rumensin® 100, Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil; 3 g / dia), *Bacillus toyonensis* (Micro-Cell Platinum® 10⁹, Lallemand Brasil; 1 g / dia) e *Saccharomyces cerevisiae boulardii*

(ProTernative®20, Lallemand Brasil; 0,5 g / dia). Os aditivos foram organizados nos seguintes tratamentos, fornecidos diariamente na ração totalmente misturada: (1) Monensina; (2) Monensina + *B. toyonensis*; (3) Monensin + *S. boulardii*; e (4) *B. toyonensis* + *S. boulardii* fornecidos na dieta mista total.

Tabela 1. Composição da dieta experimental oferecida aos novilhos sem os aditivos nutricionais.

Item	Dieta
Ingrediente (% MS da dieta)	
Silagem de milho	30
Concentrado ^a	70
Milho moído	45,500
Farelo de soja	8,517
Casca de soja	14,000
Amireia® 180S	0,817
Sal	0,233
Lithonutri®	0,849
Premix	0,042
Vitaminas ADE	0,042
Composição química da dieta (g/kg MS da dieta)	
Matéria seca	604.938
Matéria orgânica	953.388
Proteína bruta	152.441
Extrato etéreo	22.919
Fibra em detergente neutro	381.568
Fibra em detergente ácido	208.071

^aNíveis de garantia do concentrado: Umidade (máx.) 120,00g/kg; Proteína bruta (min.) 150,00g/kg; Extrato etéreo (min.) 31,00 g/kg; Fibra bruta (máx.) 110,00 g/kg; Matéria mineral (máx.) 39,00 g/kg; Calcio 5,00 a 7,00 g/kg; Fósforo (min.) 2600,00 mg/kg; NDT (nutrientes digestíveis totais; min.) 740,00 g/kg; FDN (fibra em detergente neutro) 140,00 g/kg; Cobalto (min.) 0.62 mg/kg; Cobre (min.)15,30 mg/kg; Enxofre (min.) 195,00 mg/kg; Iodo (min.) 0,80 mg/kg; Magnésio (min.) 78,40 mg/kg; Manganês (min.) 12,48 mg/kg; Selênio (min.) 0,20 mg/kg; Sódio (min.) 1230,00 mg/kg; Zinco (min.) 51,00 mg/kg; Vitamina A (min.) 3300,00 UI/kg; Vitamina D (min.) 412,50 UI/kg; Vitamina E (min.) 15,00 UI/kg.

Os novilhos foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos a cada período, de forma que todos os animais recebessem todos os tratamentos ao final do ensaio. Os tratamentos foram: (1) Monensina; (2) Monensina + *B. toyonensis*; (3) Monensina + *S. boulardii*; e (4) *B. toyonensis* + *S. boulardii*.

2.2. Análise química da silagem

Amostra da silagem de milho foi seca em estufa de ar forçado a 55 ° C por 72 h, e moída em moinho Wiley com peneira de 1 mm e armazenada em sacos plásticos. A amostra foi analisada para MS (método 930.15), Cinzas (método 942.05) e PB (método 955.04) de acordo com as metodologias da AOAC [31]; EE foi analisado com o extrator ANKOM^{XT15} (ANKOM Technology, Macedon, NY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante; enquanto FDNa e FDA foram analisados com analisador de fibra Tecnal TE-149 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) de acordo com a metodologia de Van Soest *et al.* [32] usando α -amilase termoestável. O carboidrato não fibroso (CNF) foi calculado de acordo com Sniffen *et al.* [33]: $CNF = 1000 - (PB + EE + Cinza + FDN)$

2.3. Dados de produção de gás *in vitro*

Em cada período, aproximadamente 500 ml de líquido ruminal foram obtidos dos novilhos coletados através da cânula ruminal, filtrados por camadas de gaze e colocados em garrafas térmicas individuais pré-aquecidas para manter a 39 °C. O líquido ruminal de cada animal em cada período foi utilizado como inóculo nas análises de produção de gases *in vitro*.

O Sistema de Produção de Gás ANKOM RF (ANKOM Technology, Macedon, NY, EUA) contendo 12 módulos foi usado para medir a produção de gás *in vitro*. Para cada líquido ruminal obtido dos quatro novilhos, em cada período foram preparados 2 frascos com amostras de silagem e 1 branco, apenas com tampão e inóculo. Amostra de silagem de milho foi seca a 55 ° C por 48 h e tritura em moinho Wiley com peneira de 1 mm. As amostras (500 mg) foram cuidadosamente pesadas em frasco de 250 ml e aquecidas com 100 ml de tampão de bicarbonato de fosfato [34] e, em seguida, 25 ml de líquido ruminal foram adicionados como inóculo; após o preparo, foram colocados em uma incubadora (modelo MA093 Dubnoff de banho metabólico com agitação, Marconi Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) e conectados ao sistema totalmente automático ANKOM RF Gas Production System, sendo os dados registrados a cada 5 min por 48 h. Os dados de pressão em termos de volume foram convertidos para a produção cumulativa de gás e corrigidos para brancos.

2.4. Modelos e ajuste de curvas

Os dados de gases *in vitro* foram ajustados em cinco modelos matemáticos (Tabela 2). Os modelos sigmóides de Gompertz e a equação logístico bicompartimentado são descritos por Schofield *et al.* [8]. Groot *et al.* [6] e Richards [3] descrevem as equações do modelo sigmoidal. Os modelos exponenciais Ørskov, Brody e Richards são descritos por Ørskov e McDonald [7] e Brody [1], respectivamente.

Tabela 2. Modelos não lineares considerados neste estudo para descrever a produção de gás *in vitro* da silagem de milho combinada com diferentes aditivos.

Modelos	Equação	Nº de parâmetros
Gompertz	$V(t) = V_F e^{[-be^{(-kt)}]} + \varepsilon$	3
Groot	$V(t) = V_F / (1 + (\frac{b^k}{t^k}))$	3
Ørskov	$V(t) = V_F + b(1 - e^{-kt})$	3
Brody	$V(t) = V_F(1 - be^{-kt}) + \varepsilon$	3
Richards	$V(t) = V_F(1 - be^{-kt})^m + \varepsilon$	4
Logístico	$V(t) = V_{1F} \{1 - e(-k_1(t - \lambda_1))\} + V_{2F} \{1 - e(-k_2(t - \lambda_2))\} + \varepsilon$	5
Bicompartimentado		

Onde $V(t)$ é a produção cumulativa de gás (ml / 100 mg de MS) no tempo t , V_F é o potencial máximo de produção de gás (ml / 100 mg de MS), V_{1F} é o volume final de gases derivados da degradação da fração solúvel de rápida digestão (frações A + B1 do sistema Cornell) quando $T \rightarrow \infty$, V_{2F} é o volume final de gases derivados da degradação da fração insolúvel de lenta digestão (fração B2 do sistema Cornell) quando $T \rightarrow \infty$, k representa a taxa da produção de gás (% / h), k_1 é a taxa de produção de gás específica devido à degradação da fração solúvel (% / h), k_2 é a taxa de produção de gás específica devido à degradação da fração insolúvel (% / h), t é o tempo de incubação (h), λ é o tempo de latência (h), b representa a constante de interação, m é um parâmetro de forma, e é exponencial e ε é o erro experimental associado a cada observação.

2.5. Análise Estatística

Os parâmetros dos modelos Gompertz, Groot, Ørskov, Brody e Logístico Bicompartimentado foram estimados pelo método de Gauss Newton modificado pelo procedimento NLIN do SAS (SAS University Edition, Sas Institute Inc. Cary, CA, EUA). O número máximo de interações utilizadas foi de 100 (cem). Devido à dificuldade de ajuste dos modelos de Richards pelo Gauss Newton, devido à não convergência do processo iterativo, foi utilizado o algoritmo de Levenberg–Marquardt na interação de ajuste, sendo utilizadas 300 (trezentas) interações como máximo número.

Sobre os valores previstos foram utilizados o coeficiente de determinação (R^2) e o teste F para identidade dos parâmetros ($\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$) de regressão dos dados observados; o coeficiente de correlação e concordância (CCC); a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (RQMEP); e a decomposição do quadrado médio do erro da predição (QMEP) em erro médio (EM), viés sistemático (VS) e erro aleatório (ER) foram utilizados como critérios para avaliação dos modelos. A comparação entre os modelos quanto à sua acurácia foi realizada pela análise da decomposição do quadrado médio do erro da predição (QMEP) e a precisão utilizou o delta do critério de informação de Akaike (AIC) [35].

Os cálculos estatísticos de avaliação e comparação dos modelos foram feitos por meio do programa Model Evaluation System versão 3.2.2. Uma vez escolhido o modelo que melhor descreve a curva média de produção de gases *in vitro* dos tratamentos, os parâmetros do modelo selecionado foram submetidos à análise de variância pelo procedimento PROC GLM e as médias comparadas pelo teste de Tukey no programa SAS (SAS University Edition, Sas Institute Inc., Cary, CA, EUA). Foi adotado nível de significância de 5% em todas as análises estatísticas.

Os parâmetros de produção de gás *in vitro* foram analisados na ANOVA unilateral usando o procedimento GLM (General Linear Models) do pacote estatístico SAS (SAS University Edition, Sas Institute Inc., Cary, CA, EUA) em design de quadrado latino. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a probabilidade de $\alpha = 0,05$ utilizando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

Onde: μ = média geral; A_i = efeito animal i , com i variando de 1 a 4; P_j = efeito de período j , com j variando de 1 a 4; T_k = efeito do tratamento k , com k variando de 1 a 4; e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

Resultados

A composição química da silagem de milho incubada na produção de gás *in vitro* apresentou: Matéria seca (MS) 310,27 g kg⁻¹ na matéria natural; Cinza 62,39 g kg⁻¹ na MS; Proteína bruta 97,70 g kg⁻¹ na MS; Extrato etéreo 12,56 g kg⁻¹ na MS; fibra em detergente neutro analisada com α -amilase 606,75 g kg⁻¹ na MS; fibra em detergente ácido 428,19 g kg⁻¹ em MS; carboidrato não fibroso 220,60 g kg⁻¹ na MS.

A avaliação dos modelos que se enquadram nos critérios apresentou médias próximas aos dados observados (Tabela 3), embora os desvios-padrão sejam menores quando ajustados aos modelos. Os modelos de Groot e Richards apresentaram o maior coeficiente de

determinação (R^2), indicando melhor ajuste dessas equações aos dados *in vitro*. Além disso, o coeficiente de correlação e concordância (CCC) apresentou o mesmo padrão de R^2 , com os modelos de Groot e Richards mais próximos do coeficiente ideal do que outros modelos, refletindo precisão e exatidão.

Tabela 3. Avaliação do ajuste dos modelos para estimar a produção de gás *in vitro* da silagem de milho combinada com diferentes aditivos.

Modelo	Média	EP	R^2	P-value	CCC	RQMEP	Decomposição do QMEP (%)		
							EM	VS	EA
Gompertz	7,88	2,02	0,736	0,664	0,845	1,23	0,007	0,100	99,893
Groot	7,87	2,10	0,770	0,999	0,871	1,14	0,000	0,000	100,000
Ørskov	7,87	2,08	0,751	0,999	0,858	1,19	0,000	0,000	100,000
Brody	7,87	2,08	0,751	0,999	0,858	1,19	0,000	0,000	100,000
Richards	7,87	2,10	0,771	0,998	0,870	1,15	0,000	0,000	100,000
Logístico Bicompartimentado	7,88	2,05	0,700	0,569	0,865	1,16	0,009	0,140	99,85
Dados observados	7,87	2,40	-	-	-	-	-	-	-

EP, erro padrão; R^2 , coeficiente de determinação; P-value, valor da probabilidade associada com a simultaneidade do teste F para a identidade dos parâmetros ($\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$) da regressão dos dados observados dos valores preditos; CCC, coeficiente de correlação e concordância; RQMEP, raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição; QMEP, decomposição do quadrado médio do erro da predição; EM, erro médio; VS, viés sistemático; EA, erro aleatório.

Quando observado a a raiz quadrada do quadrado médio do erro da predição (RQMEP), a medida absoluta para ajuste dos modelos, o menor valor foi apresentado pelo modelo Groot, seguido pelos modelos Richards e Logístico bicompartimentado (Tabela 3). Após a decomposição do quadrado médio do erro da predição (QMEP), foi possível inferir o erro de predição, sendo que os modelos Groot, Ørskov, Brody e Richards apresentaram cem por cento (100%) de erro aleatório (ER), enquanto os modelos Gompertz e Logístico Bicompartimentado, além da ER, também apresentaram erro médio (EM) e viés sistemático (BS).

A comparação entre os modelos, para acurácia e precisão, mostrou que os modelos de Groot e Richards não diferiram entre si e foram mais precisos ($p < 0,05$) e acurados ($p < 0,05$) que os demais modelos.

A concordância perfeita entre as curvas observadas e previstas de produção de gás acumulada *in vitro* foi observada nos modelos de Groot e Richards (Figura 1). As previsões dos modelos Brody, Gompertz e Ørskov previram uma produção de gás começando em torno de 2 ml de gás / 100 mg de MS, incompatibilizando a interceptação e a forma da curva com os dados observados (Figura 1). O modelo Logístico Bicompartimentado quase se ajusta aos dados, embora a interceptação também tenha sido superestimada e um leve ponto de inflexão previsto, mas não observado (Figura 1).

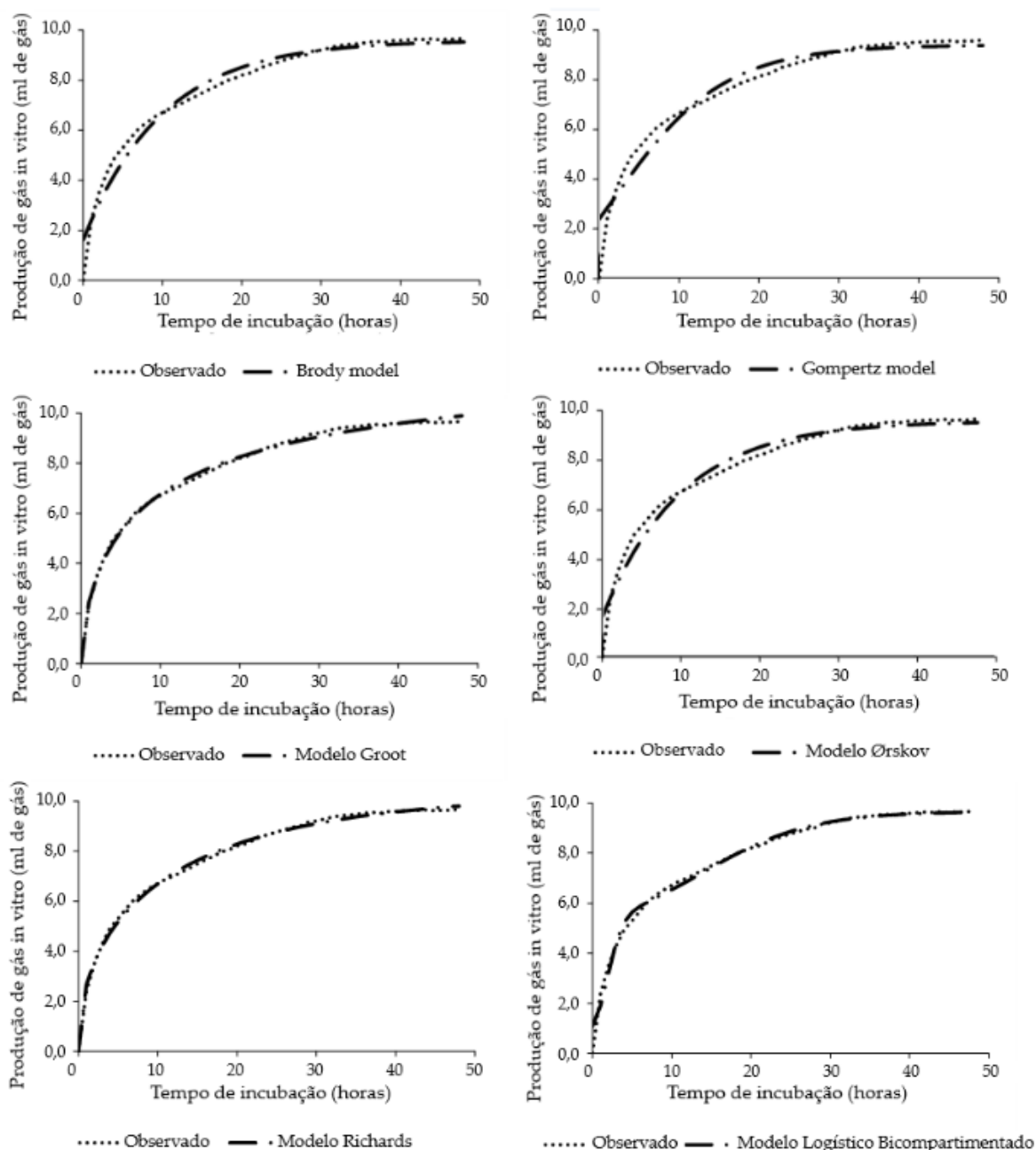


Figura 1. Curvas da produção de gás *in vitro* cumulativa da silagem de milho com combinação de probióticos e ionóforo ajustadas em diferentes modelos

Explorando os dados de produção de gás *in vitro* ao longo do modelo Groot para avaliação de aditivos alimentares, os parâmetros estimados apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, conforme apresentado na Tabela 4. O tratamento *B. toyonensis* + *S. boulardii* apresentou maior V_F (12,08 ml / 100 mg de MS; $p = 0,0022$) do que Monensin e Monensin + *S. boulardii* (9,16 e 9,22 ml / 100 mg de MS, respectivamente). Além disso, a taxa fracionária de produção de gás (k) foi maior ($p = 0,0193$) em *B. toyonensis* + *S. boulardii* do que em Monensin, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) dos outros dois tratamentos.

Além disso, o tempo entre o início da produção de gás e o tempo de latência (λ) foi maior ($p < 0,001$) com Monensin e Monensin + *B. toyonensis* do que com Monensin + *S. boulardii* e *B. toyonensis* + *S. boulardii*.

Tabela 4. Estimativa dos parâmetros da produção de gás *in vitro* da silagem de milho com diferentes combinações de aditivos obtidos pelo modelo de Groot

Parâmetros	Tratamentos				P value	EPM
	Monensina	Monensina + <i>B. toyonensis</i>	Monensina + <i>S. boulardii</i>	<i>B. toyonensis</i> + <i>S. boulardii</i>		
V_F	9,16 ^b	11,11 ^{ab}	9,22 ^b	12,08 ^a	0,0022	0,433
k	3,15 ^b	5,24 ^a	4,01 ^{ab}	4,40 ^a	0,0193	0,452
λ	1,07 ^a	1,11 ^a	0,66 ^b	0,81 ^b	<0,001	0,038

V_F , potencial máximo da produção de gás (ml/100mg de MS); k , taxa fracional da produção de gás (%/h); λ , tempo de latência (h); EPM, erro padrão da média. Médias com letras subscritas diferem pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Ao explorar os dados por meio do modelo Logístico Bicompartimentado, o mais utilizado para este tipo de avaliação (Tabela 5), todos os coeficientes de determinação ajustados por graus de liberdade, (R^2), apresentaram valores superiores a 0,95, evidenciando que os dados obtidos da produção de gás foram ajustados corretamente na equação Logístico Bicompartimentado. Ao comparar o parâmetro de produção de gás dos tratamentos, o volume de gás derivado da fração de degradação rápida (V_{IF}) e o tempo de defasagem (λ) dos microrganismos ruminais iniciando a degradação da matéria incubada apresentaram valores maiores ($p = 0,024$) em *B. toyonensis* + *S. boulardii* do que o tratamento com Monensin (Tabela 5). No entanto, a taxa de degradação dos parâmetros (k_1 e k_2) e V_{2F} não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Apesar de o potencial máximo de produção de gás (V_F) não diferir entre os tratamentos ($p = 0,76$), demonstrado na Tabela 5 e na Figura 2, numericamente o tratamento Monensin + *B. toyonensis* apresentou maior produção de gás (12,29 ml) e Monensina + *S. boulardii* teve a menor produção de gás (11,15 ml).

1490 Tabela 5. Estimativa dos parâmetros da produção de gás *in vitro* de silagem de milho com
 1491 diferentes aditivos obtidos pelo modelo logístico bicompartimentado.

Parâmetros	Tratamentos				P-value	
	Monensina	Monensina + <i>B. toyonensis</i>	Monensina + <i>S. boulardii</i>	<i>B. toyonensis</i> + <i>S. boulardii</i>		EPM
V_{IF}	3,966 ^b	4,767 ^{ab}	4,364 ^{ab}	4,829 ^a	0,024	0,114
k_1	0,513	0,506	0,535	0,482	0,921	0,026
λ	0,279 ^b	0,440 ^{ab}	0,345 ^{ab}	0,569 ^a	0,045	0,039
V_{2F}	7,559	7,519	6,782	6,860	0,758	0,329
k_2	0,040	0,038	0,034	0,034	0,731	0,002
V_F	11,525	12,286	11,146	11,689	0,762	0,378
R^2	0,958	0,980	0,972	0,981	-	-

1492 V_{IF} , volume final dos gases derivados da degradação da fração solúvel rapidamente digestível (ml/100mg de MS);
 1493 k_1 , taxa específica da produção de gás devido a degradação da fração solúvel (%/h); λ , tempo de latência (h); V_{2F} ,
 1494 volume final dos gases derivados da degradação da fração insolúvel de lenta digestão (ml/100mg de MS); k_2 , taxa
 1495 específica da produção de gás devido a degradação da fração insolúvel (%/h); V_F , potencial máximo da produção
 1496 de gás (ml/100mg de MS); R^2 , coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade; EPM, erro padrão
 1497 da média. Médias com letras subscritas diferem pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

1498

1499

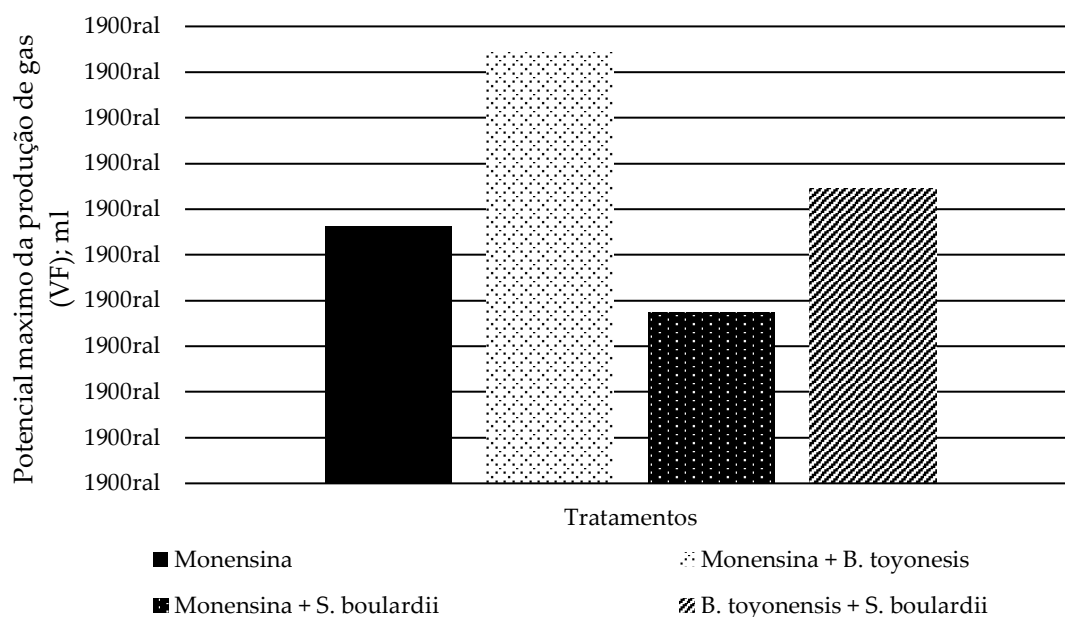


Figura 2. Potencial máximo da produção de gás *in vitro* (V_F) da silagem de milho realizada com inóculo de novilhos recebendo diferentes aditivos nutricionais estimados pelo modelo logístico bicompartimentado

Discussão

Segundo o NRCS [36], para ser classificado como volumoso o alimento deve ter proteína bruta inferior a 18%, portanto a silagem de milho é considerada volumoso. O NRC [37] traz uma classificação um pouco diferente, onde a silagem é uma classe de alimento separado das forragens e volumoso devido ao processo de ensilagem.

A composição química da silagem de milho pode ser afetada por diversos elementos, como a fertilidade do solo, as condições climáticas e a genética das sementes, que podem interferir na composição final da ração. A MS (310,27 g kg⁻¹ na MS), MO (937,61 g kg⁻¹ na MS) e EE (12,56 g kg⁻¹ na MS) obtidos neste trabalho foram inferiores aos apresentados em uma metanálise de silagem de milho cultivado no Brasil (MS 325,20 g kg⁻¹ na MS; OM 949,80 g kg⁻¹ na MS; EE 28,40 g kg⁻¹ na MS), embora a quantidade de PB (97,70 g kg⁻¹ na MS), FDN (606,75 g kg⁻¹ na MS) e FDA (428,19 g kg⁻¹ na MS) foram ligeiramente maiores do que a metanálise (PB 75,60 g kg⁻¹ na MS; FDN 548,2 g kg⁻¹ na MS; FDA 299,30 g kg⁻¹ na MS) [29]. Esse padrão também foi observado no NRC (2021) e no banco de dados de silagem de milho típico da América do Norte, onde a MS foi ligeiramente inferior, mas as cinzas, PB, FDN e FDA estavam acima dos valores médios (MS 354 g kg⁻¹ na MN; cinzas 38 g kg⁻¹ na MS; PB 77 g kg⁻¹ na MS; FDN 409 g kg⁻¹ na MS; FDA 243 g kg⁻¹ na MS).

A PB tendo valores superiores à média (NRC, 2021; Zardin *et al.*, 2017) pode ser devido ao nível de fertilização com nitrogênio aplicado na lavoura, assim como esclarecido por Nematpour *et al.* [38] quando estudando diferentes regimes de irrigação e níveis de fertilizante nitrogenado em diferentes culturas de silagem, descobriram que doses mais altas de fertilizante nitrogenado resultam em maior proteína bruta nas silagens.

Outro fator que altera a composição de uma planta é sua maturidade. A interferência da maturidade na composição química da silagem de milho pode ser o motivo da ligeira diferença da amostra analisada em relação ao descrito na literatura. Foi demonstrado que ao comparar a silagem de milho imatura com os dados de silagem de milho maduro, é possível observar que a silagem imatura apresenta alta umidade, resultando em baixa MS e maior PB, FDN, FDA e Cinza [37,39,40]. O estágio de maturação na colheita juntamente com o nível de fertilização com nitrogênio utilizado na cultura pode ser o motivo que leva a diferenças na composição química da silagem de milho utilizada neste estudo.

Em relação aos modelos matemáticos, as formas não sigmoidais assumem que as taxas de produção de gás diminuem continuamente, enquanto as formas sigmoidais trabalham primeiro com uma taxa de produção de gás aumentada, atingindo uma taxa máxima e depois diminuindo [41], e diferenças são esperadas entre suas estimativas devido de como os dados são interpretados. Devido à grande variedade de elementos submetidos a um teste de produção de gás *in vitro*, e às condições feitas nos testes, sua cinética e produção de gás não são iguais. Mjoun [42] avaliou o ajuste de vários alimentos para ruminantes usando oito modelos (Exponencial, Logístico, Logístico Bicompartimentado, France, Gompertz, Gompertz Bicompartimentado, Groot, e McDonalds-Ørskov) e obteve o melhor ajuste de milho silagem com o modelo Logístico Bicompartimentado. Em comparação com Mjoun [42], os modelos escolhidos para serem avaliados neste estudo incluíram apenas o Logístico Bicompartimentado e o Gompertz, que não foram os que melhor se ajustaram aos nossos dados. Os critérios avaliados pelo modelo Logístico Bicompartimentado foram bons ($R^2 = 0,700$; CCC = 0,865; RQMEP = 1,16), mas o modelo de Groot e Richards foram melhores ($R^2 = 0,770$ e $0,771$, CCC = 0,871 e 0,870, RQMEP = 1,14 e 1,15, respectivamente). Mello *et al.* [43] também encontraram um melhor ajuste da produção de gás *in vitro* de silagem de milho com o modelo Logístico Bicompartimentado após a comparação com os modelos de Brody, Von Bertalanffy, Gompertz, France, Logístico e Logístico Modificado.

Porém, apesar do bom ajuste, o modelo de Richards apresentou problemas de convergência no processo iterativo, exigindo o uso do algoritmo de Marquardt e um aumento no número de iterações, possivelmente porque este modelo necessita estimar um parâmetro

adicional. De acordo com Gurgel *et al.* [14], alguns pesquisadores também relataram dificuldades de convergência usando o modelo de Richards. Além disso, um modelo com três parâmetros, como é o caso do modelo Groot, apresentará mais graus de liberdade nas estimativas, o que pode ser importante quando uma curva apresenta menor quantidade de informações ou dados [14]. Também é importante que todos os parâmetros tenham significado biológico. Nesse sentido, os modelos Groot e Logístico Bicompartimentado apresentam vantagens sobre as demais funções por não assumirem uma taxa fracionária de fermentação constante [6].

Assim como demonstrado por Mjoun [42], cada tipo de alimento possuía uma cinética de produção de gás, combinando com diferentes modelos, sendo possível que a Monensina e os dois probióticos (*S. boulardii* e *B. toyonensis*) diluídos no líquido ruminal utilizado como o inóculo neste estudo pode ter interferido na cinética e na produção de gás da silagem de milho. Essa interferência por aditivos alimentares na produção de gás *in vitro* foi observada por Elghandour *et al.* [44] avaliando três culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, quando a adição de duas das culturas foi responsável por um aumento no parâmetro de V_F (controle = 359,5 ml g⁻¹ na MS vs. *S. cerevisiae* = 409,6 e 428,8 ml g⁻¹ na MS).

Na comparação da produção de gás *in vitro*, é necessária grande atenção aos detalhes, devido à diversidade natural da silagem de milho, fluido ruminal e à interferência dos tratamentos submetidos ao teste *in vitro*. Macome *et al.* [45] avaliaram a influência da maturidade da silagem de milho na produção de gás com o inóculo de vacas Holandesas adaptadas a uma relação volumoso: concentrado de 80:20 e encontraram uma MS de silagem de milho = 318 g kg⁻¹ na MN e V_F = 101,38 ml g⁻¹ na MS estimado pelo modelo Groot [6], com a colheita de milho com 32% de MS, semelhante aos achados deste estudo, onde MS = 310,27 g kg⁻¹ na MS e V_F estimado por Groot o modelo foi de 91,6 a 120,8 ml g⁻¹ na MS. No entanto, Zhang *et al.* [46], usando inóculo de vacas leiteiras recebendo uma proporção da dieta em torno de 55:45 de volumoso: concentrado, obteve um alto V_F (V_F = 137,6 ml g⁻¹ de MS), estimado pelo modelo de France [47], quando em comparação com nosso estudo.

Faria *et al.* [48], usando silagem de milho tratada ou não com Monensina sódica antes da ensilagem, observou que Monensina reduziu a produção de gás acumulada em 48 h de incubação de 56,59 ml g⁻¹ de MS (apenas silagem de milho) para 52,99 ml g⁻¹ de MS (silagem de milho com Monensin). Além disso, a V_F de 96 h de incubação estimada pelo modelo da France passou de 62,72 ml g⁻¹ de MS (apenas silagem de milho) para 56,58 ml g⁻¹ de MS (silagem de milho com Monensin). Isso também foi apoiado por Shen *et al.* [49], que encontraram uma menor produção de gás com a adição de Monensin (181,9 vs. 131,0 ml de

gás, controle vs. Monensina) em uma mistura de ração total com uma proporção de 50:50 (volumoso: concentrado) usada como substrato na produção *in vitro*. Este efeito do Monensin foi semelhante aos dados obtidos neste estudo ajustados pelo modelo de Groot. Os tratamentos com monensina apresentaram menor V_F do que o tratamento apenas com probióticos (*B. toyonensis* + *S. boulardii*), mas quando ajustados ao modelo Logístico Bicompartimentado, nenhuma diferença significativa foi observada no parâmetro V_F ($p = 0,762$). Este resultado destaca explicitamente a necessidade de usar modelos que se ajustem tão perfeitamente quanto possível aos dados de produção de gás *in vitro*, caso contrário, as diferenças de tratamento podem estar ausentes.

O fornecimento de probióticos e monensina via dieta e subsequente amostragem do líquido ruminal para uso como inóculo no teste *in vitro* resultou com sucesso em diferenças na produção de gás de uma ração rica em fibras, a silagem de milho. Após a submissão dos dados de produção de gás aos modelos, *B. toyonensis* + *S. boulardii* apresentou maior V_F do que o tratamento com Monensin pelo modelo Groot, e maior V_{F1} pelo modelo Logístico Bicompartimentado. A adição de *S. cerevisiae* em alimentos ricos em fibras (palha de milho, palha de aveia, bagaço de cana e palha de sorgo) também foram responsáveis por uma alta V_F em comparação com o controle (0 mg de *S. cerevisiae*) [23]. Corroborando esses resultados, um aumento da V_F pela adição de células vivas de levedura *S. cerevisiae* ou extrato de células também foi observado por Rodriguez *et al.* [50], quando comparado ao tratamento controle (0 mg de *S. cerevisiae*) usando uma ração total misturada (50:50, relação volumoso: concentrado).

Devido ao pequeno número de estudos com *Bacillus toyonensis*, principalmente com o uso como aditivo em rações para bovinos, a comparação dos resultados é difícil. No entanto, em relação ao efeito do *B. toyonensis* observado neste estudo ao comparar os tratamentos Monensin + *B. toyonensis* vs. Monensin + *S. boulardii*, a diferença entre eles só foi observada em λ estimado pelo modelo de Groot, com um maior tempo latência de Monensin + *B. toyonensis* (1,11 h) do que Monensin + *S. boulardii* (0,66 h).

Pode-se inferir que a avaliação *in vitro* de rações para ruminantes é extremamente importante para a nutrição animal, uma vez que a ração influencia diretamente no desempenho produtivo dos animais, e isso terá impacto direto no desempenho econômico da atividade pecuária. Assim, neste estudo, o ajuste dos melhores modelos para a avaliação de silagem (modelos Groot e Logístico Bicompartimentado) significa que houve um entendimento de como a cinética da degradação *in vitro* ocorre. Esse conhecimento elucida os mecanismos pelos quais os ruminantes transformam esse volumoso em produto de origem animal. Além disso, foi feita uma comparação de aditivos para novilhos, e o estudo mostrou que a combinação de

Monensin com probióticos é a melhor forma de incluir esses aditivos para obter melhores resultados no uso de forrageiras incluídas na dieta de novilhos confinados.

Conclusão

A combinação de Monensina e probióticos (*B. toyonensis* + *S. boulardii*) pode melhorar a cinética de degradação da silagem de milho, sendo que os modelos de Groot e Richards tiveram o melhor ajuste para os dados de produção de gás *in vitro* da silagem de milho testada com diferentes combinações de aditivos.

Pesquisas adicionais usando concentrados com a combinação de Monensin e probióticos fornecerão uma visão melhor sobre a cinética de degradação na nutrição de ruminantes. Além disso, a validação em animais *in vivo* será interessante para validar esses resultados. A compreensão dessas relações pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias nutricionais com base nas modificações da proporção concentrado: volumoso na dieta de ruminantes. Futuras indicações para melhorar a pesquisa são incluir diferentes alimentos e dietas na avaliação da cinética de degradação *in vitro* usando Monensin e combinações de probióticos para gado de corte e leite.

Contribuições dos autores: C.d.S.Z. realizou o experimento, análise laboratorial, coleta de amostras e redação do manuscrito. L.C.V.Í. e C.C.B.F.Í. concebeu e elaborou a pesquisa, e redigiu o manuscrito. A.L.C.G. e G.d.S.D. conduziu análises estatísticas. G.T.d.S. e A.M.D. concebeu e elaborou a pesquisa; todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: Não aplicável.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses

Referências

1. Brody, S. *Bioenergetics and Growth; with Special Reference to the Efficiency Complex in Domestic Animals*; Reinhold: Oxford, UK, 1945.
2. Von Bertalanffy, L. Quantitative Laws in Metabolism and Growth. *Q. Rev. Biol.* **1957**, *32*, 217–231. <https://doi.org/10.1086/401873>.
3. Richards, F.J. A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* **1959**, *10*, 290–301. <https://doi.org/10.1093/jxb/10.2.290>.
4. Laird, A.K. Dynamics of relative growth. *Growth* **1965**, *29*, 249–263.
5. Savageau, M.A. Growth equations: A general equation and a survey of special cases. *Math. Biosci.* **1980**, *48*, 267–278. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(80\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0025-5564(80)90061-9).
6. Groot, J.C.J.; Cone, J.W.; Williams, B.A.; Debersaques, F.M.A.; Lantinga, E.A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1996**, *64*, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7).
7. Orskov, E.R.; McDonald, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* **1979**, *92*, 499–503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>.
8. Schofield, P.; Pitt, R.E.; Pell, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* **1994**, *72*, 2980–2991. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>.
9. Olivo, P.M.; Santos, G.T.; Ítavo, L.C.V.; Silva Junior, R.C.; Leal, E.S.; Prado, R.M. Assessing the nutritional value of agroindustrial co-products and feed through chemical composition, in vitro digestibility, and gas production technique. *Acta Sci. Anim. Sci.* **2017**, *39*, 289–295. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i3.34024>.
10. Diaz, T.G.; Branco, A.F.; Ítavo, L.C.V.; Santos, G.T.; Carvalho, S.T.; Teodoro, A.L.; Oliveira, R.L. In vitro gas production kinetics and digestibility in ruminant diets with diferente levels of cashew nutshell liquid. *Semin. Cienc. Agrar.* **2018**, *39*, 1669–1682. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n4p1669>.
11. Souza, A.D.V.; Ítavo, L.C.V.; Favaro, S.P.; Ítavo, C.C.B.F.; Petit, H.V.; Dias, A.M.; Morais, M.G.; Reis, F.A.; Roscoe, R. Thermal decomposition, chemical composition, in vitro digestibility and gas production and in situ degradability of oilseed residues from the biofuel industry. *Anim. Sci. J.* **2018**, *89*, 79–87. <https://doi.org/10.1111/asj.12889>.
12. Leal, E.S.; Ítavo, L.C.V.; Valle, C.B.; Ítavo, C.C.B.F.; Dias, A.M.; Difante, G.S.; Barbosa-Ferreira, M.; Nonato, L.M.; Melo, G.K.A.; Gurgel, A.L.C. AInfluence of protodioscin

- content on digestibility and in vitro degradation kinetics in *Urochloa brizantha* cultivars. *Crop Pasture Sci.* **2020**, *71*, 278–284. <https://doi.org/10.1071/CP18357>.
13. Santana, J.C.S.; Morais, J.A.S.; Difante, G.S.; Ítavo, L.C.V.; Gurgel, A.L.C.; Oliveira, V.S.; Rodrigues, M.J.S.T. In vitro digestion characteristics of various combinations of elephant grass hay, Gliricidia hay or silage, soybean meal and corn meal in rations for sheep. *Trop. Grassl.* **2020**, *8*, 147–152. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(8\)147-152](https://doi.org/10.17138/TGFT(8)147-152).
14. Gurgel, A.L.C.; Morais, J.A.S.; Santana, J.C.S.; Difante, G.S.; Emerenciano Neto, J.V.; Ítavo, L.C.V.; Ítavo, C.C.B.F.; Oliveira, V.S.; Rodrigues, M.J.S.T. Mathematical models to adjust the parameters of in vitro cumulative gas production of diets containing preserved Gliricidia. *Ciência Rural* **2021**, *51*, e20200993. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200993>.
15. Weiss, C.P.; Beck, P.A.; Gadberry, M.S.; Richeson, J.T.; Wilson, B.K.; Robinson, C.A.; Zhao, J.; Hess, T.; Hubbell, D. Effects of intake of monensin during the stocker phase and subsequent finishing phase on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. *Appl. Anim. Sci.* **2020**, *36*, 668–676. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02031>.
16. Tseu, R.J.; Perna Junior, F.; Carvalho, R.F.; Sene, G.A.; Tropaldi, C.B.; Peres, A.H.; Rodrigues, P.H.M. Effect of tannins and monensin on feeding behaviour, feed intake, digestive parameters and microbial efficiency of nellore cows. *Ital. J. Anim. Sci.* **2020**, *19*, 262–273. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1729667>.
17. Thompson, L.R.; Beck, M.R.; Gunter, S.A.; Williams, G.D.; Place, S.E.; Reuter, R.R. An energy and monensin supplement reduces methane emission intensity of stocker cattle grazing winter wheat. *Appl. Anim. Sci.* **2019**, *35*, 433–440. <https://doi.org/10.15232/aas.2018-01841>.
18. İnal, F.; Gürbüz, E.; Coşkun, B.; Alataş, M.S.; Çitil, Ö.B.; Polat, E.S.; Şeker, E.; Özcan, C. The Effects of Live Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on Rumen Fermentation and Nutrient Degradability in Yearling Lambs. *Kafkas Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* **2010**, *16*, 799–804. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.1672>.
19. Uyeno, Y.; Shigemori, S.; Shimosato, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes Environ.* **2015**, *30*, 126–132. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14176>.
20. Young, T.R.; Ribeiro, F.R.B.; Sanchez, N.C.B.; Carroll, J.A.; Jennings, M.A.; Cribbs, J.T.; Rathmann, R.J.; Corley, J.R.; Johnson, B.J. Yeast cell wall supplementation alters the performance and health of beef heifers during the receiving period. *Prof. Anim. Sci.* **2017**, *33*, 166–175. <https://doi.org/10.15232/pas.2016-01511>.

21. Diaz, T.G.; Branco, A.F.; Jacovaci, F.A.; Jobim, C.C.; Bolson, D.C.; Daniel, J.L.P. Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharides in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193313>.
22. Diaz, T.G.; Branco, A.F.; Jacovaci, F.A.; Jobim, C.C.; Daniel, J.L.P.; Bueno, A.V.I.; Ribeiro, M.G. Use of live yeast and mannan-oligosaccharides in grain-based diets for cattle: Ruminal parameters, nutrient digestibility, and inflammatory response. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207127>.
23. Elghandour, M.M.Y.; Chagoyán, J.C.V.; Salem, A.Z.M.; Kholif, A.E.; Castañeda, J.S.M.; Camacho, L.M.; Cerrillo-Soto, M.A. Effects of *saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds. *Ital. J. Anim. Sci.* **2014**, *13*, 295–301. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3075>.
24. Wambui, C.; Abdulrazak, S. Effect of yeast supplementation on in vitro ruminal degradability of selected browse species from Kenya. *J. Food Agric. Environ.* **2010**, *8*, 553–557.
25. Opsi, F.; Fortina, R.; Tassone, S.; Bodas, R.; López, S. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro ruminal fermentation of diets with different forage: Concentrate ratio. *J. Agric. Sci.* **2012**, *150*, 271–283. <https://doi.org/10.1017/S0021859611000578>.
26. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fat. *EFSA J.* **2014**, *12*, 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3766>.
27. Roos, T.B.; de Moraes, C.M.; Sturbelle, R.T.; Dummer, L.A.; Fischer, G.; Leite, F.P.L. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *117*, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.022>.
28. Zardin, P.B.; Velho, J.P.; Jobim, C.C.; Alessio, D.R.M.; Haygert-Velho, I.M.P.; da Conceição, G.M.; Almeida, P.S.G. Chemical composition of corn silage produced by scientific studies in Brazil—A meta-analysis. *Semin. Ciências Agrárias* **2017**, *38*, 503–511. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n1p503>.
29. Hristov, A.N.; Oh, J.; Firkins, J.L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Makkar, H.P.S.; Adesogan, A.T.; Yang, W.; Lee, C.; et al. Special Topics—Mitigation of methane and

- nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options 1. *J. Anim. Sci.* **2013**, 91, 5045–5069. <https://doi.org/10.2527/jas2013-6583>.
30. Silva, A.C.; Diaz, B.L.; Rivera, E.A.B.; Granjeiro, J.M.; Braga, L.M.G.M.; Frajblat, M.; Stephano, M.A. *Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa: Fascículo 1: Introdução Geral*; Ministérios da Ciência, Tecnologia e Inovação, Ed.; Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Brasilia, Brazil, 2016; ISBN 9788588063310.
31. AOAC Official Methods of Analysis of AOAC International. *Official Methods of Analysis of Aoac*; AOAC International: Rockville, MD, USA, 2005; ISBN 0935584544.
32. Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci* **1991**, 10, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
33. Sniffen, C.J.; O'Connor, J.D.; Van Soest, P.J.; Fox, D.G.; Russell, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* **1992**, 70, 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>.
34. Marten, G.C.; Barnes, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. *Stand. Anal. Methodol. Feed.* **1979**, 4, 61–71.
35. Tedeschi, L.O. Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agric. Syst.* **2006**, 89, 225–247. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2005.11.004>.
36. NRCS. *Animal Diets and Feed Management*; United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service: Washington, DC, USA, 2012; pp. 1–14.
37. National Research Council. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2001; ISBN 978-0-309-06997-7.
38. Nematpour, A.; Eshghizadeh, H.R.; Zahedi, M. Comparing the Corn, Millet and Sorghum as Silage Crops Under Different Irrigation Regime and Nitrogen Fertilizer Levels. *Int. J. Plant Prod.* **2021**, 15, 351–361. <https://doi.org/10.1007/s42106-021-00142-8>.
39. Bryant, H.T.; Blaser, R.E.; Hammes, R.C.; Huber, J.T. Evaluation of Corn Silage Harvested at Two Stages of Maturity 1. *Agron. J.* **1966**, 58, 253–255. <https://doi.org/10.2134/agronj1966.00021962005800030003x>.
40. Colenbrander, V.F.; Martin, G. Relationships Between Stage of Maturity of the Corn Plant at Time of Harvest for Corn Silage and Chemical Composition^{1,2}. *J. Dairy Sci.* **1965**, 54, 533–536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)85881-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85881-2).

41. Wang, M.; Tang, S.X.; Tan, Z.L. Modeling in vitro gas production kinetics: Derivation of Logistic-Exponential (LE) equations and comparison of models. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2011**, *165*, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.016>.
42. Mjoun, K. 72 Evaluation of Different Gas Production Models When Applied to Ruminants Feeds. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 37–38. <https://doi.org/10.1093/jas/sky073.070>.
43. Mello, R.; Magalhães, A.L.R.; Breda, F.C.; Regazzi, A.J. Modelos para ajuste da produção de gases em silagens de girassol e milho. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2008**, *43*, 261–269. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000200016>.
44. Elghandour, M.M.Y.; Vázquez, J.C.; Salem, A.Z.M.; Kholif, A.E.; Cipriano, M.M.; Camacho, L.M.; Márquez, O. In vitro gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Anim. Res.* **2017**, *45*, 389–395. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1204304>.
45. Macome, F.M.; Pellikaan, W.F.; Hendriks, W.H.; Dijkstra, J.; Hatew, B.; Schonewille, J.T.; Cone, J.W. In vitro gas and methane production of silages from whole-plant corn harvested at 4 different stages of maturity and a comparison with in vivo methane production. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 8895–8905. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12953>.
46. Zhang, Q.; Zhao, M.; Wang, X.; Yu, Z.; Na, R. Ensiling alfalfa with whole crop corn improves the silage quality and in vitro digestibility of the silage mixtures. *Grassl. Sci.* **2017**, *63*, 211–217. <https://doi.org/10.1111/grs.12168>.
47. France, J.; Dijkstra, J.; Dhanoa, M.S.; Lopez, S.; Bannink, A. 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. *Br. J. Nutr.* **2000**, *83*, 143–150. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000180>.
48. Faria, B.N.; Reis, R.B.; Maurício, R.M.; Lana, A.M.Q.; Soares, S.R.V.; Saturnino, H.M.; Coelho, S.G. Efeitos da adição de propilenoglicol ou monensina à silagem de milho sobre a cinética de degradação dos carboidratos e produção cumulativa de gases in vitro. *Arq. Bras. De Med. Veterinária E Zootec.* **2008**, *60*, 896–903. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000400019>.
49. Shen, J.; Liu, Z.; Yu, Z.; Zhu, W. Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently in vitro. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1111. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01111>.
50. Rodriguez, M.P.; Mariezcurrena, M.D.; Mariezcurrena, M.A.; Lagunas, B.C.; Elghandour, M.M.M.Y.; Kholif, A.M.; Kholif, A.E.; Almaraz, E.M.; Salem, A.Z.M. Influence of live

1821 cells or cells extract of *saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed
1822 ration. *Ital. J. Anim. Sci.* 2015, 14, 590–595. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3713>.
1823

ARTIGO 2

Associação de probióticos com a monensina sódica sobre a ingestão, digestibilidade aparente, variáveis ruminais e urinárias, bioquímica sanguínea e balanço de nitrogênio em novilhos de corte

Association of probiotics with sodium monensin under feed intake, apparent digestibility, ruminal and urine variables, blood biochemic and nitrogen balance at beef cattle

C. da S. Zornitta ^a, L. C. V. Ítavo ^a, C. C. B. F. Ítavo ^a, A. M. Dias ^a, G. L. Franco ^a, A. P. da Silva ^a

^a*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Av. Senador Filinto Müller nº 2443, 79074-460, Campo Grande, MS), Brasil*

Autor correspondente: Luis Ítavo. E-mail: luis.itavo@ufms.br

Redigido conforme normas da revista Animal com exceção do idioma

Resumo

A fim de melhorar a produção animal, diferentes aditivos nutricionais têm sido estudados para esta finalidade. Ao suplementar bovinos com probióticos, benefícios têm sido observados na saúde dos animais, digestibilidade dos alimentos, e modulação do pH ruminal. O objetivo com este estudo foi avaliar a associação dos aditivos *Bacillus toyonensis*, *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii* e monensina sódica no consumo de alimento, digestibilidade aparente, variáveis ruminais e sanguíneas na dieta de novilhos. Foram utilizados quatro novilhos mestiços *Bos taurus* × *B. indicus*, com peso inicial de $403,0 \pm 75,5$ kg, canulados no rúmen e alojados individualmente. Os animais foram submetidos a um delineamento em quadrado latino 4 x 4, recebendo uma ração totalmente misturada contendo 300 g / kg de silagem de milho e 700 g / kg de concentrado na base da matéria seca, com os seguintes tratamentos misturados em sua alimentação diária: 300 mg de monensina sódica (**MO**); 300 mg de monensina sódica + $1,0 \times 10^9$ ufc de *Bacillus toyonensis* (**MBT**); 300 mg de monensina sódica + $1,0 \times 10^{10}$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (**MSB**); e $1,0 \times 10^9$ ufc de *Bacillus toyonensis* + $1,0 \times 10^{10}$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (**BTSB**). A ingestão de nutrientes dos tratamentos com monensina sódica foi reduzida ($P < 0,05$), contudo digestibilidade aparente não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Avaliando as variáveis ruminais, não foi observada diferença entre os tratamentos para o pH ruminal e nem para ácidos graxos voláteis (AGV) totais. Todos os tratamentos com monensina tiveram maior proporção de propionato do que apenas com probióticos (BTSB), resultando também em menor relação acetato:propionato. Nas variáveis sanguíneas e urinárias, as concentrações das variáveis se encontraram dentro da faixa fisiológica ou próximas do normal, e nenhuma diferença foi observada no balanço de nitrogênio. Em conclusão, a associação de *B. toyonensis* com *S. cerevisiae* *boulardii* apresentou um potencial para aditivo alimentar para bovinos, ao controlar o pH ruminal e concentrações semelhantes de $\text{NH}_3\text{-N}$, AGV total e balanço de nitrogênio que o tratamento apenas com monensina. quando combinados à monensina sódica, os probióticos estudados não tiveram efeito benéfico observado neste estudo.

Palavras-chave: bovinos de corte, ensaio metabólico, levedura viva, ácidos graxos voláteis

Abstract

In order to improve animal production, different nutritional additives have been studied for this purpose. By supplementing cattle with probiotics, benefits have been observed in animal health, feed digestibility, and ruminal pH modulations. The aim of this study was to evaluate the association of the additives *Bacillus toyonensis*, *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, and sodium monensin in feed intake, apparent digestibility, ruminal and blood variables in the diet of steers. Were used four crossbred *Bos taurus* × *B. indicus* steers, with an initial weight of 403.0 ± 75.5 kg, cannulated in the rumen and housed individually. The animals were submitted to a 4 x 4 Latin square design, receiving a fully mixed ration containing 300 g/kg of corn silage and 700 g/kg of concentrate on a dry matter basis, with the following treatments mixed in their daily feed: 300 mg monensin sodium (**MO**); 300 mg monensin sodium + 1.0×10^9 ufc *Bacillus toyonensis* (**MBT**); 300 mg monensin sodium + 1.0×10^{10} ufc of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (**MSB**); and 1.0×10^9 ufc of *Bacillus toyonensis* + 1.0×10^{10} ufc of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (**BTSB**). The nutrient intake of the treatments with sodium monensin was reduced ($P < 0.05$), however, apparent digestibility did not show any difference ($P > 0.05$) between treatments. Evaluating the rumen variables, no difference was observed between treatments for ruminal pH or for total volatile fatty acids (VFA). All monensin treatments had a higher proportion of propionate than probiotics alone (BTSB), also resulting in a lower acetate:propionate ratio. In the blood and urinary variables, the concentrations of the variables were found within the physiological range or close to normal, and no difference was observed in the nitrogen balance. In conclusion, the association of *B. toyonensis* with *S. cerevisiae boulardii* showed potential as a feed additive for cattle, by controlling rumen pH and similar concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$, total VFA, and nitrogen balance than treatment with monensin alone. when combined with monensin sodium, the studied probiotics had no beneficial effect observed in this study.

Keywords: beef cattle, finishing diet, metabolic assay, live yeast, volatile fatty acids

Implicações

Nossos resultados sugerem uma possível substituição de ionóforos como aditivos alimentares em bovinos em um futuro muito próximo, devido ao efeito promissor de *Bacillus toyonensis* combinado com *Saccharomyces cerevisiae boulardii* na modulação ruminal,

digestibilidade de alimentos e nenhum sinal de desequilíbrio fisiológico foi observado por meio das análises das amostras de soro e urina. A associação de monensina sódica com os probióticos estudados não são aconselhadas devido à falta de benefícios observados neste estudo.

Introdução

Os aditivos alimentares são utilizados como estratégia tanto para evitar distúrbios metabólicos como para melhorar a eficiência alimentar e a produtividade animal (Perna Junior *et al.*, 2020; Weiss *et al.*, 2020). Uma classe de aditivos muito utilizadas mundialmente são os ionóforos, contudo, desde 2006 o uso de ionóforos, assim como os demais antibióticos promotores de crescimento têm sido proibidos na União Europeia (Ínal *et al.*, 2010). Esta proibição foi necessária devido ao uso desenfreado de antibióticos nos países que fazem parte da União europeia e ao aumento de casos hospitalares de pessoas apresentando resistência bacteriana (Chattopadhyay, 2014).

Em trabalhos avaliando esta problemática, Russel e Houlihan (2003) notaram que os ionóforos utilizados na alimentação dos bovinos são pouquíssimos prováveis em transferir a resistência bactéria aos humanos. Também, Neumann *et al.* (2018) ao avaliarem resíduos de monensina sódica, um dos ionóforos mais utilizados na bovinocultura, em tecidos e órgãos de bovinos pós abate, observaram que os tecidos e órgãos não continham resíduos do ionóforo ao qual foi administrado aos animais via dieta.

Atualmente, na União europeia é permitido o uso de um produto á base de monensina em vacas de leite, como forma de prevenir a cetose nestes animais (EMEA, 2013). Nos demais países produtores de carne bovina, o uso dos ionóforos como promotores de crescimento estão mantidos, contudo há uma tendencia mundial para a redução de antibióticos na nutrição animal, também maior controle na utilização e constantes revisões de produtos autorizados (Danieli e Schogor, 2020).

Levando isso em consideração, uma classe de aditivo muito utilizadas em humanos tem sido estudada nos animais de criação, os probióticos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* é amplamente utilizado em processos fermentativos de fabricação de cerveja e panificação (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2020). Quando testado em ruminantes, foi observado que *S. cerevisiae boulardii* afeta positivamente a saúde animal, aumentando a resposta do sistema imunológico inato às bactérias virais em novilhas de corte, e uma menor redução de alguns microrganismos ruminais de vacas leiteiras sob acidose ruminal subaguda, levando a uma estabilização no pH ruminal (Ishaq *et al.*, 2017; Kayser *et al.*, 2019).

Já o *Bacillus toyonensis* é uma bactéria, por outro lado, não teve tantos estudos explorando seus benefícios como aditivo probiótico em bovinos, mas foi relacionado a uma melhora na resposta imunológica a vacinas de ovelhas suplementadas com *B. toyonensis* (Roos *et al.*, 2010).

Tendo em mente os benefícios dos probióticos, é possível que a associação entre probióticos e ionóforo possa ocasionar na melhoria de algumas variáveis relacionadas a fermentação ruminal e digestibilidade da dieta. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *Bacillus toyonensis*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, e monensina sódica combinados como aditivos alimentares sobre a ingestão de nutrientes, digestibilidade aparente, variáveis ruminais, sanguíneas e urinárias, e balanço de nitrogênio de novilhos.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Terenos, MS, Brasil (coordenadas geográficas 20°26'50" S e 54°50'21" W, altitude 417 m). O estudo foi conduzido de setembro a dezembro de 2019, a temperatura variou entre 39,8 °C e 14,7 °C, com mediana de 26,1 °C, e a umidade relativa do ar foi de 56%.

Animais, delineamento experimental e tratamentos

As unidades experimentais foram quatro novilhos mestiços *Bos indicus* x *Bos taurus* com peso corporal médio de $403 \pm 75,5$ kg (média $\pm$ DP) com cânula ruminal, distribuídos em um delineamento em quadrado latino 4 x 4, consistindo em quatro períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e 7 dias de coleta. Os novilhos foram alocados individualmente em baias cobertas com piso de concreto (3 m x 4,5 m), cocho de concreto e bebedouro. Antes do ensaio experimental, os novilhos tiveram 15 dias de adaptação ao local, tratadores e dieta. A adaptação da dieta foi iniciada sem concentrado, apenas com silagem de milho, e a cada 3 dias o concentrado foi aumentado gradativamente até atingir 700 g / kg de dieta na base da matéria seca (MS).

Os animais receberam uma dieta contendo 300 g / kg de silagem de milho e 700 g / kg de concentrado (Tabela 1). Os aditivos utilizados foram: monensina sódica (Rumensin® 100, Eli Lilly, São Paulo, SP, Brasil; 3g / dia; fornecendo 300 mg de monensina sódica), *Bacillus toyonensis* (Micro-Cell Platinum 10⁹, Lallemand Brasil; 1g / dia; fornecendo 1,0 x 10⁹ UFC de *Bacillus toyonensis* BCT-7112) e *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (ProTernative®,

1967 Lallemand Brasil; 0,5g / dia; fornecendo $1,0 \times 10^{10}$ UFC de *Saccharomyces cerevisiae* var.
 1968 *boulardii* CNCM I-1079). Em todos os períodos, os novilhos foram distribuídos aleatoriamente
 1969 nos tratamentos, sendo eles: Monensina somente (**MO**); Monensina + *B. toyonensis* (**MBT**);
 1970 Monensina + *S. cerevisiae boulardii* (**MSB**); e *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii* (**BTSB**).
 1971 Os tratamentos eram pesados e colocados em tubos de plásticos identificados, para serem
 1972 adicionados à dieta posteriormente.

1973 Os tratamentos alocados nos tubos de plásticos, eram misturados primeiramente no
 1974 concentrado dos animais, de maneira manual, e posteriormente homogeneizados com a silagem,
 1975 esta ração totalmente misturada era oferecida aos animais uma vez ao dia, às 09h00, permitindo
 1976 10% de sobras.

1977 ***Ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente***

1978 Foi realizado diariamente durante todo o ensaio experimental o controle do consumo
 1979 ração e sobras. Do 14º ao 20º dia, de cada período, foram coletadas amostras de sobras e ração
 1980 (silagem e concentrado com aditivo), que foram armazenadas em sacos plásticos a -20 °C até
 1981 as análises laboratoriais. As amostras de fezes totais foram coletadas por 48 horas consecutivas,
 1982 do 19º ao 20º dia de cada período, após a defecação dos animais foram imediatamente pesadas
 1983 e uma alíquota de 10% coletada e armazenada em sacos plásticos identificados a -20 °C. Todos
 1984 os sacos de fezes de cada animal, em cada período, foram considerados uma única amostra.

1985 Amostras das rações (silagem de milho e concentrado), sobras e fezes de cada novilho
 1986 em cada período foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72h, a seguir moídas
 1987 em moinho tipo Wiley com peneira de 1mm de crivo. Essas amostras foram analisadas de
 1988 acordo com os métodos AOAC (2005) para: Matéria seca (MS; método 930.15), cinzas (método
 1989 942.05) e proteína bruta (PB; método 955.04). O extrato etéreo (EE) foi analisado no extrator
 1990 ANKOM^{XT15} (ANKOM Technology, Macedon, NY, EUA) de acordo com as instruções do
 1991 fabricante. Já a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram
 1992 analisadas no analisador de fibras Tecnal TE-149 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) de acordo
 1993 com a metodologia de Van Soest *et al.* (1991) usando α -amilase termoestável. Os carboidratos
 1994 não fibrosos (NFC) foram calculados de acordo com Sniffen *et al.* (1992) pela equação $CNF =$
 1995 $1000 - (CP + EE + cinzas + FDN)$ e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de
 1996 acordo com o NRC (2001) pela equação $NDT = PB \text{ digestível} + (2,25 \times EE \text{ digestível}) + FDN$
 1997 $\text{digestível} + CNF \text{ digestível}$.

1998 A ingestão de nutrientes (MS, MO, PB, EE, FDN, FDA, CNF e NDT) foi calculada com
 1999 base na MS pela seguinte equação: Ingestão de nutrientes = (g nutriente fornecido - g nutriente

nas sobras). Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (MS, MO, PB, EE, FDN, FDA, CNF e NDT) foram calculados pela seguinte equação: Digestibilidade (g / kg) = ((g Ingestão de nutrientes - g Nutriente nas fezes) / (g Ingestão de nutrientes)) x 1000. E a produção de proteína bacteriana bruta (PBB) foi estimada de acordo com o NRC (2001) pela equação $BCP = 6,25 (- 31,86 + 26,12 \times NDT)$.

Variáveis ruminais

No 17º dia de cada período, os animais foram devidamente contidos e através da cânula ruminal, foram coletados aproximadamente 100 ml de líquido ruminal de cada animal, antes dos novilhos serem alimentados (0 hora), 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após fornecido a dieta. Essas amostras de líquido ruminal eram filtradas através de camadas de gaze, o pH era imediatamente aferido com um medidor de pH digital (Sentron 10001, Sentron Europe BV, Roden, Holanda) e 50 ml colocados em tubos de plástico devidamente identificados, contendo 1 ml de H₂SO₄ (1:1). Os tubos eram armazenados a -20 °C para análise do nitrogênio amoniacal ruminal (NH₃-N). Para a quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGV), 10 ml da amostra de líquido ruminal antes da alimentação (0 hora) , foram coletadas via cânula ruminal e colocados em tubos plásticos identificados e imediatamente armazenados a -20 °C. O NH₃-N foi realizado conforme a metodologia de Fenner (1965) e a quantificação de AGV foi determinada por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010, Kyoto, Japão) de acordo com a metodologia descrita por Erwin *et al.* (1961).

Variáveis sanguíneos

Em cada período, no 21º dia, o sangue foi coletado por punção da veia jugular e armazenados em tubos de coleta de sangue (BD Vacutainer® SST® II Advance®) contendo ativador de coágulo e gel separador. Os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 min, o soro foi coletado e colocado em eppendorf de 2 ml, identificados e armazenados a -20 °C até a análise. As amostras de soro foram analisadas por equipamento Cobas® 111 (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Suíça) usando kits de ensaio comerciais para avaliação de albumina (kit ref. 04657357), aspartato aminotransferase (AST; kit ref.04657543), γ - glutamiltransferase (GGT; kit ref. 05401461), colesterol (kit ref. 04718917), creatinina (kit ref. 05401755), glucose (kit ref. 04657527), proteína total (kit ref. 04657586), triglicerídeos (kit ref. 04657594) e ureia (kit ref. 04657616) de acordo com as instruções do fabricante do kit (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha).

2031 ***Variáveis urinários e balanço de nitrogênio***

2032 No 19º dia de cada período, foi realizada a coleta de urina por 24 horas, através da
2033 colocação de bolsas coletoras confeccionadas em tecido impermeável, amarradas por tiras de
2034 borracha aos novilhos, com uma mangueira transparente conectada a um galão plástico com
2035 capacidade de 20 litros, procedido conforme descrito por Moraes *et al.* (2019). Dentro de cada
2036 galão, de cada animal, foram adicionados 250 ml de ácido sulfúrico a 20%. A produção total
2037 de urina de cada novilho foi medida e 50 ml de urina foram amostradas, colocados em tubos
2038 plásticos, identificados e armazenados a -20 ° C para análise de nitrogênio pelo método Kjeldahl
2039 (AOAC, 2005; método 976,05) para balanço de nitrogênio.

2040 Amostra de urina *spot* foi coletada após a retirada das bolsas coletoras de urina. Uma
2041 quantidade de 10 ml da amostra de urina foi acidificada com 40 ml de H₂SO₄ (0,036 N),
2042 identificada e armazenada a -20 ° C até a análise laboratorial. As amostras de urina acidificada
2043 foram submetidas a analisador bioquímico semiautomático (Bio 200L®, Bioplus Product for
2044 Laboratory Ltda, Barueri, SP, Brasil) utilizando kits comerciais de creatinina (kit ref. K067-
2045 24.1), ureia (kit ref. K047) e ácido úrico (kit ref. K139-8.1) conforme instrução do fabricante
2046 (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

2047 O balanço de nitrogênio foi estimado através do nitrogênio retido (N-retido), obtido pelo
2048 nitrogênio ingerido (N-consumo) subtraído pelo nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes) e na
2049 urina (N-urina).

2050 ***Análise estatística***

2051 Todas as análises estatísticas foram realizadas usando procedimentos GLM do software
2052 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) e os códigos para os modelos estatísticos são
2053 apresentados no Material Suplementar S1. A ingestão, digestibilidade aparente de nutrientes,
2054 ganho de peso corporal, Variáveis sanguíneos, AGV, Variáveis urinários e Variáveis de balanço
2055 de nitrogênio foram analisados em um delineamento em quadrado latino. As médias entre os
2056 tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a $\alpha = 0,05$ de probabilidade. Usando o
2057 seguinte modelo estatístico:

$$2058 \quad Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

2059 Onde: μ = média geral; A_i = efeito animal i , com i variando de 1 a 4; P_j = efeito de
2060 período j , com j variando de 1 a 4; T_k = efeito do tratamento k , com k variando de 1 a 4; e_{ijk} =
2061 erro aleatório associado a cada observação.

O modelo para pH e NH₃-N ruminal onde o delineamento experimental foi o quadrado latino com parcelas subdivididas para os dados das variáveis ruminais (pH ruminal e N-NH₃), onde as parcelas foram os tratamentos e as subparcelas foram as amostras de líquido ruminal. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a $\alpha = 0,05$ de probabilidade. O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + H_j + A_k + P_l + (TH)_{ij} + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = observação do efeito do tratamento i por tempo de coleta j no animal k ; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento i , com i variando de 1 a 4; H_j = tempos de coleta j , com j variando de 1 a 7; A_k = efeito animal k , com k variando de 1 a 4, P_l = efeito de período l , com l variando de 1 a 4; TH_{ij} = interação entre o tratamento i e o tempo j ; e e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Resultados

Ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente

O consumo de nutrientes, digestibilidade aparente e ganho de peso corporal estão apresentados na Tabela 2 e na Tabela Complementar S1, onde o tratamento BTSB apresentou o maior consumo de MS ($P = 0,018$). O tratamento BTSB apresentou maior consumo ($P < 0,05$) de MO, PB, EE e CNF em comparação com MSB. Além disso, os tratamentos MO e MBT apresentaram menor ($P < 0,05$) consumo de EE em relação ao BTSB. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si para consumo de FDN e NDT. Além disso, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos para digestibilidade aparente de MS, MO, PB, EE, FDN, FDA, CNF, NDT e PBB.

Variáveis ruminais

As variáveis ruminais estão apresentadas na Tabela 3 e na Tabela Suplementar S2. Na análise de pH não houve diferença entre os tratamentos ($P = 0,0891$) nem interação tratamento x tempo ($P = 0,9677$). O pH ruminal dos novilhos apresentou diferença significativa ($P < 0,0001$) para o tempo de coleta, com 10 horas após o fornecimento da dieta teve o menor valor médio de pH, mas semelhante a 8 e 12 horas após o fornecimento da ração (Fig. 1).

Para a concentração de NH₃-N, foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,0032$), onde o tratamento BTSB apresentou alta concentração de NH₃-N em relação ao MBT e MSB. Não foi obtido diferença significativa ($P = 0,6672$) para a interação

para tratamento x tempo. Em relação ao efeito do tempo de coleta no nitrogênio amoniacal, a concentração média de $\text{NH}_3\text{-N}$ de 2 horas após o consumo de ração apresentou a maior concentração média ($P < 0,0001$), seguida da concentração de 4 horas e o tempo restante de coleta apresentou as menores concentrações de $\text{NH}_3\text{-N}$ (Fig. 1).

Nas concentrações obtidas de AGV, não houve efeitos significativos ($P > 0,05$) para as diferentes combinações de ionóforo e probióticos sobre o AGV total, proporção molar de Acetato, nButirato, iButirato, iValerato e nCapróico. No entanto, a proporção molar de propionato foi menor no tratamento BTSB em comparação com outros tratamentos que contém monensina sódica ($P = 0,0001$), mas o tratamento BTSB apresentou alta proporção de nValerato do que MSB, embora semelhante aos tratamentos MO e MBT. Além disso, a proporção da relação acetato:propionato de BTSB foi maior do que outros ($P = 0,0003$).

Variáveis sanguíneas

Os valores de precisão dos kits ELISA usados para análise de soro são apresentados na Tabela Suplementar S3 e os resultados da análise de soro são apresentados na Tabela 4 e na Tabela Suplementar S4. Os tratamentos avaliados neste estudo não apresentaram diferença estatística entre si ($P > 0,05$) para as seguintes variáveis sanguíneas: glucose, creatinina, proteína total e colesterol. Já para a concentração de AST, o tratamento MBT apresentou concentração menor do que os tratamentos MO e BTSB ($P = 0,0001$). Nas concentrações de GGT, os tratamentos BTSB e MO apresentaram concentração superior ao MBT, mas semelhante ao MSB ($P = 0,0034$).

As variáveis do metabolismo de proteínas séricas, albumina e ureia apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), onde MBT apresentou menor concentração de albumina comparada apenas com MO, embora na concentração de ureia sérica ambas as combinações de ionóforo mais probióticos (MBT e MSB) apresentaram os menores valores ($P = 0,0001$) do que apenas monensina ou apenas probióticos (MO ou BTSB). Os triglicerídeos séricos, um indicador do metabolismo lipídico, foram maiores no tratamento MBT do que nos outros tratamentos ($P < 0,05$).

Variáveis urinários e balanço de nitrogênio

Os valores de precisão dos kits ELISA usados para análise de urina são apresentados na Tabela Suplementar S5 e os resultados da análise de urina são apresentados na Tabela 5 e na Tabela Suplementar S6. Os tratamentos estudados fornecidos na dieta dos novilhos não

apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) nas variáveis urinárias: volume urinário, creatinina, ureia, ácido úrico e nitrogênio urinário.

Porém, ao avaliar o balanço de nitrogênio, o tratamento BTSB apresentou maior ingestão de nitrogênio ($P = 0,0135$), mas também maior excreção de nitrogênio na urina ($P = 0,0135$) e nas fezes ($P = 0,0200$) do que o tratamento MSB. O tratamento MO apresentou menor excreção de nitrogênio nas fezes do que o BTSB, ainda semelhante aos demais tratamentos nos Variáveis remanescentes do balanço de nitrogênio. Porém, os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si no nitrogênio absorvido e retido ($P > 0,05$).

Discussão

Ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente

A inclusão da monensina sódica neste estudo resultou em menor consumo de MS, essa redução no consumo de ração também foi observada por Ítavo *et al.* (2011), onde a monensina sódica diminuiu o consumo de ração, porém melhorou a conversão alimentar e a eficiência alimentar. O efeito hipofágico, ou efeito de redução da ingestão de ração, pode estar relacionado ao aumento da produção de propionato no rúmen pela monensina sódica, o que causa uma maior oxidação de ácidos graxos no fígado, onde principalmente a β -oxidação do propionato causa um retardo na fome (Allen *et al.*, 2009).

Em contraste, o tratamento BTSB fornecido na dieta do gado de corte neste estudo resultou em maior ingestão de MS. Essa alta ingestão de MS também foi observada quando leitões pós-desmame receberam *B. toyonensis* para suportar patógenos entéricos (Kantas *et al.*, 2015). Embora quando Hossain *et al.* (2012) analisando a suplementação de *S. cerevisiae* em bezerros em crescimento não encontraram interferência no consumo de ração. Uma possível interação entre *S. cerevisiae boulardii* e *B. toyonensis* pode ser a razão pela qual juntas causam um maior consumo de matéria seca em novilhos neste estudo, enquanto combinadas com monensina sódica não foram capazes de diferir de si mesmas ou do tratamento MO.

No entanto, a monensina sódica, bem como outros aditivos ionóforos, geralmente interferem no metabolismo das bactérias gram-positivas, levando à diminuição de sua população ruminal, e conforme apresentado por Luo *et al.* (2021), *B. toyonensis* é uma bactéria gram-positiva, embora os novilhos receberam diariamente os tratamentos, a monensina sódica pode ter inibido sua ação probiótica, levando a uma diferença não significativa na ingestão de MS, MO, PB, EE e CNF do tratamentos MBT em relação ao tratamento MO.

A suplementação com monensina sódica, *S. cerevisiae boulardii* e *B. toyonensis* combinadas não interferiu na digestibilidade aparente dos nutrientes analisados neste estudo. Embora a monensina sódica possa melhorar a digestibilidade ruminal dos alimentos por modulação ruminal, conforme apresentado na metanálise de Duffield *et al.* (2012), por favorecer os microrganismos celulolíticos, mas neste estudo os tratamentos MO e BTBSB não foram significativamente diferentes.

Variáveis ruminais

Neste estudo o pH ruminal não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, semelhante ao encontrado por Fereli *et al.* (2010) que ao suplementar novilhos da raça Holandês com monensina sódica ou *S. cerevisiae boulardii*, não observaram diferença entre o pH ruminal dos tratamentos. O rebaixamento tardio do pH ocorrido apenas 10 horas após o fornecimento da ração pode ter ocorrido pela ação dos aditivos em manter o pH próximo ao ideal, conforme observado por Ishaq *et al.* (2017) que ao suplementar vacas leiteiras Holstein com *S. boulardii* observou uma mudança na microbiota do rúmen levando a uma rápida estabilização do pH a partir de uma acidose ruminal subaguda. Assim como Kumprechtová *et al.* (2019) avaliando a suplementação dietética com levedura viva de *S. cerevisiae* na fermentação ruminal em vacas leiteiras em lactação, descobriram que *S. cerevisiae* reduz o acúmulo de lactato no fluido ruminal, resultando em um aumento no pH ruminal.

Em relação ao $\text{NH}_3\text{-N}$ ruminal, Gomes *et al.* (2010) avaliando monensina sódica e *S. cerevisiae* em uma dieta com 21 % de bagaço de cana como volumoso, encontraram valores médios muito semelhantes de concentração de $\text{NH}_3\text{-N}$ ruminal de novilhos, embora não estatisticamente diferente, onde o tratamento com monensina foi de 18,60 mg / dl e *S. cerevisiae* 20,40 mg / dl, lembrando que nossos valores foram de 18,09 mg / dl para o tratamento com MO e 21,08 mg / dl para o tratamento com BTBSB.

Quando analisado pelo tempo, 2 horas após a alimentação foi o pico da concentração de $\text{NH}_3\text{-N}$, atingindo uma média entre os tratamentos de 30,9 mg / dl. De acordo com Moallem *et al.* (2009) a concentração de $\text{NH}_3\text{-N}$ no rúmen é afetada pela degradação da proteína, como reflexo da disponibilidade de produtos nitrogenados, e pela incorporação à proteína microbiana. Mesmo sendo normais, essas altas concentrações não são desejáveis, pois o excesso de amônia é absorvido pela parede ruminal para a corrente sanguínea e parte se perde na urina.

Outra variável ruminal avaliada foi o AGV, em nosso estudo o AGV total não foi influenciado pelos aditivos na dieta ($P = 0,1442$) nem pela proporção de acetato, resultando em uma concentração média de 80,2 mmol / L de AGV e 64,12% de acetato. Ao contrário do que

foi observado em nosso presente estudo, Kumprechtová *et al.* (2019) encontraram que os resultados de AGV e a proporção molar de acetato foram maiores no tratamento com *S. cerevisiae* (114,2 mmol / l; 25,0% de acetato) do que na dieta controle sem probióticos (106,5 mmol / l; 24,7% de acetato).

Além disso, Monnerat *et al.* (2013) avaliando monensina sódica, *S. cerevisiae* ou sem aditivo (controle) em novilhos, não encontraram diferença significativa na concentração de AGV entre os tratamentos monensina e *S. cerevisiae*, mas o tratamento controle apresentou a menor concentração de AGV, como eles hipotetizaram, o aumento de AGV ruminal pode ser devido a uma melhoria direta ou indireta no ambiente ruminal pelos aditivos, selecionando bactérias ruminais desejáveis e reduzindo ou eliminando populações indesejáveis de microrganismos. Embora Monnerat *et al.* (2013) não encontraram diferença estatística para a taxa de propionato nem acetato:propionato entre a monensina e o tratamento probiótico como encontramos, em nosso caso o efeito da monensina no aumento da produção de propionato, conforme revisado por Allen *et al.* (2009), foi proeminente e os probióticos não foram capazes de interferir na taxa de propionato ou acetato:propionato quando combinados à monensina.

Variáveis sanguíneas

A faixa das variáveis sanguíneas GGT, albumina e creatinina em todos os tratamentos e colesterol em dois tratamentos (MBT e MSB) estão de acordo com os valores descritos para a espécie segundo Kaneko *et al.* (2008). O colesterol dos tratamentos MO (123,75 mg / dl) e BTBS (128,00 mg / dl), embora não tenham sido estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) dos demais, foram superiores ao normal para a espécie (80 a 120 mg / dl) conforme apresentado por Kaneko *et al.* (2008). Porém, o AST obtido (44,65 a 61,08 U / L), a proteína total (63,17 a 66,50 g / L) e a ureia (30,85 a 37,28 mg / dl) dos tratamentos ficaram ligeiramente abaixo do recomendado (AST 78 a 132 U / L; Proteína total 67,4 a 74,6 g / L; Ureia 42,88 a 64,26 mg / dl), por outro lado, glicose (75,44 a 81,96 mg / dl) e triglicerídeos (14,07 a 17,95 mg / dl), estavam acima dos valores de referência (Glucose 45 a 75 mg / dl; Triglicerídeos 0 a 14 mg / dl) (Kaneko *et al.*, 2008).

Ao contrário da diferença obtida em AST e GGT entre os tratamentos testados, Hafner *et al.* (2019) estudando a suplementação com *B. toyonensis* (anteriormente denominado *B. cereus* var. Toyoi) em coelhos, não encontraram alterações significativas nos níveis de AST e GGT com a adição do probiótico em suas dietas. Além disso, quando Aung *et al.* (2019) avaliando a inclusão de *S. cerevisiae* na dieta de vacas leiteiras, não encontrou diferença estatística nos níveis de AST ou GGT.

AST é uma enzima que indica o estado do fígado, um aumento na AST sérica pode ser um forte indicador de acidose ruminal devido a um baixo pH ruminal (Xu *et al.*, 2016). Maiores concentrações de AST e baixo pH ruminal, simultaneamente, foram observadas em ovinos recebendo *S. cerevisiae* em dieta de alta densidade energética por Tavares *et al.* (2021). Explorando essa possível relação entre AST sérica e pH ruminal, embora apenas numericamente ($P > 0,05$), o tratamento BTSB teve o menor pH ruminal foi de 5,9 (10 horas após a alimentação) e 6 (12 horas após a alimentação), que ainda são classificados como variação fisiológica normal para o pH ruminal, o AST neste tratamento apresenta o maior valor numericamente que todos os tratamentos, corroborando com a possível relação do AST e o pH ruminal.

Mudanças nos indicadores do metabolismo de proteínas tornam-se mais proeminentes ao comparar diferentes idades ou estágios de desenvolvimento dos animais, devido às mudanças na taxa de deposição de músculos e outros tecidos, conforme observado por Neumann *et al* (2018) suplementando monensina para bovinos em confinamento, quando os níveis plasmáticos de proteína, ureia e creatinina apresentaram diferença significativa de acordo com o período avaliado, mas não entre os tratamentos (com ou sem monensina). Corroborando com nosso estudo, a creatinina e a proteína total não foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos.

A concentração de ureia sérica avaliada em nosso estudo foi menor de acordo com os valores de referência apresentados por Kaneko *et al* (2008), embora González e Silva (2017) consideraram normal uma concentração de ureia sérica entre 17-45 mg / dl. No entanto, a ureia sérica e a albumina foram maiores em MO e BTSB do que outros tratamentos podem estar diretamente relacionados à maior ingestão de nitrogênio, conforme observado nos resultados de balanço de nitrogênio.

Em relação aos elevados níveis de concentração de glucose e triglicerídeos, pode ser devido ao fato de os novilhos terem recebido suplemento concentrado. Hossain *et al.* (2012) observaram um aumento no nível de glucose ao adicionar *S. cerevisiae* para vacas em lactação (50,40 mg / dl vs. 66,92 mg / dl, controle de *S. cerevisiae*, respectivamente), mas em nosso estudo a adição de *S. boulardii* nos tratamentos não causar um aumento nas concentrações séricas de glucose. Resumindo, todas as variáveis séricas estavam de acordo com a normalidade para a espécie ou ligeiramente divergentes, mas não indicativos de efeito tóxico de nenhum dos tratamentos testados.

Variáveis urinários e balanço de nitrogênio

De acordo com os valores dos Variáveis urinários descritos por Kaneko *et al.* (2008), a concentração de creatinina (6,43 a 11,02 mg / kg por dia) foi menor que a de referência (15 a 20 mg / kg por dia), assim como o ácido úrico obtido (0,29 a 0,92 mg / kg por dia) também foi menor do que o padrão (1 a 4 mg / kg por dia). Ainda de acordo com Kaneko *et al.* (2008), o nitrogênio uréico em todos os tratamentos (57,82 a 108,86 mg / kg por dia) foi superior à faixa normal (23 a 28 mg / kg por dia), embora o nitrogênio total na urina (207,75 a 269,17 mg / kg por dia) esteve dentro dos valores de referência (40 a 450 mg / kg por dia).

A relação entre as concentrações de creatinina sérica no sangue e na urina é um dos melhores indicadores da função renal, pois a creatinina sanguínea é eliminada apenas pelos rins (Laven, 2016). A creatinina urinária baixa geralmente indica uma diminuição da capacidade dos rins de eliminar este metabólito, refletindo em uma concentração elevada no sangue, embora neste estudo isso possa não ser o caso, considerando que a concentração desse metabólito no soro dos novilhos estava dentro da faixa normal, algum fator pode ter diminuído a estabilidade da creatinina nas amostras de urina e resultado na redução da concentração.

Em relação aos Variáveis de balanço de nitrogênio obtidos, a maior ingestão de nitrogênio no tratamento BTSB refletiu em maior excreção de nitrogênio, não apenas nas fezes, mas também na urina. Embora uma diferença não significativa entre os tratamentos em N-absorvido e N-retenção foi observada. Monnerat *et al.* (2013) também não observaram diferença estatística no balanço de nitrogênio ao suplementar bovinos de corte com monensina sódica ou *S. cerevisiae*.

A combinação de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* com *Bacillus toyonensis* apresentou-se um potencial aditivo alimentar para bovinos, por apresentar concentrações semelhantes ao tratamento com monensina (MO) no pH ruminal, NH₃-N, AGV total e balanço de nitrogênio. Ainda assim, a monensina combinada com os probióticos estudados não pôde superar o tratamento MO ou o tratamento BTSB, não sendo aconselhado esta combinação, devido à falta de benefícios. Nenhum sinal de desbalanço fisiológico foram observados nas variáveis sanguíneas ou urinárias nos tratamentos testados.

Aprovação ética

Todos os procedimentos neste estudo, envolvendo cuidados com os animais, estavam de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal sob o caso do Comitê de Ética para Uso de Animais no: 1186/2021

Declaração de disponibilidade de dados e modelo

2285 Nenhum dos dados foi depositado em um repositório oficial. O acesso aos dados pode
2286 ser disponibilizado mediante solicitação

2287 **ORCIDs dos autores**

2288 C. da S. Zornitta: <https://orcid.org/0000-0002-4877-0800>

2289 L. C. V. Ítavo: <https://orcid.org/0000-0001-6895-8483>

2290 C. C. B. F. Ítavo: <https://orcid.org/0000-0002-4790-8177>

2291 A. M. Dias: <https://orcid.org/0000-0003-4267-9421>

2292 G. L. Franco: <https://orcid.org/0000-0002-9868-0256>

2293 A. P. da Silva: <https://orcid.org/0000-0001-6392-3214>

2294 **Contribuições do autor**

2295 **Camila da Silva Zornitta:** Administração de projetos, Curadoria de dados, Análise
2296 formal, Investigação, Redação - Manuscrito original. **Luis Carlos Vinhas Ítavo:**
2297 Conceptualização, Metodologia, Redação - Revisão e Edição, Supervisão. **Camila Celeste**
2298 **Brandão Ferreira Ítavo:** Conceptualização, Metodologia, Recursos. Alexandre Menezes
2299 Dias: Software, Análise formal. **Gumercindo Lorian Franco:** Supervisão, Administração de
2300 projetos. Amarildo Pedro da Silva: Curadoria de Dados, Análise Formal

2301 **Declaração de interesse**

2302 Os autores declaram não haver conflito de interesses

2303 **Reconhecimentos**

2304 Os autores agradecem à Lallemand Brasil Ltda, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil, pelo
2305 fornecimento dos probióticos ProTernative® e Micro-Cell Platinum®, e ao Conselho Nacional
2306 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de
2307 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos do primeiro autor, que foi
2308 fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

2309 **Declaração de suporte financeiro**

2310 Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento
2311 Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
2312 Superior (CAPES) (Código Financiador 001).

Referências

- Allen, M.S., Bradford, B.J., Oba, M., 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal of Animal Science* 87, 3317–3334. doi:10.2527/jas.2009-1779.
- Association of Official Analysis Chemists (AOAC), 2005. Official method of Analysis. 18th Edition, AOAC International, Washington, DC, USA.
- Aung, M., Ohtsuka, H., Izumi, K., 2019. Effect of yeast cell wall supplementation on production performances and blood biochemical indices of dairy cows in different lactation periods. *Veterinary World* 12, 796–801. doi:10.14202/vetworld.2019.796-801.
- Chattopadhyay, M.K., 2014. Use of antibiotics as feed additives: A burning question. *Frontiers in Microbiology* 5, 334. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00334>
- Danieli, B., Schogor, A.L., 2020. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes:Revisão. *Veterinária e Zootecnia* 27, 1–13. doi:10.35172/rvz.2020.v27.444.
- Duffield, T.F., Merrill, J.K., Bagg, R.N., 2012. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science* 90, 4583–4592. doi:10.2527/jas.2011-5018.
- EMA (European Medicines Agency), 2007. COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR VETERINARY USE MONENSIN (Cattle, including dairy cows). EMA/CVMP/185123/2007-Final. London.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. *Journal of Dairy Science* 44, 1768–1771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2020. World Food and Agriculture - Statistical Yearbook 2020. FAO, Rome, Italy. doi:10.4060/cb1329en.
- Fenner, H., 1965. Method for Determining Total Volatile Bases in Rumen Fluid by Steam Distillation. *Journal of Dairy Science* 48, 249–251. doi:10.3168/jds.S0022-0302(65)88206-6.
- Fereli, F., Branco, A.F., Jobim, C.C., Coneglian, S.M., Granzotto, F., Barreto, J.C., 2010. Sodium monensin and *Saccharomyces cerevisiae* in cattle diets: ruminal fermentation, nutrient digestibility and microbial synthesis efficiency. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39, 183–190. doi:10.1590/s1516-35982010000100024.
- Garcia-Mazcorro, J.F., Ishaq, S.L., Rodriguez-Herrera, M. V., Garcia-Hernandez, C.A., Kawas, J.R., Nagaraja, T.G., 2020. Review: Are there indigenous *Saccharomyces* in the digestive

- tract of livestock animal species? Implications for health, nutrition and productivity traits. *Animal* 14, 22–30. doi:10.1017/S1751731119001599.
- Gomes, R. da C., Antunes, M.T., Nogueira Filho, J.C.M., Ítavo, L.C.V., Leme, P.R., 2010. Leveduras vivas e monensina em dietas de alto concentrado para bovinos: parâmetros ruminais e degradabilidade “in situ”. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 11, 202–216.
- González, F.H.D., Silva, C. da S., 2017. Introdução à bioquímica clínica veterinária, 3rd ed, Editora da UFRGS. Editora da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil, 538.
- Hafner, D., Tuboly, T., Mézes, M., Bloch-Bodnár, Z., Balogh, K., Vántus, V., Bóta, B., Szabó-Fodor, J., Matics, Z., Szabó, A., Kovács, M., 2019. Effect of feeding *Bacillus cereus* var. *toyoi* and/or mannan oligosaccharide (MOS) on blood clinical chemistry, oxidative stress, immune response and genotoxicity in T-2 toxin exposed rabbits. *Italian Journal of Animal Science* 18, 1239–1251. doi:10.1080/1828051X.2019.1641165.
- Hossain, S.A., Parnerkar, S., Haque, N., Gupta, R.S., Kumar, D., Tyagi, A.K., 2012. Influence of dietary supplementation of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on nutrient utilization , ruminal and biochemical profiles of Kankrej calves. *International Journal of Applied Animal Sciences* 1, 30–38.
- İnal, F., Gürbüz, E., Coşkun, B., Alataş, M.S., Çitil, Ö.B., Polat, E.S., Şeker, E., Özcan, C., 2010. The Effects of Live Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on Rumen Fermentation and Nutrient Degradability in Yearling Lambs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 16, 799–804. doi:10.9775/kvfd.2010.1672.
- Ishaq, S.L., AlZahal, O., Walker, N., McBride, B., 2017. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Frontiers in Microbiology* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01943.
- Ítavo, C.C.B.F., Morais, M.G., Costa, C., Ítavo, L.C.V., Franco, G.L., da Silva, J.A., Reis, F.A., 2011. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. *Animal Feed Science and Technology* 165, 161–166. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.02.020.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Sixth Edition). Academic Press, Burlington, MA, USA.
- Kantas, D., Papatsiros, V.G., Tassis, P.D., Giavasis, I., Bouki, P., Tzika, E.D., 2015. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology* 118, 727–738.

- doi:10.1111/jam.12729.
- Kayser, W.C., Carstens, G.E., Washburn, K.E., Welsh, T.H., Lawhon, S.D., Reddy, S.M., Pinchak, W.E., Chevaux, E., Skidmore, A.L., 2019. Effects of combined viral-bacterial challenge with or without supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii strain CNCM I-1079 on immune upregulation and DMI in beef heifers. *Journal of Animal Science* 97, 1171–1184. doi:10.1093/jas/sky483.
- Kumprechtová, D., Illek, J., Julien, C., Homolka, P., Jančík, F., Auclair, E., 2019. Effect of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on rumen fermentation and metabolic profile of dairy cows in early lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103, 447–455. doi:10.1111/jpn.13048.
- Laven, R.A., 2016. Bovine Medicine, 3rd Edition. *New Zealand Veterinary Journal* 64, 69–69. doi:10.1080/00480169.2016.1114069.
- Luo, J.C., Long, H., Zhang, J., Zhao, Y., Sun, L., 2021. Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 1–13. doi:10.3389/fcimb.2021.629116.
- Moallem, U., Lehrer, H., Livshitz, L., Zachut, M., Yakoby, S., 2009. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *Journal of Dairy Science* 92, 343–351. doi:10.3168/jds.2007-0839.
- Monnerat, J.P.I. dos S., Paulino, P.V.R., Detmann, E., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.D.F., Duarte, M.S., 2013. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and monensin on digestion, ruminal parameters, and balance of nitrogenous compounds of beef cattle fed diets with different starch concentrations. *Tropical Animal Health and Production* 45, 1251–1257. doi:10.1007/s11250-013-0356-9.
- de Moraes, G.J., Ítavo, L.C. V., Ítavo, C.C.B.F., Dias, A.M., Niwa, M.V.G., Leal, E.S., Kozerski, N.D., da Costa, M.C.M., da Mata, D.G., Inada, A.C., 2019. Extruded urea could reduce true protein source in beef cattle diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103, 1283–1294. doi:10.1111/jpn.13140.
- Neumann, M., Ueno, R.K., Heker, J.C., Askel, E.J., De Souza, A.M., Vigne, G.L.D., Poczynek, M., Coelho, M.G., Eto, A.K., 2018. Growth performance and safety of meat from cattle feedlot finished with monensin in the ration. *Semina: Ciências Agrárias* 39, 697–709. doi:10.5433/1679-0359.2018v39n2p697.
- National Research Council (NRC), 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Perna Junior, F., Vásquez, D.C.Z., Gardinal, R., Meyer, P.M., Berndt, A., Friguetto, R.T.S., de

- Abreu Demarchi, J.J.A., Rodrigues, P.H.M., 2020. Short-term use of monensin and tannins as feed additives on digestibility and methanogenesis in cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* 49. doi:10.37496/RBZ4920190098
- Roos, T.B., Tabeleão, V.C., Dümmer, L.A., Schwegler, E., Goulart, M.A., Moura, S. V., Corrê, M.N., Leite, F.P.L., Gil-Turnes, C., 2010. Effect of *bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. *Food and Agricultural Immunology* 21, 113–118. doi:10.1080/09540100903443691.
- Russell, J.B. and Houlihan, A.J., 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 65–74. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00019-6
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G., Russell, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*. 70, 3562–3577. doi:10.2527/1992.70113562x.
- Tavares, L.A., de Araújo, M.C.N., Barbosa, A.A., Brauner, C.C., Corrêa, M.N., Schmitt, E., Rabassa, V.R., Pino, F.A.B. Del, 2021. Use of *saccharomyces cerevisiae*-based products and effects on rumen environment and performance of sheep subjected to dietary changes. *Ciencia Rural* 51, 1–12. doi:10.1590/0103-8478cr20200407.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Weiss, C.P., Beck, P.A., Gadberry, M.S., Richeson, J.T., Wilson, B.K., Robinson, C.A., Zhao, J., Hess, T., Hubbell, D., 2020. Effects of intake of monensin during the stocker phase and subsequent finishing phase on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. *Applied Animal Science* 36, 668–676. doi:10.15232/aas.2020-02031.
- Xu, C., Shen, T., Yang, W., Yu, H., Gao, S., Huang, B., 2016. The Effect of Subacute Ruminant Acidosis of Dairy Cows on Productivity, Digestibility and Greenhouse Gas Emission. *Journal of Agricultural Science* 8, 92. doi:10.5539/jas.v8n4p92.

Tabela 1

Participação dos ingredientes e química da dieta experimental oferecida aos novilhos sem os aditivos.

Item	Dieta
Ingrediente (% MS da dieta)	
Silagem de milho	30
Concentrado ¹	70
Milho moído	45,50
Farelo de soja	8,52
Casca de soja	14,00
Amireia® 180S	0,82
Sal	0,23
Lithonutri®	0,85
Premix	0,04
Vitamina ADE	0,04
Composição química da dieta (g/kg MS da dieta)	
Matéria seca	695,64
Matéria orgânica	953,06
Proteína bruta	151,34
Extrato etéreo	27,38
Fibra em detergente neutro	400,67
Fibra em detergente ácido	212,06
Carboidratos não-fibrosos (CNF) ²	388,43

¹Conteúdo (por kg de concentrado): Cálcio 5,00 g; Fósforo 2600,00 mg; Cobalto 0,62 mg; Cobre 15,30 mg;

Enxofre 195,00 mg; Iodo 0,80 mg; Magnésio 78,40 mg; Manganês 12,48 mg; Selênio 0,20 mg; Sódio 1230,00 mg; Zinco 51,00 mg; Vitamina A 3300,00 UI; Vitamina D 412,50 UI; Vitamina E 15,00 UI.

² CNF (%) = 100-(%PB-(%PBamiréia * %amiréia)) + %FDN + %EE + %MM)

Tabela 2

Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value
	MO	MBT	MSB	BTSB		
Consumo kg/dia (base de MS)						
MS	9,942 ^b	10,035 ^b	10,180 ^b	11,281 ^a	0,49	0,0177
MO	8,793 ^{ab}	8,817 ^{ab}	8,312 ^b	9,632 ^a	0,40	0,0378
PB	1,452 ^{ab}	1,439 ^{ab}	1,351 ^b	1,611 ^a	0,08	0,0136
EE	0,373 ^b	0,374 ^b	0,405 ^{ab}	0,448 ^a	0,04	0,0362
FDAa	3,332	3,395	3,127	3,548	0,12	0,1335
FDA	1,841	1,908	1,690	1,834	0,11	0,2874
CNF	3,636 ^{ab}	3,609 ^{ab}	3,428 ^b	4,025 ^a	0,26	0,0459
NDT	6,985	6,916	6,837	7,225	0,35	0,8105
Digestibilidade aparente (g/kg na MS)						
MS	750,73	745,25	778,39	720,21	15,22	0,5114
MO	744,71	735,69	750,06	694,45	16,10	0,4465
PB	725,47	722,31	714,14	672,78	16,60	0,2177
EE	868,14	893,30	887,11	898,84	16,78	0,6317
FDNa	624,19	648,04	653,92	536,12	24,10	0,2085
FDA	589,84	615,02	609,12	482,03	36,19	0,1741
CNF	847,66	801,98	833,55	812,04	17,03	0,6899
NDT	705,52	696,87	660,64	638,88	16,21	0,2483
PBB(g/dia)	941,16	929,85	916,98	980,33	57,53	0,8105

¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;

BTBSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

²EPM= erro padrão da média.

^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 3

Variáveis ruminiais de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value
	MO	MBT	MSB	BTSB		
pH Ruminal ³	6,496	6,411	6,475	6,329	0,58	0,0891
NH ₃ -N, mg/dL ⁴	18,086 ^{ab}	16,801 ^b	15,712 ^b	21,080 ^a	0,84	0,0032
AGV total, mmol/l	88,262	82,053	75,184	75,472	2,96	0,1442
Proporção molar do AGV, %						
Acetato (C2)	63,810	63,949	63,004	65,711	0,75	0,0609
Propionato (C3)	18,683 ^a	18,926 ^a	20,228 ^a	14,730 ^b	0,99	0,0001
iButirato (iC4)	1,273	1,402	1,439	1,354	0,61	0,1074
nButirato (nC4)	12,508	11,943	11,174	14,005	0,04	0,1789
nValerato (nC5)	0,985 ^{ab}	0,932 ^{ab}	0,859 ^b	1,003 ^a	0,03	0,0397
iValerato (iC5)	2,550	2,612	3,168	2,950	0,12	0,0399
nCaprico (nC6)	0,191	0,236	0,129	0,247	0,02	0,1494
Acetato:propionato	3,709 ^b	3,723 ^b	3,524 ^b	4,561 ^a	0,21	0,0003

¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.²EPM= erro padrão médio.³Interação tratamento x hora do pH ruminal, *P* = 0,9677.⁴Interação tratamento x hora do NH₃-N, *P* = 0,6672.^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (*P* < 0,05).

Tabela 4

Variáveis sanguíneas de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value
	MO	MBT	MSB	BTSB		
Glucose (mg/dl)	80,51	81,96	75,44	80,57	2,53	0,0567
Metabolismo enzimático						
AST (U/L)	53,73 ^{ab}	44,65 ^c	47,95 ^{bc}	61,08 ^a	1,70	0,0001
GGT (U/L)	15,85 ^a	14,00 ^b	14,90 ^{ab}	15,70 ^a	0,67	0,0034
Metabolismo proteico						
Albumina (g/L)	33,00 ^a	29,50 ^b	31,00 ^{ab}	32,25 ^{ab}	0,61	0,0254
Creatinina (mg/dl)	1,35	1,30	1,30	1,35	0,05	0,8013
Proteína total (g/L)	66,50	63,17	65,65	64,45	1,63	0,3598
Ureia (mg/dl)	36,70 ^a	30,85 ^b	32,75 ^b	37,28 ^a	1,26	0,0001
Metabolismo lipídico						
Colesterol (mg/dl)	123,75	120,00	119,25	128,00	6,28	0,3290
Triglicerídeos (mg/dl)	15,20 ^b	17,95 ^a	14,07 ^b	14,78 ^b	0,74	<0,0001

¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.²EPM= erro padrão da média.^{a-c} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (*P* < 0.05).

Tabela 5

Variáveis urinárias e balanço de nitrogênio de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value
	MO	MBT	MSB	BTBSB		
PC final	491,00	464,25	488,25	469,50	22,39	0,9887
Volume urinário (L/dia)	4,89	6,40	6,75	5,74	0,66	0,8615
Variáveis urinário (mg/dl)						
Creatinina	65,31	78,75	68,44	56,25	7,44	0,7426
Ureia	1225,00	1687,50	1143,75	1343,75	182,53	0,7639
Ácido úrico	8,75	2,50	5,00	8,75	1,91	0,3072
Nitrogênio total	2350,17	1690,78	2040,75	2422,50	233,29	0,8370
N-ureia	571,68	787,52	533,76	627,68	85,18	0,7639
Variáveis urinários (mg/kg do PC)						
Creatinina	6,43	11,02	9,05	6,56	1,13	0,5481
Ureia	123,90	233,27	163,09	158,47	25,47	0,6772
Ácido úrico	0,82	0,29	0,38	0,92	0,19	0,2520
Nitrogênio total	232,30	232,16	207,75	269,17	15,59	0,5849
N-ureia	57,82	108,86	76,11	73,96	11,88	0,6772
Balanço de nitrogênio (g/dia)						
N-Consumo	232,39 ^{ab}	230,28 ^{ab}	216,21 ^b	257,72 ^a	12,10	0,0135
N-Fezes	63,00 ^b	63,96 ^{ab}	58,58 ^b	83,72 ^a	4,72	0,0200
N-Urina	108,96 ^{ab}	107,78 ^{ab}	99,90 ^b	123,15 ^a	6,78	0,0135
N-Retido	60,44	58,55	57,73	50,86	5,32	0,4587

¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*; BTBSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

²EPM= erro padrão da média.

^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

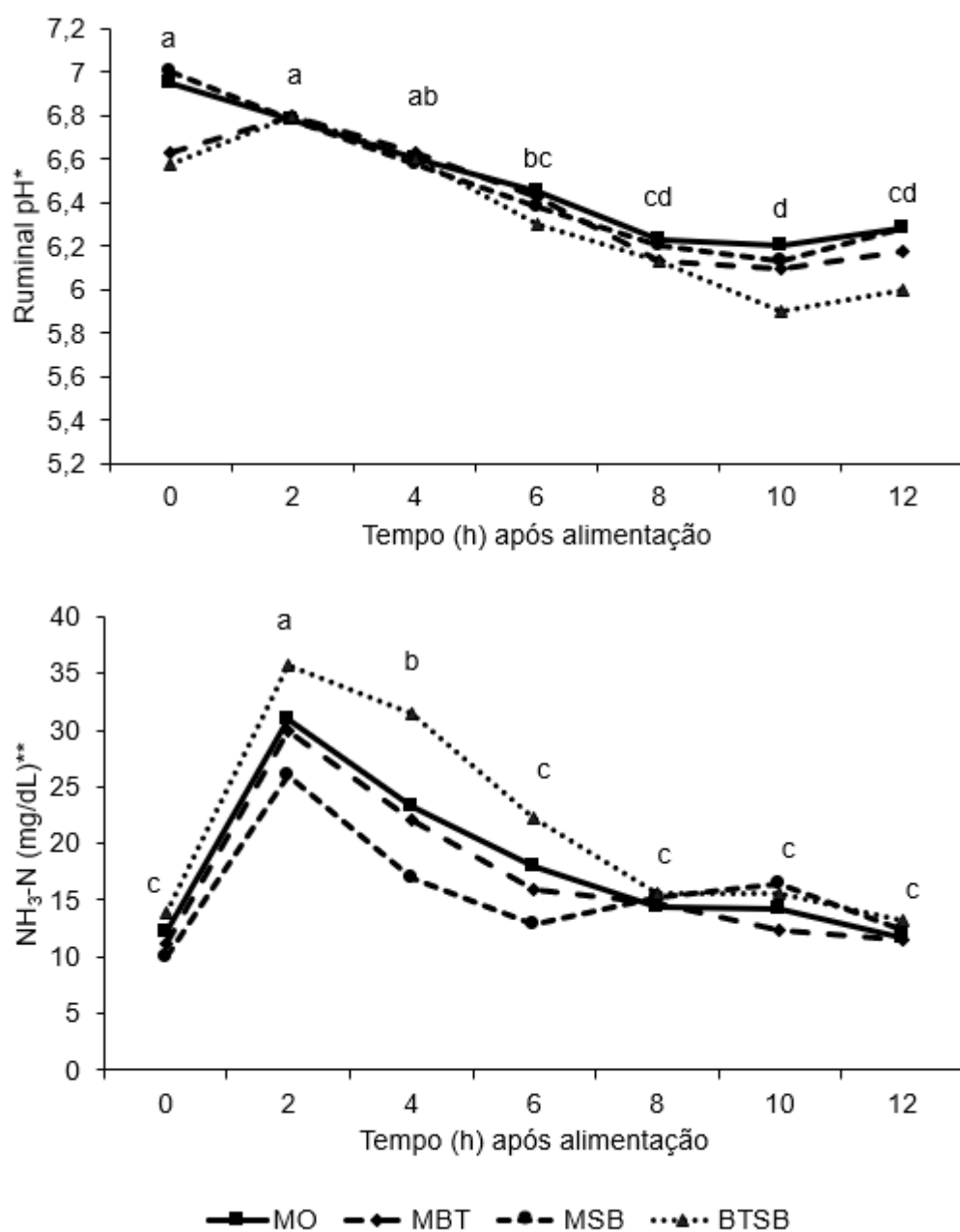


Fig. 1. Valores médios de pH ruminal e nitrogênio amoniacal (NH₃-N) em diferentes horários de coleta de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Abreviações: MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*; BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

* Efeito da hora no pH, $P < 0.0001$. ** Efeito da hora no NH₃-N, $P < 0.0001$. Valores com diferentes sobrescritos diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

2494 **Materiais suplementares**

2495

2496 **Material suplementar S1 Modelo estatístico usado no software SAS®**

2497

2498 *Non-repeated variables:*

2499 PROC GLM DATA= *Data*;

2500 CLASS PERIOD TREATMENT ANIMAL;

2501 MODEL *Variable* = PERIOD TREATMENT ANIMAL;

2502 MEANS TREATMENT/TUKEY;

2503 RUN;

2504

2505 *Repeated variables:*

2506 PROC GLM DATA= *Data*;

2507 CLASS PERIOD TREATMENT ANIMAL HOUR;

2508 MODEL *Variable* = PERIOD TREATMENT ANIMAL HOUR TREATMENT*HOUR;

2509 MEANS TREATMENT/TUKEY;

2510 MEANS HOUR/TUKEY;

2511 RUN;

2512

2513 **Tabela Suplementar S1:** Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente de novilhos
 2514 recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value		
	MO	MBT	MSB	BTSB		Trat.	Período	Animal
Consumo kg/dia (base de MS)								
MS	9,942	10,035	10,180	11,281	0,49	0,0177	0,0001	0,0004
MO	8,793	8,817	8,312	9,632	0,40	0,0378	0,0004	0,0023
PB	1,452	1,439	1,351	1,611	0,08	0,0136	0,0001	0,0020
EE	0,373	0,374	0,405	0,448	0,04	0,0362	<0,0001	0,0030
FDNa	3,332	3,395	3,127	3,548	0,12	0,1335	0,0399	0,0035
FDA	1,841	1,908	1,690	1,834	0,11	0,2874	0,0005	0,0108
CNF	3,636	3,609	3,428	4,025	0,26	0,0459	<0,0001	0,0070
NDT	6,985	6,916	6,837	7,225	0,35	0,8105	0,0013	0,0540
Digestibilidade aparente (g/kg de MS)								
MS	750,73	745,25	778,39	720,21	15,22	0,5114	0,0843	0,6929
MO	744,71	735,69	750,06	694,45	16,10	0,4465	0,0475	0,7429
PB	725,47	722,31	714,14	672,78	16,60	0,2177	0,0094	0,0592
EE	868,14	893,30	887,11	898,84	16,78	0,6317	0,0027	0,8018
FDNa	624,19	648,04	653,92	536,12	24,10	0,2085	0,0918	0,6887
FDA	589,84	615,02	609,12	482,03	36,19	0,1741	0,0093	0,3446
CNF	847,66	801,98	833,55	812,04	17,03	0,6899	0,0821	0,5571
NDT	705,52	696,87	660,64	638,88	16,21	0,2483	0,1051	0,1392
PBB(g/dia)	941,16	929,85	916,98	980,33	57,53	0,8105	0,0013	0,0540

2515 ¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;

2516 BTBSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

2517 ²EPM= erro padrão da média.

2518 ^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey

2519 (Tratamento; $P < 0.05$).

2520 **Tabela suplementar S2:** Variáveis ruminais de novilhos recebendo dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value				
	MO	MBT	MSB	BTSB		Tratamento	Período	Animal	Hora	Tratamento *Hora
pH ruminal	6,496	6,411	6,475	6,329	0,58	0,0891	<0,0001	0,1646	<0,0001	0,9677
NH ₃ -N, mg/dl	18,086 ^{ab}	16,801 ^b	15,712 ^b	21,080 ^a	0,84	0,0032	0,0310	0,0004	<0,0001	0,6672
AGV total, mmol/l	88,262	82,053	75,184	75,472	2,96	0,1442	0,0214	0,0059		
Proporção molar do AGV, %										
Acetato (C2)	63,810	63,949	63,004	65,711	0,75	0,0609	<0,0001	<0,0001		
Propionato (C3)	18,683 ^a	18,926 ^a	20,228 ^a	14,730 ^b	0,99	0,0001	<0,0001	<0,0001		
iButirato (iC4)	1,273	1,402	1,439	1,354	0,61	0,1074	0,0010	0,0012		
nButirato (nC4)	12,508	11,943	11,174	14,005	0,04	0,1789	0,5666	0,0003		
nValerato (nC5)	0,985 ^{ab}	0,932 ^{ab}	0,859 ^b	1,003 ^a	0,03	0,0397	0,0058	0,0002		
iValerato (iC5)	2,550	2,612	3,168	2,950	0,12	0,0399	0,0013	0,0072		
nCaproico (nC6)	0,191	0,236	0,129	0,247	0,02	0,1494	0,6748	0,6148		
Acetato: propionato	3,709 ^b	3,723 ^b	3,524 ^b	4,561 ^a	0,21	0,0003	<0,0001	<0,0001		

2521 ¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*; BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

2522 ²EPM= erro padrão da média.

2523 ^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (Tratamento; *P* < 0.05).

2524 **Tabela suplementar S3:** Valores de precisão do kit ELISA utilizado para a medição
 2525 quantitativa das variáveis séricas de novilhos de corte recebendo dieta com a associação de
 2526 probióticos e ionóforo.

	CV	
	Intra-teste	Inter-teste
Albumin kit – ALB2 (ref. 04657357; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<0,8	7,11
Aspartate aminotransferase kit – ASTL (ref. 04657543; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,4	11,05
γ -Glutamyltransferase kit – GGT-2 (ref. 05401461; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,9	6,43
Cholesterol kit – CHOL2 (ref. 04718917; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,4	8,41
Creatinine kit – CREJ2 (ref. 05401755; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<4,0	10,67
Glucose kit – GLUC2 (ref. 04657527; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,1	12,25
Total Protein kit – TP2 (ref. 04657586; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<3,1	5,94
Triglycerides kit – TRIGL (ref. 04657594; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,3	7,62
Urea kit – UREAL (ref. 04657616; Roche Diagnostics GmbH, Germany)	<1,0	7,25

2527

2528

2529 **Tabela suplementar S4:** Variáveis sanguíneas de novilhos recebendo dieta com a associação
 2530 de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value		
	MO	MBT	MSB	BTSB		Tratamento	Período	Animal
Glucose (mg/dl)	80,51	81,96	75,44	80,57	2,53	0,0567	0,0001	0,0509
Metabolismo enzimático								
AST (U/L)	53,73 ^{ab}	44,65 ^c	47,95 ^{bc}	61,08 ^a	1,70	0,0001	0,0005	0,6301
GGT (U/L)	15,85 ^a	14,00 ^b	14,90 ^{ab}	15,70 ^a	0,67	0,0034	<0,0001	<0,0001
Metabolismo proteico								
Albumina (g/L)	33,00 ^a	29,50 ^b	31,00 ^{ab}	32,25 ^{ab}	0,61	0,0254	0,0003	0,0254
Creatinina (mg/dl)	1,35	1,30	1,30	1,35	0,05	0,8013	0,0325	<0,0001
Proteína total (g/L)	66,50	63,17	65,65	64,45	1,63	0,3598	<0,0001	<0,0001
Ureia (mg/dl)	36,70 ^a	30,85 ^b	32,75 ^b	37,28 ^a	1,26	0,0001	0,0182	<0,0001
Metabolismo lipídico								
Colesterol (mg/dl)	123,75	120,00	119,25	128,00	6,28	0,3290	<0,0001	<0,0001
Triglicérides (mg/dl)	15,20 ^b	17,95 ^a	14,07 ^b	14,78 ^b	0,74	<0,0001	<0,0001	<0,0001

2531 ¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;

2532 BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

2533 ²EPM= erro padrão da média.

2534 ^{a-c} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey

2535 (Tratamento; $P < 0.05$).

2536

2537 **Tabela suplementar S5:** Valores de precisão do kit ELISA utilizado nas medidas
 2538 quantitativas das variáveis urinárias de novilhos recebendo dieta com a associação de
 2539 probióticos e ionóforo.

	%CV	
	Intra-Teste	Inter-Teste
Creatinine Kit – Método calorimétrico cinético		
(ref. K067-24.1; Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil)	<1,20	41,79
Urea Kit – Método enzimático		
(ref. K047; Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil)	<0,72	56,72
Uric Acid Kit – Método monoreagente		
(ref. K139-8.1; Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil)	<2,96	80,00

2540

2541

2542 **Tabela suplementar S6:** Variáveis urinárias e balanço de nitrogênio de novilhos recebendo
 2543 dieta com a associação de probióticos e ionóforo.

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-value		
	MO	MBT	MSB	BTSB		Tratamentos	Período	Animal
PC final	491,00	464,25	488,25	469,50	22,39	0,9887	0,9303	0,9996
Volume da urine (L/dia)	4,89	6,40	6,75	5,74	0,66	0,8615	0,7203	0,7387
Variáveis urinário (mg/dl).								
Creatinina	65,31	78,75	68,44	56,5625	7,44	0,7426	0,2112	0,4052
Ureia	1225,00	1687,50	1143,75	1343,75	182,53	0,7639	0,4764	0,3838
Ácido úrico	8,75	2,50	5,00	8,75	1,91	0,3072	0,3486	0,0231
Nitrogênio total	2350,17	1690,78	2040,75	2422,50	233,29	0,8370	0,9569	0,7805
N ureia	571,68	787,52	533,76	627,68	85,18	0,7639	0,4764	0,3838
Variáveis urinário (mg/kg de PC)								
Creatinina	6,43	11,02	9,05	6,56	1,13	0,5481	0,5966	0,7776
Ureia	123,90	233,27	163,09	158,47	25,47	0,6772	0,8408	0,7135
Ácido úrico	0,82	0,29	0,38	0,92	0,19	0,2520	0,3349	0,0205
Nitrogênio total	232,30	232,16	207,75	269,17	15,59	0,5849	0,2388	0,5565
N Ureia	57,82	108,86	76,11	73,96	11,88	0,6772	0,8408	0,7135
Balanço de nitrogênio (g/dia)								
N-Consumo	232,39 ^{ab}	230,28 ^{ab}	216,21 ^b	257,72 ^a	12,10	0,0135	<0,0001	0,0020
N-Fezes	63,00 ^b	63,96 ^{ab}	58,58 ^b	83,72 ^a	4,72	0,0200	0,4983	0,0030
N-Urina	108,96 ^{ab}	107,78 ^{ab}	99,90 ^b	123,15 ^a	6,78	0,0135	<0,0001	0,0020
N-Retido	60,44	58,55	57,73	50,86	5,32	0,4587	0,0007	0,1787

2544 ¹MO = Monensina apenas; MBT = Monensina + *B. toyonensis*; MSB = Monensina + *S. cerevisiae boulardii*;

2545 BTSB = *B. toyonensis* + *S. cerevisiae boulardii*.

2546 ²EPM= erro padrão da média.

2547 ^{a-b} Os valores dentro de uma linha com sobrescritos diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey
 2548 (Tratamento; $P < 0.05$).

2549

4. IMPLICAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a grande variedade de aditivos existentes é comum se buscar o efeito associativos pela combinação de diferentes tipos ou classes de aditivos para serem utilizados nos bovinos, com intuito de melhor ainda mais a produtividade ou reduzir os já problemas existentes na pecuária. Com base nos estudos realizados nesta tese, quando combinado o ionóforo monensina sódica com o *Bacillus toyonensis* ou mesmo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, não houve benefícios na cinética nem na produção de gás *in vitro* da silagem de milho. Também não houve efeito positivo dessas duas combinações no consumo de alimento, digestibilidade aparente, variáveis ruminais e variáveis sanguíneas dos novilhos.

Já quando associados o dos probióticos *Bacillus toyonensis* com *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, esta combinação apresentou valores semelhantes aos observados no tratamento com monensina sódica, na digestibilidade dos nutrientes, variáveis ruminais, sanguíneas, urinárias e na retenção de nitrogênio.

Com base nas observações promissoras da associação de *Bacillus toyonensis* com *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* obtidos nesta tese, são sugeridos mais estudos com esta associação de probióticos sobre os aspectos produtivos para que seja recomendado como melhorador de desempenho alternativo para os bovinos.

2569 5. ANEXOS
2570

[Journals](#) [Information](#) [Author Services](#) [Initiatives](#) [About](#)

[Sign In / Sign Up](#) [Submit](#)

Search for Articles:

[Search](#)

[Advanced](#)

Journals / Fermentation / Volume 7 / Issue 4 / 10.3390/fermentation7040298

[Submit to this Journal](#)
[Review for this Journal](#)
[Edit a Special Issue](#)

Article Menu

Article Overview

- Abstract
- Open Access and Permissions
- Share and Cite
- Article Metrics
- Author Biographies
- Order Article Reprints

Article Versions

Related Info Links

More by Authors Links

Abstract Views445

Full-Text Views525

Open Access Article

Kinetics of In Vitro Gas Production and Fitting Mathematical Models of Corn Silage

by Camila da Silva Zornitta ¹ Luis Carlos Vinhas Itavo ^{2,*} Camilla Celeste Brandão Ferreira Itavo ² Geraldo Tadeu dos Santos ² Alexandre Menezes Dias ² Gelson dos Santos Difante ² and Antonio Leandro Chaves Gurgel ¹

¹ Pos-Graduation Program in Animal Science, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil
² College of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil
* Author to whom correspondence should be addressed.

Academic Editors: Diomi Mamma and Gunnar Lidén

Fermentation **2021**, *7*(4), 298; <https://doi.org/10.3390/fermentation7040298>
Received: 28 September 2021 / **Revised:** 28 October 2021 / **Accepted:** 12 November 2021 / **Published:** 8 December 2021
(This article belongs to the Section Fermentation Process Design)

[View Full-Text](#) [Download PDF](#) [Browse Figures](#) [Citation Export](#)

Abstract

This study aimed at examining the effects of rumen inoculum of steers receiving different combinations of ionophore and probiotics in their diets on in vitro gas production of corn silage. The fitting of gas production was performed with five mathematical models and its kinetics was evaluated. Four crossbred steers (403.0 ± 75.5 kg body weight) with ruminal cannula were assigned to a 4 × 4 Latin square design. The additives used were Monensin sodium (Rumensin[®] 100, 3 g/day), *Bacillus toyonensis* (Micro-Cell Platinum[®] 10⁹, 1 g/day) and *Saccharomyces cerevisiae* *bouardii* (ProTermative[®] 20, 0.5 g/day). Additives were arranged into the following treatments, supplied daily into total mixed diet: (1) Monensin; (2) Monensin + *B. toyonensis*; (3) Monensin + *S. bouardii*; and (4) *B. toyonensis* + *S. bouardii*. The gas production data were fitted into the models of Gompertz, Groot, Ørskov, Brody, Richards, and Dual-pool Logistic. A perfect agreement between observed and predicted values in curves of accumulated in

2571
2572 Anexo I – Artigo publicado (Capítulo 1) no periódico científico Fermentation (ISSN: 2311-
2573 5637). DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040298>