

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**EFEITO DO BROMOFÓRMIO NOS PARÂMENTROS  
RUMINAIS, EMISSÃO DE METANO E DIVERSIDADE  
MICROBIANA EM BOVINOS DE CORTE**

**Karine Padilha Nunes Vieira**  
Zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**Efeito do Bromofórmio nos parâmetros ruminais,  
emissão de metano e diversidade microbiana em  
bovinos de corte**

**Karine Padilha Nunes Vieira**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis**

**Coorientadores: Prof. Dr. Luciano da Silva Cabral**

**Dra. Juliana Duarte Messana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

V658e

Vieira, Karine Padilha Nunes

Efeito do Bromofórmio nos parâmetros ruminais, emissão de metano e diversidade microbiana em bovinos de corte / Karine Padilha Nunes Vieira. -- Jaboticabal, 2024

64 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ricardo Andrade Reis

Coorientador: Luciano da Silva Cabral

1. Microbiologia. 2. Bovinos de corte. 3. Forragem. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO BROMOFÓRMIO NOS PARÂMENTROS RUMINAIS, EMISSÃO DE METANO E DIVERSIDADE MICROBIANA EM BOVINOS DE CORTE

**AUTORA: KARINE PADILHA NUNES VIEIRA**  
**ORIENTADOR: RICARDO ANDRADE REIS**  
**COORIENTADORA: JULIANA DUARTE MESSANA**  
**COORIENTADOR: LUCIANO DA SILVA CABRAL**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS (Participação Virtual)  
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente  
**RICARDO ANDRADE REIS**  
Data: 10/10/2024 18:04:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)  
Departamento Engenharia de Biossistemas / FCE UNESP Tupã



Documento assinado digitalmente  
**EDUARDO FESTOZO VICENTE**  
Data: 11/10/2024 10:12:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOANIS TILEMAHOS ZERVOUDAKIS (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Mato Grosso / Cuiabá/MT



Documento assinado digitalmente  
**JOANIS TILEMAHOS ZERVOUDAKIS**  
Data: 11/10/2024 10:49:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 10 de outubro de 2024

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**KARINE PADILHA NUNES VIEIRA** – nascida em Cuiabá, Mato Grosso, em vinte de maio de 1998, filha de Gracia Pedrosa Padilha e Carlos José Nunes Vieira. Bacharel em Zootecnia pela Faculdade de Agronomia e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) – Campus Cuiabá – MT (2022), com bolsa PRAE e de Iniciação Científica CNPq (PIBIC e PIBIT) sob Orientação do Prof. Dr. Luciano da Silva Cabral. Em 2022 iniciou o Mestrado em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis e coorientação do Prof. Dr. Luciano da Silva Cabral e Dra. Juliana Duarte Messana, com bolsa de estudos CNPq.

***“A insatisfação é a principal motivadora do progresso.”***  
*- Thomas Edison*

*Aos meus avós José Benedito Padilha  
e Maria José Bebiana de Lima Padilha,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida por me dar forças, coragem e determinação. Deus sabe de todas as coisas! Obrigada por me fortalecer até aqui

À minha mãe Gracia que sempre me apoiou nos estudos, vez do primeiro dia em Zootecnia. Me deu forças, sabedoria e amor para me tornar quem sou hoje. Deus sabe o quanto batalhou para nos criar.

Aos meus Avós José e Maria que não estão mais presentes fisicamente, dedico a vocês com todo meu amor.

Aos meus irmãos Kennedy e Wendell pela parceria e companheirismo.

Ao meu tio Sandro, Tia Rejane e meus avós Erotildes e Heronildes, muito obrigada pelo suporte!

Ao meu coorientador e grande amigo Prof. Luciano Cabral que acreditou em mim muito mais do que eu mesma, me motivou e me motiva vez a 6 anos. Sou e serei extremamente grata por tudo que fez por mim.

À equipe UNESPfor pela parceria fechada, risadas e perrengues. Em especial o meu muito obrigada a Xodó (Luana Hybiner), Parkour (Carlos Eduardo), Pocotó (Isabella Moraes), Feshow (Lucas Dias) por tornarem meus dias mais leves.

As minhas colegas de pós Geni Caetano, Mara Luna, Daniela Alvarado e Bárbara Fujioka, pelas risadas, rolês e por me aguentarem chorar as pitangas da pós.

Aos meus amigos de longa data Vinícius Patrick, Giselle Camargo, Michelle Lopes, Julyana Cristyna e Alessandra Fonseca pelo apoio incondicional durante esse período.

À equipe fera da UFMT pela amizade e por me auxiliarem no experimento *in vitro* Maria Vitória, Iago Barroso, Edjane Pereira, Emerson Miranda, Milla Lopes e Isabela Almeida. Vocês são demais!!!

À Ana Paula Sader pelos ensinamentos, auxílio nas análises e risadas no LANA.

À Juliana Messana pelo auxílio nas análises e tabulação dos dados.

Ao meu orientador Ricardo Reis, pela orientação, direcionamento, broncas e por acreditar no meu potencial.

À UNESP pela oportunidade de carregar o título de mestre em uma universidade renomada.

Aos meus gestores da TIMAC Agro, a empresa a qual faço parte. Deixo aqui minha gratidão pela empatia e generosidade por me proporcionarem o tempo necessário para que essa defesa ocorresse. Muito obrigada Bárbara Manzano, Paulo Borges Júnior e Andrea Vilalba.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa para condução desse experimento.

À empresa Rumin 8 pelo fornecimento do aditivo e confiança no trabalho do nosso grupo de pesquisa UNESPFOr.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
<b>2.1 Suplementação como estratégia de intensificação</b> .....	2
<b>2.2 DDGs</b> .....	5
<b>2.3 Emissão de metano em animais em pastejo</b> .....	8
<b>2.4 <i>Asparagopsis taxiformis</i></b> .....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
<b>3.1. Local do estudo e animais</b> .....	13
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	14
<b>4.1.1. Experimento de metabolismo</b> .....	14
<b>4.1.2. Experimento <i>in vitro</i></b> .....	19
<b>5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	21
<b>5.1. Delineamento experimental</b> .....	21
<b>5.1.1. Experimento de metabolismo</b> .....	21
<b>5.1.2. Experimento <i>in vitro</i></b> .....	21
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>6.1 Experimento <i>in vivo</i></b> .....	22
<b>6.2 Experimento <i>in vitro</i></b> .....	35
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	40

## EFEITO DO BROMOFÓRMIO NOS PARÂMETROS RUMINAIS, EMISSÃO DE METANO E DIVERSIDADE MICROBIANA EM BOVINOS DE CORTE

RESUMO - O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da UNESP (FCAV), Jaboticabal SP e no Laboratório de Nutrição Animal da UFMT (FAAZ), Cuiabá - MT. Os animais foram mantidos em piquetes formados por *Urochloa brizantha* Cv. Marandu, durante o período das águas (janeiro a abril de 2023) e durante os períodos (Janeiro a abril de 2024), os animais doadores do inóculo consumiram a mesma dieta para o fornecimento do líquido para incubação in vitro. A área experimental total utilizada foi 9 hectares, utilizando 9 animais, raça Nelore, com peso corporal médio de 516 kg, idade média de 36 meses, canulados no rúmen. Os animais foram distribuídos em modelo DQL 3 × 3 triplicado (sendo três períodos experimentais de 21 dias e 3 tratamentos: T1 - Controle (forragem + mineral), T2 - forragem + 0,3% PC de suplemento com DDGs e T3 forragem + 0,3% PC de suplemento com DDGs + Bromofórmio. Adicionalmente ao estudo de metabolismo in vivo, foi realizado um experimento in vitro com 3 incubações consecutivas, este estudo avaliou três tratamentos: T1 (forragem), T2 - (forragem + DDGs) e T3 - (forragem + DDGs + Bromofórmio) por meio de um delineamento inteiramente casualizado. O consumo de matéria seca do suplemento foi significativamente maior nos tratamentos DDGs e DDGs + Bromofórmio (1.54 e 1.53 kg/dia, respectivamente) em comparação ao mineral (0.16 kg/dia;  $p < 0.001$ ). A ingestão de proteína bruta também foi superior no DDGs e DDGs + Bromofórmio (1.32 kg/dia) do que com o mineral (1.01 kg/dia;  $p = 0.024$ ), enquanto a fibra em detergente neutro foi mais elevada no DDGs e DDGs + Bromofórmio (4.26 e 4.34 kg/dia) comparada ao mineral (3.35 kg/dia;  $p = 0.037$ ). A digestibilidade da proteína bruta e da fibra em detergente neutro foi superior nos tratamentos com os suplementos (proteína bruta: 73.48% e 71.88% vs. 65.01%;  $p < 0.001$ ; fibra em detergente neutro: 71.89% e 72.61% vs. 64.61%;  $p = 0.010$ ). Não foram observadas diferenças significativas no pH ruminal e na concentração de  $\text{NH}_3\text{-N}$  entre os tratamentos. Contudo, a proporção de ácido acético foi maior com DDGs + Bromofórmio (62.61%) em comparação ao mineral (63.48%;  $p = 0.009$ ), enquanto o propionato foi maior com DDGs (29.85%) em relação ao DDGs + Bromofórmio (27.51%;  $p = 0.031$ ). No metabolismo de nitrogênio, o consumo de nitrogênio foi maior com DDGs e DDGs + Bromofórmio (211.52 e 211.56 g/dia, respectivamente) comparado ao mineral (162.02 g/dia;  $p = 0.025$ ). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na excreção de nitrogênio urinário e fecal ou na retenção de nitrogênio. A análise da microbiota e diversidade microbiana mostrou que o número de OTUs, a riqueza (Chao1 e ACE) e a diversidade (Shannon, Simpson e Fisher) não foram significativamente alterados entre os tratamentos. No entanto, houve variações na abundância de famílias e gêneros bacterianos, destacando uma menor de *Eubacterium coprostanoligenes*group, *Bacteroidales*BS11 gutgroup *Atopobiaceae*, no grupo DDGs + Bromofórmio. Em nível de família houve redução de *Eubacterium coprostanoligenes*group ( $p=0.026$ ) *Bacteroidales*BS11gutgroup ( $p=0.018$ ) e no gênero *Methanospaera* ( $p=0.010$ ). Nos resultados in vitro o VF O tratamento com Bromofórmio (127,54 mL), produziu menos gás ( $p = 0,015$ ). Não houve diferença significativa na taxa de digestão. Os tratamentos T2 e T3 tiveram maior DIVMS24 (56,98% e 57,79%) com ( $p = 0,012$ ). Na DIVMS72h não houve diferença significativa entre os

tratamentos. Não houve diferença significativa ( $p = 0,585$ ), na digestibilidade in vitro do FDN. O tratamento DDGs proporcionou a maior concentração de amônia (12,09 mg/dL), enquanto DDGs + Bromofórmio teve a menor (10,58 mg/dL), com diferença significativa ( $p = 0,003$ ). O tratamento DDGs + Bromofórmio reduziu significativamente a produção de metano (5,80 mL), comparado aos demais tratamentos avaliados ( $p < 0,0001$ ). A inclusão do Bromofórmio não influenciou na concentração de AGVs ( $p > 0,05$ ). O uso do Bromofórmio se mostrou promissor na redução da produção de metano, o que pode contribuir para uma pecuária mais sustentável. Esses resultados são importantes para otimizar a eficiência alimentar e reduzir o impacto ambiental na produção de bovinos.

Palavras – chave: microbiologia, consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, metanogênese, forragem.

## EFFECT OF BROMOFORM ON RUMINAL PARAMETERS, METHANE EMISSION AND MICROBIAL DIVERSITY IN BEEF CATTLES

**ABSTRACT** - The experiment was conducted at the Forage Sector of UNESP (FCAV), Jaboticabal SP, and at the Animal Nutrition Laboratory of UFMT (FAAZ), Cuiabá - MT. The animals were kept in *Urochloa brizantha* Cv. Marandu paddocks during the rainy season (January to April 2023) and from January to April 2024, where the donor animals for the inoculum consumed the same diet to provide the liquid for in vitro incubation. The total experimental area used was 9 hectares, involving 9 Nelore breed animals with an average body weight of 516 kg and an average age of 36 months, rumen cannulated. The animals were distributed in a 3 × 3 DQL model (with three experimental periods of 21 days and 3 treatments: T1 - Control (pasture + mineral), T2 - pasture + 0.3% CP of DDGs supplement, and T3 - pasture + 0.3% CP of DDGs supplement + Bromofórmio). In addition to the in vivo metabolism study, an in vitro experiment with 3 consecutive incubations was carried out, evaluating three treatments: T1 (forage), T2 (forage + DDGs), and T3 (forage + DDGs + Bromofórmio) using a completely randomized design. The dry matter intake of the supplement was significantly higher for DDGs and DDGs + Bromofórmio (1.54 and 1.53 kg/day, respectively) compared to the mineral (0.16 kg/day;  $p < 0.001$ ). The crude protein intake was also higher in DDGs and DDGs + Bromofórmio (1.32 kg/day) related to the mineral (1.01 kg/day;  $p = 0.024$ ), while neutral detergent fiber was higher for DDGs and DDGs + Bromofórmio (4.26 and 4.34 kg/day) compared to the mineral (3.35 kg/day;  $p = 0.037$ ). The crude protein and neutral detergent fiber digestibility was superior for the supplements (crude protein: 73.48% and 71.88% vs. 65.01%;  $p < 0.001$ ; neutral detergent fiber: 71.89% and 72.61% vs. 64.61%;  $p = 0.010$ ). No significant differences were observed in ruminal pH and NH<sub>3</sub>-N concentration among treatments. However, the proportion of acetic acid was higher in DDGs + Bromofórmio (62.61%) compared to the mineral (63.48%;  $p = 0.009$ ), while propionate was higher in DDGs (29.85%) compared to DDGs + Bromofórmio (27.51%;  $p = 0.031$ ). For nitrogen metabolism, nitrogen intake was higher in DDGs and DDGs + Bromofórmio (211.52 and 211.56 g/day, respectively) compared to the mineral (162.02 g/day;  $p = 0.025$ ). However, no significant differences were observed in urinary and fecal nitrogen excretion or nitrogen retention. Analysis of microbiota and microbial diversity showed that the number of OTUs, richness (Chao1 and ACE), and diversity (Shannon, Simpson, and Fisher) were not significantly altered among treatments. However, variations in the abundance of bacterial families and genera were highlighted, showing a decrease in Eubacterium coprostanoligenes group, Bacteroidales BS11 gut group, and Atopobiaceae in the DDGs + Bromofórmio group. At the family level there was a reduction in Eubacterium coprostanoligenes group ( $p=0.026$ ) BacteroidalesBS1 gutgroup ( $p=0.018$ ) and in the genus *Methanosphaera* ( $p=0.010$ ). For in vitro results, the Bromofórmio treatment (127.54 mL) produced less gas ( $p = 0.015$ ). No significant difference was found for the digestion rate. Treatments T2 and T3 showed higher DIVMS24 (56.98% and 57.79%) with ( $p = 0.012$ ). For DIVMS72h, no significant difference was found among treatments.

There was no significant difference ( $p = 0.585$ ) for FDN digestibility. The DDGs treatment showed the highest ammonia concentration (12.09 mg/dL), while DDGs + Bromofórmio had the lowest (10.58 mg/dL), with a significant difference ( $p = 0.003$ ). The DDGs + Bromofórmio treatment significantly reduced methane production (5.80 mL) compared to the others treatments ( $p < 0.0001$ ). The inclusion of Bromofórmio did not influence AGV concentration ( $p > 0.05$ ). The use of Bromofórmio proved promising in reducing methane production, which may contribute to more sustainable livestock production. These results are important for optimizing feed efficiency and reducing environmental impact in beef production.

Keywords: microbiology, intake, digestibility, ruminal parameters, methanogenesis, pasture.

## CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Impacto ambiental da pecuária de corte em pastagem suplementada com aditivos anti-metano e terminação em confinamento", protocolo nº 7100/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de novembro de 2022.

Vigência do Projeto	17/11/2022 a 20/10/2024
Espécie / Linhagem	Bovinos – nelore
Nº de animais	138
Peso / Idade	280 kg / 10 meses de idade
Sexo	Machos
Origem	Produtor da região de Pedranópolis

Jaboticabal, 16 de novembro de 2022

*Fabiana Pilarski*  
Profª Drª Fabiana Pilarski  
Coordenadora – CEUA

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda do mercado interno e externo tem impulsionado a busca por tecnologias sustentáveis na bovinocultura de corte, como formas de intensificação da produção de carne no país. De acordo com o MAPA, no ano de 2024 foram exportados cerca de 2.536 milhões de carne, consolidando-se como um importante fornecedor global. Desta forma, atribui-se a produção do Brasil como uma das mais importantes para o abastecimento de carne no mundo. Contudo, devido a demanda por esse produto, a intensificação na pecuária é uma alternativa que busca suprir essa necessidade.

Os bovinos são capazes de transformar alimentos não consumidos por humanos em produtos valiosos, como carne e leite, destacando-se pelo seu valor nutricional e econômico. Dentre as estratégias de intensificação, a suplementação de animais em pastejo, atrelado à utilização de aditivos, proporciona melhorias em ganhos/ha através do complemento da demanda nutricional de bovinos tanto no período da seca quanto no período das águas, desta forma, diminuindo o período de ocupação do animal na fazenda (Reis et al., 2009).

O pasto é a base da alimentação de bovinos de corte nas regiões tropicais, pois a relação entre as exigências nutricionais e o valor nutritivo do pasto, obtém-se o desempenho animal, o qual pode ser satisfatório ou não (Zervoudakis et al., 2002). No período chuvoso do ano, é esperado que haja disponibilidade de capim com elevado valor nutritivo com altos teores de proteína e carboidratos fibrosos potencialmente digestíveis.

Em sistemas de produção a pasto, a eficiência da digestão é ainda mais relevante, uma vez que os bovinos têm acesso limitado a suplementos nutricionais em comparação com sistemas confinados. O aumento do teor de fibra na dieta contribui para o aumento do pH ruminal, bem como a produção preferencial de acetato sobre o propionato. Como consequência, os equivalentes redutores gerados durante a produção de acetato contribuem para via da metanogênese (Hungate, 1966; Janssen, 2010).

Durante o processo fermentativo dos componentes dietéticos no rúmen pela microbiota ruminal ocorre a produção de metano, que além de representar uma perda de energia da dieta, é considerando um gás de efeito estufa (GEE).

Visando a intensificação através da suplementação e redução de tempo de abate, é esperado a redução da produção do Gás de Efeito Estufa (GEE) metano. Existe a possibilidade para mitigação das emissões entéricas de metano com a utilização de aditivos alimentares que agem na microbiota ruminal, promovendo inibição direta ou indireta da metagênese, além de melhorias na qualidade da dieta (Hristov et al., 2013).

A forma mais eficaz para reduzir as emissões de metano é através da manipulação da dieta (O'Mara et al., 2008, Beauchemin et al., 2008). Neste sentido, o uso de aditivos alimentares que manipulem a microbiota ruminal e sua função tem crescido no Brasil, principalmente levando em consideração a melhoria da eficiência alimentar, bem como a menor produção do metano entérico através da inibição da metanogênese.

Essa prática pode resultar em melhorias na digestibilidade da dieta e no aproveitamento dos nutrientes, especialmente em sistemas de produção que buscam maximizar a eficiência alimentar.

Desta forma, o presente projeto foi elaborado com o objetivo de avaliar a utilização do composto Bromofórmio extraído da macroalga *Asparagopsis taxiformis*, como potencial mitigador da emissão de metano entérico, avaliando-o em ensaio metabólico e *in vitro* tendo como base uma dieta composta pela forrageira tropical *Urochloa brizantha* cv. Marandu, associada à suplementação proteica do coproduto DDGs (Grãos Secos de Destilaria).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Suplementação como estratégia de intensificação**

A pecuária de corte desempenha um papel fundamental na economia global, fornecendo uma significativa fonte de proteínas para a dieta humana. Este setor enfrenta uma série de desafios, especialmente no que diz respeito à eficiência alimentar e sustentabilidade.

O manejo eficiente das pastagens é essencial para maximizar a produção de carne e minimizar os impactos ambientais. As estratégias de manejo incluem o ajuste da taxa de lotação em função da forragem disponível, a rotação de pastagens, adubação e a escolha de espécies forrageiras adaptadas ao clima e solo da região. Casagrande et al. (2011) destacam que o correto manejo do pasto, associado a suplementação, pode aumentar a produção de forragem,

melhorar a saúde do solo e alcançar desempenho animal semelhante ou superior em comparação com o uso de grandes quantidades de suplementos em pastagens mal manejadas. Além disso, a suplementação estratégica durante períodos críticos, como na seca, é uma prática comum para manter o ganho de peso dos animais e melhorar a eficiência alimentar (De Oliveira et al., 2015).

O número de cabeças de gado por hectare, ou lotação animal, é um fator crucial que afeta diretamente a produtividade e a sustentabilidade do sistema de produção. Uma lotação adequada maximiza a produção de carne sem comprometer a saúde das pastagens. Correia (2006) sugere que uma alta pressão de pastejo pode levar à degradação das pastagens, reduzindo a disponibilidade de forragem e a capacidade de suporte do sistema. Por outro lado, uma lotação muito baixa pode resultar em subutilização dos recursos disponíveis, diminuindo a eficiência produtiva.

A qualidade do pasto é outro fator determinante na produção de bovinos a pasto. Pastagens bem manejadas e de alta qualidade fornecem os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento dos animais. Segundo Da Silva (2004), a escolha das espécies forrageiras e o manejo adequado do pasto são fundamentais para garantir uma oferta constante e nutritiva de alimento. A inclusão de leguminosas e o uso de adubação nitrogenada podem melhorar a qualidade da forragem, aumentando o teor de proteína e a digestibilidade das plantas, o que resulta em melhor desempenho animal (Detmann et al., 2014).

Um dos principais desafios dos sistemas de produção de bovinos de corte a pasto, é assegurar uma oferta constante de nutrientes durante todo o ano por meio da alimentação com forragem a fim de garantir elevado valor nutritivo. No período das chuvas, pastos submetidos a uma intensidade de pastejo mais elevada têm teores de proteína superiores, menor teor de fibra e maior digestibilidade (Reis et al., 2009).

No entanto, mesmo durante o período das águas, a forragem pode não fornecer todos os nutrientes necessários para maximizar o desempenho dos bovinos de corte. A eficiência alimentar, que mede a quantidade de alimento ingerido em relação ao ganho de peso, pode ser melhorada com a utilização de suplementos energéticos. Segundo Detmann et al. (2014), a suplementação energética em sistemas de pastejo é crucial para otimizar o uso da forragem disponível e aumentar o ganho de peso diário dos animais no período em que

há elevada disponibilidade de forragem. Esses suplementos fornecem energia adicional que, combinada com a proteína disponível na forragem, potencializa o desempenho dos bovinos.

Esse período de abundância favorece o desempenho dos animais, mas requer manejo adequado para evitar o excesso de pastejo e garantir a persistência do pasto. Com um manejo correto com auxílio da suplementação estratégica, pode maximizar a produção e a nutrição no sistema de pastejo.

A combinação de uma oferta adequada de forragem com suplementação pode ser crucial para alcançar a máxima eficiência de produção. Isso permite equilibrar o desempenho individual com a produtividade do sistema, mantendo uma taxa de lotação ideal e garantindo a persistência do pasto (Barbero et al., 2015).

Os DDGs (Grão Seco de Destilaria com Solúveis) são amplamente utilizados na nutrição de bovinos de corte como um suplemento valioso que oferece proteína e energia adicionais. Este subproduto da produção de etanol é incorporado nas dietas dos bovinos para melhorar a qualidade nutricional, especialmente quando a forragem disponível tem teores baixos de proteína.

Como fonte rica em proteína bruta (especialmente PNDR), o DDGs ajuda a complementar a dieta dos bovinos, promovendo melhores ganhos de peso e aumentando a eficiência alimentar. Estudos como o de Detmann et al. (2014) destacam a importância da suplementação para maximizar a eficiência de utilização do nitrogênio em pastagens tropicais. Mostram que a inclusão de suplementos como os DDGs pode melhorar o desempenho animal ao corrigir deficiências na dieta base de pasto, que frequentemente apresenta baixo teor proteico e desequilíbrio energético durante a estação seca. A suplementação com DDGs pode aumentar a ingestão de matéria seca e melhorar a digestibilidade da fibra, resultando em maior ganho de peso e eficiência na conversão alimentar.

Além disso, a intensificação sustentável da pecuária, como discutido por Cardoso et al. (2016), é uma estratégia para a redução das emissões de gases de efeito estufa e a melhoria da sustentabilidade ambiental da produção de carne bovina no Brasil. A utilização de DDGs como suplemento não só melhora o desempenho produtivo dos animais, mas também permite uma melhor gestão

dos recursos forrageiros, evitando a necessidade de expandir áreas de pastagem e, assim, contribuindo para a conservação ambiental.

Portanto, a integração de DDGs em sistemas de manejo de pastagens, como parte de uma estratégia mais ampla de suplementação, pode oferecer ganhos significativos em produtividade e sustentabilidade, atendendo tanto às demandas econômicas quanto ambientais da pecuária de corte no Brasil.

## **2.2 DDGs**

A produção de etanol é realizada por meio da fermentação de açúcares, quanto maior a porcentagem de açúcares, maior o rendimento de etanol (Lee J, 1997). O processo inicia-se com a recepção e preparação dos grãos, que são limpos para remover impurezas e depois moídos para facilitar a conversão do amido em açúcares fermentáveis. A moagem pode ser feita de diferentes formas, dependendo das necessidades do processo subsequente.

Existem basicamente três tipos de DDG: o DDG sem solúveis, o DDG com solúveis (DDGs), e o WDG que contém umidade. O DDG e o DDGS diferem principalmente no teor de gordura e fibra devido à presença dos solúveis no DDGS. O DDG é mais rico em proteína bruta e fibra, enquanto o DDGS oferece um maior valor energético e melhor palatabilidade devido aos solúveis adicionados. O DDGs é o mais comum e amplamente utilizado na alimentação animal, principalmente devido ao seu equilíbrio entre proteína, energia, e fibra (Kleinschmit et al., 2007). Já o WDG é um produto intermediário que retém mais umidade, facilitando o manejo e a mistura em dietas, mas sua curta vida útil limita o transporte e o armazenamento.

A variabilidade na composição do DDGs é influenciada pela tecnologia empregada na destilaria, pelo manejo dos solúveis durante a produção, e pelas diferenças na composição dos grãos utilizados. Por exemplo, a inclusão de solúveis pode aumentar o teor de enxofre no DDGS, o que requer atenção, pois quantidades elevadas de enxofre podem causar problemas de saúde em ruminantes, como polioencefalomalacia (NRC, 2016). Além disso, a variação na fibra e no teor de extrato etéreo dos DDGs influencia diretamente sua digestibilidade e o desempenho animal, sendo crucial ajustar a formulação da dieta para otimizar a eficiência alimentar (Anderson et al., 2006).

O processo de produção do DDG se inicia após a moagem. Os grãos moídos passam por uma etapa de gelatinização, onde são aquecidos com água para quebrar a estrutura do amido, tornando-o mais acessível para as enzimas. Esse processo é essencial para garantir que o amido esteja completamente disponível para a conversão em açúcares simples. Em seguida, a mistura gelatinizada é tratada com enzimas específicas ( $\alpha$ -amilase) que quebram o amido em açúcares simples como glicose e maltose.

A mistura de açúcares é transferida para um fermentador, onde leveduras, geralmente do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, são adicionadas. As leveduras fermentam os açúcares, produzindo etanol e dióxido de carbono. Esta fermentação ocorre em condições controladas de temperatura e pH para maximizar a eficiência da conversão.

Após a fermentação, a mistura que contém etanol e outros subprodutos é submetida a um processo de destilação para separar o etanol. O etanol é evaporado e condensado em um líquido concentrado, enquanto o restante, que inclui os sólidos não fermentáveis, é coletado como DDGs. O DDGs ainda contém uma quantidade significativa de umidade, então é seco em secadores rotativos ou de leito fluido, onde a umidade é reduzida a teores apropriados para facilitar o armazenamento e manuseio.

Esse coproduto, contendo aproximadamente 30% de proteína (CQBAL, 2024), é amplamente utilizado na suplementação da dieta de animais, especialmente na bovinocultura de corte. Embora já exista uma gama de estratégias de suplementação, a produção do etanol a partir do milho representa uma alternativa de produção de biocombustíveis, que contribui para redução de GEE a partir desse processo.

A composição bromatológica do DDGs pode variar em função do processo de fabricação, bem como o teor de PB. Entretanto, esse produto possui em sua maior porcentagem PNDR (Proteína Não Degradável no Rúmen), particularidade que deve ser levada em consideração na formulação de dietas.

Durante o período das águas, quando a qualidade e quantidade do pasto são elevadas, a suplementação com DDGs pode melhorar a digestibilidade da fibra e aumentar a eficiência do uso de nutrientes. Segundo Klopfenstein et al. (1987), a adição de DDGs à dieta de animais em pastejo pode resultar em maior ganho de peso diário devido ao seu alto teor proteico e energético, o que é

essencial para complementar a alta disponibilidade de forragem durante o período das águas.

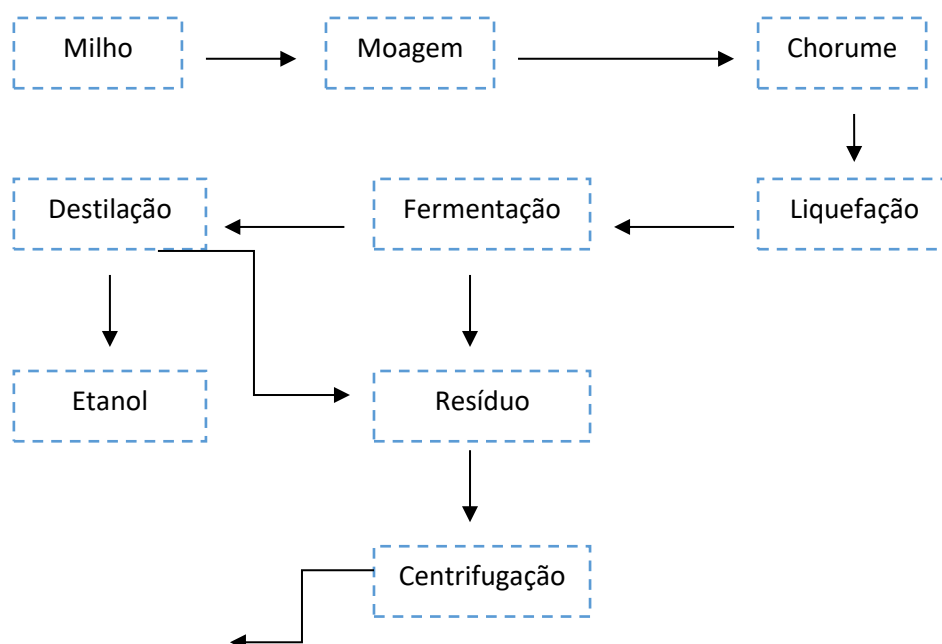
Diversos estudos demonstram que a inclusão de DDGs na dieta de bovinos pode melhorar o desempenho de crescimento e a eficiência alimentar. De acordo com Picanço et al. (2024), a suplementação com DDGs pode melhorar a conversão alimentar, o que contribui para rentabilizar o sistema como um todo.

Em regiões próximas aos centros de produção, onde o custo desse subproduto é competitivo, o DDGs é frequentemente utilizado como substituto de ingredientes tradicionais nas dietas de bovinos de corte.

Estudos conduzidos por Araújo et al. (2021) e Hoffmann (2019), analisaram a substituição de farelo de algodão por DDGs e observaram efeitos positivos na fermentação ruminal e na redução das emissões de metano. Cardoso et al. (2016) e Ruggieri et al. (2017) discutem que, além dos benefícios econômicos, a redução das emissões de metano associada ao uso de DDGs contribui para a sustentabilidade ambiental da produção de carne bovina.

Além disso, o DDGs podem fornecer uma fonte constante de nutrientes que ajuda a balancear a dieta dos animais, especialmente em sistemas onde a qualidade do pasto pode variar (Fonseca et al., 2020).

A suplementação com DDGs, portanto, otimiza o aproveitamento da dieta e potencializa o desempenho dos bovinos em pastejo, maximizando os resultados produtivos durante o período chuvoso.



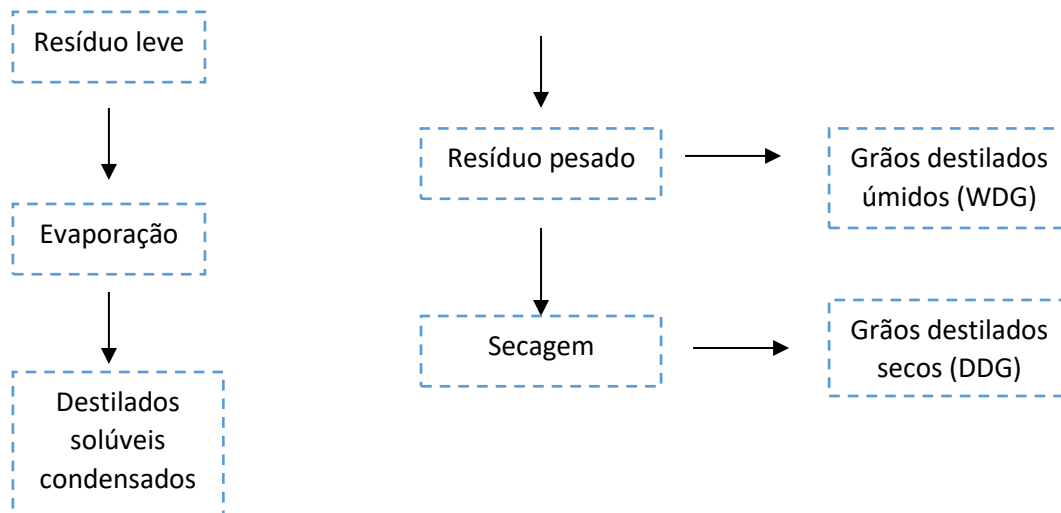


Figura 1 . Processo de obtenção do etanol e seus subprodutos. Adaptado de Rufino Junior, J. 2017.

### 2.3 Emissão de metano em animais em pastejo

A suplementação pode aumentar a eficiência alimentar dos bovinos, permitindo que eles convertam alimentos em carne e leite de maneira mais eficiente. A fermentação ruminal também está associada à produção de gases, incluindo metano, um gás de efeito estufa significativo, o que torna a compreensão e a otimização deste processo crucial para práticas mais sustentáveis.

De acordo com Word bank (2020) o metano é um gás de efeito estufa potente, com um potencial de aquecimento global (GWP) cerca de 28 vezes maior que o do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) ao longo de um período de 100 anos. Este valor de GWP reflete a capacidade do metano de reter calor na atmosfera, embora o metano tenha uma vida útil atmosférica mais curta em comparação ao  $\text{CO}_2$ , que pode permanecer por séculos.

Nos últimos anos tem surgido pautas relevantes quanto ao compromisso ambiental relacionadas às atividades humanas e seus efeitos sobre o clima. A pecuária participa em larga escala na alimentação humana, contudo, a prática também colabora na emissão dos gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera, ocasionando o agravamento do aquecimento global.

Este fenômeno é caracterizado pelo aumento da temperatura global, a qual é provável que seja elevada em cerca de  $1,5^\circ\text{C}$  entre 2030 e 2052 (IPCC,

2021), em decorrência das atividades humanas. Segundo Gerber et al. (2013) estima-se que atividade pecuária contribua com cerca de 14,5% de total dos GEE produzidos pelas emissões antrópicas, dos quais 6% são advindos da fermentação ruminal dos bovinos através do metano entérico. Desta forma, o aprimoramento dos métodos de criação de bovinos é indispensável para manutenção da atividade sustentável no país, levando em consideração os impactos ambientais envolvidos.

Existe a possibilidade para mitigação das emissões entéricas de metano com a utilização de aditivos alimentares que agem na microbiota ruminal, promovendo inibição direta ou indireta da metanogênese, além de melhorias na qualidade da dieta (Hristov et al., 2013). Outra forma de reduzir as emissões de metano é melhorar a qualidade da forragem. Suplementos que aumentam a qualidade da forragem garantem que os bovinos recebam uma dieta mais balanceada. Forragens de alta qualidade têm melhor digestibilidade, o que resulta em menor produção de metano por unidade de alimento consumido.

A fermentação do material ocorre no rúmen, onde microrganismos quebram os alimentos, produzindo ácidos graxos voláteis e outros metabólitos que são utilizados pelos bovinos para crescimento e produção. O metano é gerado no rúmen pela ação da população microbiana durante o processo digestivo da dieta consumida pelos ruminantes (Johnson e Johnson, 1995).

Durante a digestão dos polímeros da dieta, especialmente dos carboidratos fibrosos, ocorre a fermentação dos seus açúcares constituintes, como a glicose, pela população microbiana (bactérias, protozoários e fungos), resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), notadamente acetato, propionato e butirato, além de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (Moss et al., 2000). A população de *Archaea metanogênicas*, então, reduz o  $\text{CO}_2$  a metano, utilizando a energia do  $\text{H}_2$  para seu crescimento (Hook et al., 2010).

Para a produção do gás metano no rúmen pelas *Archaea metanogênicas*, é necessário que ocorra a produção de  $\text{H}_2$  pelos microrganismos que degradam a matéria orgânica da dieta. Portanto, a maioria das estratégias de controle da produção de  $\text{CH}_4$  tem se concentrado em reduzir a produção de  $\text{H}_2$ . Como a produção de acetato no rúmen gera mais  $\text{H}_2$  do que a produção de propionato, várias estratégias para controlar a produção de metano envolvem a redução da produção de acetato e o aumento da produção de propionato no ambiente

ruminal (Martin et al., 2010). Assim, o redirecionamento do uso do  $H_2$  para outros fins, a redução de acetato, bem como a inibição direta dos microrganismos metanogênicos, tem sido avaliados com o objetivo de mitigar a produção de metano entérico (Tseten et al., 2022).

Em dietas de alto teor de fibra, o principal AGCC produzido é o acetato, que por produzir maiores quantidades de  $CO_2$  e  $H_2$  e, portanto, maiores quantidades de metano são produzidas por mol de glicose fermentada. Ao passo que em dietas com alto teor de concentrado ocorre redução da proporção de acetato, como consequência da produção de propionato, ocorre redução da produção de metano (Russell et al., 2001).

Seguindo este raciocínio, em dietas com maior porcentagem de fibra, principalmente de baixa qualidade, é esperado que a produção de  $CH_4$  seja maior. Do ponto de vista nutricional, a produção de metano de acordo com Beauchemin et al. (2006), representa de 2 a 12% da energia bruta, porém, a produção de metano é necessária para o equilíbrio do ecossistema ruminal, uma vez que evita que ocorra aumento da concentração de  $H_2$  neste ambiente. O redirecionamento das moléculas de carbono e  $H_2$  em compostos aproveitáveis pelo animal (AGCC ou massa microbiana), pode resultar em maior desempenho, tornando uma prática mais econômica e sustentável.

O aumento do teor de fibra adequado contribui para equilíbrio do pH ruminal, bem como a produção preferencial de acetato sobre o propionato. Como consequência, os equivalentes redutores gerados durante a produção de acetato contribuem para via da metanogênese (Hungate, 1966; Janssen, 2010). Essa abordagem é particularmente relevante para sistemas de produção a pasto, onde a otimização das dietas e a redução das emissões são cruciais para a sustentabilidade (Sun et al., 2023).

Segundo Beauchemin et al. (2008), a forma mais eficaz para reduzir as emissões de metano é através da manipulação da dieta. Várias estratégias de mitigação de  $CH_4$  no rúmen se baseiam na modulação da fermentação ruminal, através da redução da produção de acetato e aumento da produção de propionato por mol de glicose fermentada, consumo de  $H_2$  ( $NO_3^-$ , biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados, acetogênese redutiva) e na inibição direta dos microrganismos metanogênicos (compostos secundários de plantas, 3-nitroxioxiopropanol, Bromofórmio).

As seguintes tecnologias têm sido avaliadas para controlar a metanogênese: 1) melhoria do valor nutritivo da forragem (menos FDN, mais FDN potencialmente digestível); 2) suplementação com concentrados; 3) uso de ionóforos; 4) compostos secundários de plantas (óleos essenciais, taninos, saponinas); 5) defaunação; 6) inibidores químicos (3-nitroxioxiopropanol); 7) seleção de animais com baixa emissão; 8) Algas marinhas (*Asparagopsis taxiformis*).

A compreensão de como esses aditivos interagem com a microbiota ruminal e afetam a digestibilidade e fermentação é vital para melhorar a sustentabilidade e a eficiência dos sistemas de produção de carne bovina a pasto.

#### **2.4 *Asparagopsis taxiformis***

Rouvière e Wolfe (1988) sugeriram que a formação de metano a partir de  $H_2$  e  $CO_2$  por archeas metanogênicas poderia ser um processo cíclico. Evidências indiretas indicaram que o primeiro passo, a redução do  $CO_2$  a formilmetanofurano, estava de alguma forma acoplado à última etapa, a redução do heterodissulfeto (CoM-S-S-CoB) a coenzima M (CoM-SH) e coenzima B (CoB-SH). Apenas mais de duas décadas depois, em 2011, o mecanismo de acoplamento foi elucidado: através da bifurcação eletrônica baseada em flavina, a redução de CoM-S-S-CoB com  $H_2$  fornece a ferredoxina reduzida (Figura 2) que é necessária para a redução do  $CO_2$  a formilmetanofurano.

De acordo com Glasson et al, (2022), os compostos halogenados presentes em algas marinhas podem reduzir a emissão de  $CH_4$  em ruminantes ao inibir a atividade da coenzima M metiltransferase e da metil-coenzima M redutase (MCR), enzimas essenciais para a formação de  $CH_4$  no rúmen .

A incorporação de algas marinhas (macroalgas) como um aditivo alimentar mitigador de metano tem sido investigada e tem ganhado interesse de pesquisa nos últimos anos (Machado et al., 2017; Roque et al., 2021; Glasson et al., 2022; Wanapat et al., 2024) Diversas estratégias têm sido pesquisadas para reduzir essas emissões, e a *Asparagopsis taxiformis* (AT) tem ganhado destaque devido ao seu potente efeito antimicrobiano no rúmen (Wasson et al., 2023; Kinley et al., 2020). Metabólitos secundários halogenados e biologicamente

ativos desempenham um papel crucial na redução do CH<sub>4</sub> induzida por *Asparagopsis* (Abbott et al., 2020).

A *Asparagopsis taxiformis* (AT) é uma alga vermelha rica em bromofórmio (CHBr<sub>3</sub>), um composto halogenado que interfere diretamente no metabolismo das archeas metanogênicas, inibindo a metanogênese. O bromoformo age bloqueando a enzima responsável pela redução do dióxido de carbono em metano, reduzindo, assim, a produção desse gás (Wasson et al., 2023; Machado et al., 2016).

Kinley et al. (2020) observaram que pequenas inclusões de AT (cerca de 0,2% da matéria seca total da dieta) podem reduzir as emissões de metano em até 80% em experimentos *in vivo*.

Pesquisas iniciais utilizando sistemas *in vitro* mostraram reduções impressionantes de metano. Roque et al. (2021) reportaram diminuição de até 80% nas emissões de metano em culturas ruminais com a inclusão de AT. Esses estudos fornecem uma base sólida para a aplicação prática da alga em sistemas de produção animal.

Em experimentos com bovinos de corte a pasto, McGurrin et al. (2023) relataram redução de 60-80% nas emissões de metano, sem comprometimento significativo na digestibilidade dos nutrientes ou no desempenho animal. Outro estudo de Kinley et al. (2020) confirmaram esses resultados em sistemas de produção intensiva, sugerindo que a inclusão de AT não afeta adversamente o consumo de forragem ou a eficiência alimentar.

Além de reduzir as emissões de metano, a AT tem demonstrado impactos mínimos na digestibilidade de outros nutrientes. Em estudos realizados por Roque et al. (2021), não houve mudanças significativas na produção de ácidos graxos voláteis, o que sugere que a fermentação ruminal necessária para a absorção de nutrientes continua eficiente, mesmo com a presença de bromoformo.

Adicionalmente, a alga pode ter um efeito estabilizador na microbiota ruminal, promovendo o crescimento de bactérias benéficas em detrimento das archeas metanogênicas, como observado por Wasson et al., 2023. Isso pode resultar em um perfil microbiano mais eficiente, melhorando o metabolismo energético dos ruminantes.

Estudos indicam que a inclusão de AT não prejudica a ingestão de matéria seca e pode, em alguns casos, melhorar a eficiência alimentar, como relatado por Kinley et al. (2020). Esse efeito é particularmente relevante para sistemas de produção a pasto, onde o controle da ingestão e digestão é crucial para maximizar o ganho de peso dos animais.

A redução das emissões de metano pela inclusão de AT pode contribuir significativamente para mitigar o aquecimento global. Se amplamente adotada, estima-se que essa estratégia possa reduzir de maneira eficaz as emissões da pecuária, que hoje representam cerca de 14,5% das emissões globais de gases de efeito estufa, segundo a FAO (2021).

A AT emerge como uma solução inovadora e eficaz para reduzir as emissões de metano na pecuária de bovinos de corte a pasto. Os estudos até agora sugerem que, com uma inclusão mínima na dieta, é possível reduzir drasticamente as emissões sem comprometer a saúde ou o desempenho animal. No entanto, é necessário que mais pesquisas sejam realizadas, especialmente em escalas comerciais, para garantir a viabilidade de sua utilização global.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Local do estudo e animais**

O experimento foi conduzido em duas etapas, em que o primeiro estudo foi desenvolvido no setor de Forragicultura da UNESP (Jaboticabal, SP), onde 9 animais da raça Nelore, peso corporal médio de 516 kg, canulados no rúmen, foram utilizados em um estudo de metabolismo e microbiologia ruminal, no período de janeiro a abril de 2023. A área experimental consiste em 10 hectares, subdivida em 9 piquetes de 1 ha cada e 1 piquete (1 ha) de área de reserva. Todos os piquetes providos de cocho com 40 cm lineares por animal e bebedouro com área formada uniformemente por *Urochloa brizantha* cv. Marandu.

O segundo estudo (*in vitro*) foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da UFMT (Cuiabá, MT), sendo realizado no período de Janeiro a abril de 2024. Para obtenção do inóculo foram utilizados dois bovinos mestiços com peso corporal médio de 480 kg consumindo 0,3% do PV de DDGs. Os tratamentos avaliados foram: T1 - Controle (forragem), T2 – (forragem + 0,3% PC de DDGs), T3 – (forragem + 0,3% PC de DDGs e Bromofórmio).

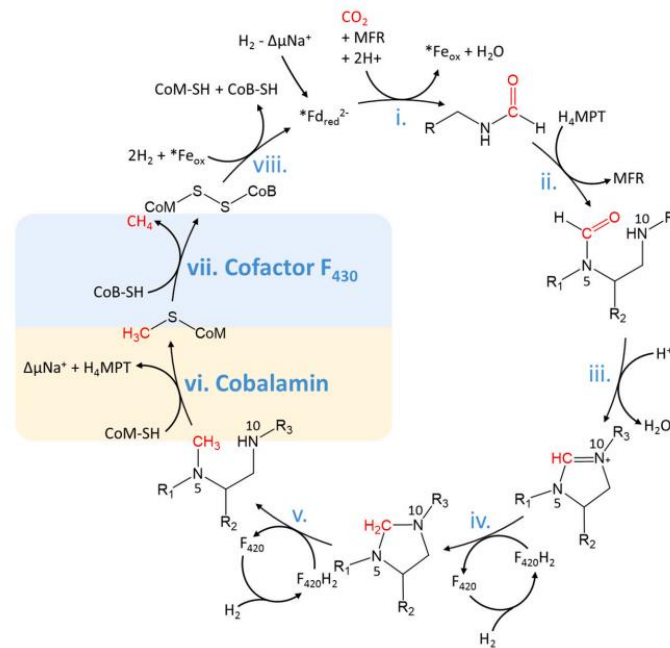


Figura 2. Ciclo de Wolf (Glasson et al., 2022).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1.1. Experimento de metabolismo

No início do experimento, os animais foram submetidos a jejum total de 16h, em seguida foram pesados para determinação do PC inicial. Em seguida, foram submetidos ao tratamento de endo e ectoparasitas, por meio da aplicação de Ivermectina (200 µg/kg PC).

O pasto foi adubado com três aplicações de 50 kg de uréia por ha, e o manejo foi realizado por meio de lotação contínua com taxa de lotação variável, seguindo a técnica de *put and take* (Mott e Lucas, 1952), de modo a manter altura média de 25 cm e uma eficiência de utilização pelos animais de 50%, pelo uso de animais reguladores quando necessário. A relação altura/massa de forragem foi avaliada semanalmente para estimar a massa de forragem por meio da avaliação de 80 pontos aleatórios de cada piquete com uma régua graduada (Barthram, 1985). A avaliação da massa de forragem e componentes morfológicos foi realizada a cada 28 dias, por meio do corte e coleta de quatro amostras de forragem por piquete, em pontos representativos da altura média do dossel realizada após a avaliação de altura dos 80 pontos. A forragem foi cortada rente ao solo em área delimitada por moldura circular de 0,25 m<sup>2</sup>. As

amostras foram pesadas, e posteriormente, obtidas duas sub-amostras. Uma sub-amostra foi utilizada para a determinação da composição morfológica, separadas manualmente em material senescente (lâmina foliar seca e colmo seco + bainha), lâmina foliar verde e colmo verde + bainha. A segunda sub-amostra foi utilizada para obtenção da estimativa da disponibilidade de MS total de forragem de cada piquete. As amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas, as amostras foram moídas em moinho Willey com peneira de 1 mm e posteriormente submetidas à análise química.

A oferta de forragem (OF) foi calculada a partir da massa de forragem e da carga animal em cada piquete. A oferta de forragem de folhas (kg de lâmina foliar verde) e OF verde (kg de colmo verde + lâmina foliar verde) foram estimadas com base da MS destes componentes por kg de PC. A densidade de forragem foi obtida pela razão entre MST e a altura média do dossel forrageiro

Foram avaliados os efeitos da inclusão ou não de DDG sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, parâmetros de fermentação ruminal (pH, N-NH<sub>3</sub>, ácidos graxos de cadeia curta), diversidade microbológica ruminal e eficiência de retenção de N em três períodos de 21 dias. Cada período foi composto por 14 d para adaptação ao suplemento e 7 d para amostragem.

O consumo e a digestibilidade dos nutrientes foram estimados por meio de indicadores externos e internos. A produção fecal foi estimada utilizando óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como indicador externo, que foi fornecido aos animais como cápsula (8g por animal por dia) introduzida diretamente no rúmen às 10:00 por 10 dias consecutivos. Posteriormente, as amostras fecais foram coletadas, nos últimos 3 dias do período às 07:00 e 15:00, 09:00 e 16:00 e 10:00 e 17:00 h, no primeiro, segundo e terceiro dia de coleta de amostra, respectivamente.

A ingestão de MS de suplemento individual foi estimada usando o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) como indicador externo (Titgemeyer et al., 2001). O TiO<sub>2</sub> (10 g por animal por dia) foi misturado com os suplementos e ofertado aos animais imediatamente antes do horário de alimentação do concentrado durante os últimos 10 dias de cada período experimental. Amostras fecais foram coletadas nos últimos três dias do período de dosagem de TiO<sub>2</sub> e processadas conforme descrito anteriormente para Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Nos horários de amostragem, os animais foram transferidos para uma instalação de manejo e as amostras foram coletadas com os animais contidos

no curral. Após as coletas, os animais foram conduzidos para os piquetes onde tiveram livre acesso ao suplemento e pasto. As amostras fecais foram secas a 55 °C por 72 h estufa com ventilação de ar forçado, moídas (Wiley mill; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) uma parte através de uma peneira de 1 mm e outra em peneira de 2mm (determinar FDNi). A concentração de cromo nas amostras fecais foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (método INCT-CA M-007/1; Detmann et al., 2012). A concentração de titânio nas amostras fecais foi determinada de acordo com um método colorimétrico (método INCT-CA M-007/1; Detmann et al., 2012).

O consumo de MS (total) da forragem foi estimado utilizando-se a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno. Para estimar a concentração de FDNi, as amostras de fezes, suplementos e forragem (a partir de simulação manual de pastejo) foram secas a 55 °C por 72 h sob ar forçado e moídas para passar por uma peneira de tela de 2 mm em um moinho Wiley (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA). Em seguida, as amostras foram pesadas, colocadas em sacos ANKOM (Filter bag F57; ANKOM Technology Corporation) e incubadas no rúmen de animais Nelore canulados por 288 h (Valente et al., 2011). A concentração de FDN dos sacos foi determinada pelo Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Technology, Fairport, NY, EUA) e o CMS (Consumo de Matéria Seca) foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{CMS} = ((\text{PF} \times [\text{iMF}] - \text{CMSS} \times [\text{iMS}])) / [\text{iMH}]$$

onde: PF = produção fecal (estimativa usando Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); CMSS = CMS do suplemento; e iMF, iMS e iMH são concentrações de marcador interno nas fezes, suplemento e forragem, respectivamente. O consumo total de MS foi obtido pela soma do consumo de volumoso e suplemento.

A digestibilidade total aparente do trato total das dietas foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Digestibilidade (\%)} = ([\text{CMS ou NI} - \text{MSe ou Ne}] / \text{CMS ou NI}) \times 100$$

onde: CMS = ingestão de matéria seca ou IN = ingestão de nutrientes (g/d); MSe = excreção de matéria seca ou Ne = excreção de nutrientes (g/d).

Amostras “spot” de urina foram coletadas nos últimos três dias de cada período experimental às 16:00, 12:00 e 15:00 no primeiro, segundo e terceiro dia de coleta de amostra, respectivamente. Essas amostras foram filtradas através de três camadas de gaze e duas subamostras foram coletadas, uma de 50 mL

foi armazenada sem diluição para avaliação da concentração de creatinina, enquanto a outra subamostra de 10 mL foi diluída com 40 mL de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,036 N) para evitar a perda de N e armazenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até análise posterior do metabolismo de N.

Amostras de líquido ruminal foram coletadas no último dia de cada período experimental às 0, 3, 6, 9 e 12 h após a suplementação, através de cânula ruminal e filtradas através de duas camadas de gaze. O pH ruminal foi medido imediatamente usando um pHmetro digital (Quimis, Q400AS, Diadema, SP, Brasil) e, na sequência, 2 subamostras (40 mL cada) foram coletadas e armazenadas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior análise da concentração de AGCC e  $\text{NH}_3\text{-N}$ .

As amostras ruminais foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas a 13.000g por 30 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante foi coletado. A concentração de  $\text{N-NH}_3$  ruminal foi determinada por destilação com 2 M KOH em um procedimento de micro-Kjeldahl de acordo com Fenner (1965). A concentração de AGCC foi determinada por cromatografia gasosa (GCMS QP 2010, Shimatzu®, Kyoto, Japão) equipada com uma coluna capilar (Stabilwax ; 30 m, 0,32 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ , Restek®, Bellefonte, EUA) de acordo com Palmquist e Conrado (1971).

A concentração de creatinina nas amostras de urina foi determinada por método colorimétrico, utilizando os kits comerciais Analyze®. O volume urinário diário foi calculado com base na relação entre a excreção diária de creatinina e o PC, e sua concentração nas amostras, segundo Costa e Silva et al. (2012).

Antes da análise, as amostras de urina foram descongeladas à temperatura ambiente e utilizadas para analisar a concentração de nitrogênio total pelo procedimento de Kjeldahl (984,13; AOAC, 1995), creatinina pelo método enzimático usando kit comercial (# 127, Labtest®, Diagnostica SA, MG, Brasil), ácido úrico pelo método colorimétrico-enzimático com kit comercial (# 140, Labtest®, Diagnostica SA, MG, Brasil), e alantoína conforme método descrito por Chen e Gomes (1992).

Absorção de derivados de purina (alantoína + ácido úrico) foi calculada de acordo com Verbic et al. (1990). O nitrogênio microbiano ruminal (N-microbiano) foi calculado em função dos derivados de purinas absorvidos seguindo a equação descrita por Chen e Gomes (1992).

No dia 21 de cada período experimental, amostras de conteúdo ruminal (aproximadamente 60 g de uma mistura de líquido e sólido) foram coletadas antes da alimentação matinal e imediatamente processadas para obtenção de um pellet bacteriano conforme descrito por Granja-Salcedo et al. (2017). Um kit Fast DNA SPIN para extração (MP Bio, Biomedicals, Illkirch, França) foi usado para extrair DNA metagenômico de 250 mg de pellet bacteriano de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram preparadas em duplicatas a partir da amplificação por PCR das regiões V3 e V4 do gene de RNA ribossômico 16S (16S rRNA) para bactérias usando os primers universais 515F (5-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3) e 806R (5-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3) conforme descrito por Caporaso et al (2011). Os fragmentos de PCR foram purificados usando o kit Zymoclean Gel DNA Recovery, seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado usando o sequenciador da Illumina MiSeq (Illumina, Inc., NY, EUA) com o kit MiSeq Reagent v2 (2 x 250 bp).

Os dados sequenciados foram processados e os adaptadores foram removidos usando Scythe 0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) e Cutadapt 1.7.1 (Martin 2011). O corte de sequência foi realizado selecionando sequências acima de 200 bp de comprimento com uma pontuação de qualidade média maior que 20 com base na qualidade Phred, e as leituras duplicadas foram removidas usando o programa Prinseq (Schmieder e Edwards, 2011). Usamos o pacote de software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) versão 1.9.1 para filtrar leituras e determinar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) conforme descrito por Caporaso et al, 2010. O algoritmo Usearch usará para agrupar as OTUs de leituras com 97% cutoff, e para atribuir taxonomia, foi utilizado o Ribosomal Database Project (RDPII) versão 10 (Cole et al., 2014).

Tabela 1. Ingredientes proporção e composição química da forragem e suplementos.

Item	Mineral	DDGs	DDGs+bromofórmio	Foragem
<i>Composição dos ingredientes, %</i>				
Sal mineral	100.00	10.00	9.82	-
DDGs	0.00	90.00	88.41	-
Bromoformio	0.00	0.00	1.77	-

*Composição química, %*

Matéria seca	90.00	89.24	89.24	25,00
Matéria orgânica	-	94.30	94.30	91.98
Proteína bruta	-	33.22	33.22	17.28
Fibra em detergente neutro	-	48.89	48.89	58.54
Nutrientes digestíveis totais	-	71.79	71.59	66.20

**4.1.2. Experimento *in vitro***

Os parâmetros analisados foram: Produção de gás (kd e kp); Produção de metano; Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS); Digestibilidade *in vitro* do FDN (DIVFDN); Digestibilidade *in vitro* da MO (DIVMO); Parâmetros cinéticos de digestão do FDN; Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>); Microbiota ruminal; Composição dos ingredientes da dieta. Desta forma, foram destinados 8 frascos para cada tratamento, sendo 4 para DIVMS em 24hrs e 4 para DIVMS em 72hrs, totalizando 16 frascos. As incubações foram repetidas três vezes sequencialmente.

Amostras de capim *Urochloa brizantha* cv. Marandu oriundas do experimento de metabolismo obtidas por simulação manual do pastejo foram utilizadas para dar origem à uma amostra composta, representativa da forragem colhida pelos animais na época das águas. Essa amostra composta foi usada como volumoso no estudo *in vitro*.

No sentido de extrapolar os dados do ensaio *in vitro* para condição de campo similar à proporcionada no estudo de metabolismo, foi considerado como referência um bovino de 300 kg de PC, consumindo 2,5% de MS do PC/dia, o que equivale a 7,5 kg de MS/dia, dos quais 0,3% foram representados pelo DDGs, portanto, a forragem representou 2,2% do PC. Deste modo, a dieta a ser incubada seria representada por 12% de suplemento e 88% de forragem (capim Marandu). Desta forma, os frascos de incubação foram pesados 500 mg de substrato, dos quais 440 mg de amostra de capim Marandu e 60 mg de suplemento DDG e para o tratamento controle 500 mg de forragem.

Os tratamentos experimentais consistiram em diferentes combinações dos aditivos no suplemento, caracterizando os seguintes tratamentos: controle (forragem), T2 (forragem + DDGs) e T3 (forragem + DDGs + Bromofórmio) por meio de um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Após pesados os tratamentos nos frascos tipo âmbar de 100 mL, em quadruplicata, foram adicionados 40 mL de solução tampão de McDougall (McDougall, 1948) previamente reduzida com aspersão de CO<sub>2</sub> e solução redutora (HCl - cisteína e sulfeto de sódio) e 10 mL de inóculo ruminal. Em seguida, os frascos foram tampados e lacrados e mantidos a 39° C em banho-maria com agitação orbital.

Três rodadas de incubação foram realizadas, foram mensuradas em cada rodada a degradabilidade, produção de gás, ao longo dos tempos de leitura, os resíduos de matéria seca e matéria orgânica, a concentração de amônia e ácidos graxos de cadeia curta no líquido e metano.

A mensuração dos gases acumulados nos frascos de incubação foi realizada através de um sistema semi-automatizado com transdutor de pressão nos seguintes tempos de leitura: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 e 72 horas após a inoculação dos frascos.

Para a determinação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS), concentração Metano, N-NH<sub>3</sub> e produção de AGCC, ao final da incubação (24 horas), os frascos foram retirados do banho-maria, filtrados e lavados em cadinho filtrante nº 2, acoplado a bomba de vácuo, para obtenção do resíduo não digerido pela microbiota ruminal. Após, os resíduos foram secos em estufa a 105°C por 12 horas e, na sequência, pesados para obtenção da DIVMS, sendo adiante incinerados em mufla, para quantificação das cinzas e, na sequência, quantificação da digestibilidade *in vitro* da MO.

Para a determinação da concentração de N-NH<sub>3</sub> e AGCC nos frascos de incubação, após a incubação, no momento da filtragem das amostras nos cadinhos filtrantes, cerca de 10 mL de líquido ruminal foram coletados de cada frasco e acondicionados em tubos falcon de 15 mL, sendo imediatamente mantidos a -20°C. A concentração de N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal foi determinada por método colorimétrico (Chaney & Marbach, 1962), enquanto os AGCC foram determinados por cromatografia gasosa. A concentração de metano nos frascos foi coletado utilizando uma seringa e posteriormente injetado no cromatógrafo gasoso.

A FDN residual foi quantificada ao fim da incubação de 72 hr incubação, no sentido de estimar os parâmetros cinéticos da digestão da FDN, de acordo com Grant e Mertens (1992), permitindo estimar a FDN potencialmente

digestível, a taxa de digestão da FDN, a latência discreta e a FDN indigestível. A FDN residual em cada frasco foi analisado de acordo com Pell e Schofield (1993).

Foi realizado análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutra (FDN), extrato etéreo (EE) para determinação da composição bromatológica dos alimentos utilizados.

## 5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 5.1. Delineamento experimental

#### 5.1.1. Experimento de metabolismo

O estudo foi desenvolvido através de um delineamento experimental em quadrado latino 3 × 3 triplicado utilizando nove animais da raça Nelore, canulados no rúmen, por meio de três períodos experimentais de 21 dias. Os tratamentos avaliados foram: T1 - Controle (forragem + mineral), T2 – (forragem + 0,3% PC de DDGs), T3 – (forragem + 0,3% PC de DDGs e Bromofórmio).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2). Atendendo-se a pressuposição de normalidade do resíduo pelo teste Cramér-von Mises, foi realizado a análise de variância. Efeitos foram declarados significativos quando  $P < 0,05$ . Quando a ANOVA for significativa para os tratamentos suplementos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados de metabolismo foram analisados através do software Proc Mixed SAS utilizando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = m + Q_i + T_j + P_k + A(i)l + QT_{ij} + e_{ijkl}$$

$m$  = constante geral;  $Q_i$  = efeito referente ao quadrado latino  $i$ ;  $T_j$  = efeito referente ao tratamento ou à dieta  $j$ ;  $P_k$  = efeito referente à linha ou ao período  $k$ ;  $A(i)l$  = efeito de coluna ou animal  $l$ , aninhado ao quadrado latino  $i$ ;  $QT_{ij}$  = efeito da interação quadrado latino  $i$  × tratamento  $j$ ;  $e_{ijkl}$  = erro aleatório, pressuposto erro normalmente e independentemente distribuído (NID).

#### 5.1.2. Experimento *in vitro*

Para o estudo *in vitro*, foram realizados três tratamento sendo: T1 (forragem), T2 (forragem + DDGs) e T3 (Forragem, DDGs e Bromofórmio) por meio de um delineamento inteiramente casualizado.

Os parâmetros cinéticos da produção de gás *in vitro* foram estimados de acordo com Schofield et al. (1994), por meio do procedimento NLIN do SAS (SAS Studio), utilizando o modelo de Gompertz, do qual foram estimados os seguintes parâmetros:  $V_f$ ,  $K_1$  e lag, em que  $V_f$  representa o volume de gás assintótico,  $K_1$  é a taxa de produção de gás que é proporcional à taxa de digestão e lag é a latência. Os parâmetros cinéticos da digestão da FDN foram estimados por meio do modelo de Mertens e Loften (1980), o qual foi ajustado aos perfis de resíduos de FDN ao longo do tempo por meio do NLIN do SAS (SAS Studio).

## **6.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Experimento *in vivo***

A suplementação tanto com DDGs como DDGs + Bromofórmio não influenciou significativamente o consumo total de MS ( $P=0.876$ ), isso é coerente com estudos anteriores, como o de Anderson et al. (2006) e Kinley et al. (2020) que também observaram uma manutenção do consumo de MS com a inclusão de DDGs e bromofórmio na dieta na dieta de vacas leiteiras e bovinos de corte, sugerindo que o DDGs pode substituir ingredientes tradicionais sem reduzir o consumo total de MS. Conforme os resultados de Kinley et al. (2020) esses dados também garantem a ausência de adstringência da inclusão do Bromofórmio na dieta, podendo afirmar que na dosagem utilizada, esse composto não influencia na palatabilidade da dieta.

O aumento significativo no consumo de MS suplemento e proteína bruta ( $P<0.001$  e  $P=0.024$ , respectivamente) com DDG e DDG + Bromofórmio está de acordo com a literatura, onde o DDG é conhecido por ser uma fonte rica em proteína e energia. De acordo com Costa et al. (2018), DDGs são ricos em proteína e energia, o que pode explicar o maior consumo de proteína bruta observado nos animais suplementados com DDGs em comparação com aqueles que receberam apenas suplemento mineral. Isso se alinha com os dados da tabela, onde o consumo de proteína bruta foi significativamente maior nos tratamentos com inclusão do DDGs.

O consumo de fibra foi significativamente maior nos grupos suplementados com DDGs e DDGs+Rumin8 (4.26 kg/dia e 4.34 kg/dia, respectivamente) em comparação ao grupo mineral (3.35 kg/dia), com  $P = 0.037$ , sugerindo que a inclusão de DDGs também aumenta a ingestão de fibra.

Geron et al. (2017) demonstraram que a inclusão de DDGs em dietas de ruminantes melhora a digestibilidade da dieta e contribui para o incremento da absorção de proteína metabolizável (PM) devido à sua composição rica em PNDR (proteína não degradável no rúmen), que é eficientemente utilizada no intestino delgado. Esse efeito está refletido nos dados da tabela, onde a digestibilidade da proteína bruta foi significativamente maior nos animais suplementados com DDGs.

Além disso, Werle (2018) destaca que a alta palatabilidade e densidade nutricional dos DDGs podem estimular o consumo de suplemento, o que foi observado no aumento significativo do consumo de MS do suplemento nos animais que receberam DDGs.

Esses resultados sugerem que os DDGs podem melhorar a eficiência nutricional em bovinos de corte a pasto, especialmente em termos de aproveitamento da proteína e da fibra. No entanto, não houve impacto significativo na digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica, o que sugere que os principais benefícios dos DDGs estão relacionados à digestibilidade de componentes específicos da dieta ou até mesmo o nível de inclusão adotado nesse trabalho.

Estudos como o de Hoffmann (2019) também indicam que o uso de DDGs na suplementação de bovinos aumenta a digestibilidade da proteína e da FDN, especialmente em dietas à base de forragem. Isso é corroborado pelos resultados apresentados na tabela 02, cuja análise mostra aumento na digestibilidade da FDN e da proteína bruta nos grupos que receberam DDGs.

A adição do bromofórmio, conhecida por mitigar a emissão de metano em ruminantes (Machado et al., 2017), não alterou significativamente a digestibilidade dos nutrientes em comparação ao DDGs isolado. Isso está de acordo com estudos como o de Glasson et al. (2022); Kinley et al. (2020) que observaram que a inclusão de bromofórmio pode reduzir a produção de metano sem efeitos adversos significativos na digestão de nutrientes.

Portanto, os dados da tabela confirmam os efeitos positivos da suplementação com DDGs observados na literatura, especialmente no que se refere à melhora na digestibilidade da proteína e da fibra, e ao aumento no consumo de nutrientes como a proteína bruta.

**Tabela 2.** Efeitos da suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio sobre o consumo e a digestibilidade da dieta de bovinos de corte.

<i>Consumo, kg/dia</i>	Suplementos			EPM <sup>1</sup>	P-valor
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio		
Matéria seca (MS)	5.84	6.07	6.18	0.302	0.876
MS Forragem	5.68	4.53	4.65	0.312	0.198
MS Suplemento	0.16 <sup>b</sup>	1.54 <sup>a</sup>	1.53 <sup>a</sup>	0.128	<0.001
Matéria orgânica	5.23	5.62	5.73	0.281	0.705
Proteína bruta	1.01 <sup>b</sup>	1.32 <sup>a</sup>	1.32 <sup>a</sup>	0.061	0.024
Extrato etéreo	0.12	0.15	0.15	0.008	0.147
Fibra em detergente neutro	3.35 <sup>b</sup>	4.26 <sup>a</sup>	4.34 <sup>a</sup>	0.186	0.037
<b><i>Digestibilidade, %</i></b>					
Matéria seca	61.34	63.00	60.77	1.027	0.438
Matéria orgânica	65.03	67.93	65.79	0.968	0.224
Extrato etéreo	-3.41	16.46	8.99	4.696	0.208
Proteína bruta	65.01 <sup>b</sup>	73.48 <sup>a</sup>	71.88 <sup>a</sup>	1.017	<0.001
Fibra em detergente neutro	64.61 <sup>b</sup>	71.89 <sup>a</sup>	72.61 <sup>a</sup>	1.403	0.010

Dados de (n = 9). EPM = erro padrão da média.

A análise dos dados dos parâmetros ruminiais (Tabela 3) indicam que o pH dos bovinos suplementados com DDGs e DDGs + Bromofórmio não apresentou variação significativa em relação ao grupo controle sugerindo que o tipo de suplemento não influenciou na queda de pH do rúmen. De forma substancial. Leite (2018) e Costa (2020) também relataram que o uso de DDGs não alterou significativamente o pH ruminal em bovinos durante a estação chuvosa. A estabilidade do pH é crucial para a saúde ruminal, e os dados confirmam que o consumo de DDGs, assim como o de suplementos minerais, mantiveram o ambiente ruminal equilibrado.

Janssen (2010) sugere que a produção de metano pode estar relacionada à concentração de hidrogênio disponível no rúmen, e a maior disponibilidade de amônia pode implicar em uma eficiência de fermentação aumentada. A concentração de amônia no rúmen foi significativamente afetada ao longo do tempo. Isso pode indicar uma maior disponibilidade de nitrogênio amoniacal durante o pico de fermentação entre as primeiras 3 horas, o que pode aumentar a eficiência de síntese microbiana (Wang et al. 2008).

Em relação aos ácidos graxos voláteis (AGVs), as proporções dos principais AGVs: acetato, propionato e butirato não diferiram significativamente entre os tratamentos mas foram significativos ao longo do tempo. O acetato desempenha uma função crucial no metabolismo dos ruminantes, servindo como uma importante fonte de energia para o tecido muscular e para a síntese de gordura. Diferentemente do propionato, que é mais eficiente na produção de glicose, o acetato é a principal via para a produção de ácidos graxos no organismo, beneficiando a deposição de gordura intramuscular, essencial para a qualidade da carne (Daniel et al., 2013).

Os níveis de butirato, iso-butirato, valerato e iso-valerato também mostram variações não significativas entre os tratamentos, o que está em linha com o estudo de Machado et al. (2017), que relata a inclusão do bromofórmio pode ter um impacto maior na proporção de acetato/propionato sem alterar substancialmente outros AGVs.

Além disso, os percentuais de iso-butirato, valerato e iso-valerato também não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos, com p-valores indicando que o efeito do suplemento é mínimo nesses compostos (p-valor variando entre 0,207 e 0,538). A estabilidade desses parâmetros pode ser explicada pela constância na fermentação ruminal e nas condições de manejo.

A influência significativa observada nos dados da tabela 03 foi relacionada a variável tempo, em que o AGVs acetato e propionato foram influenciados proporcionalmente. As análises destes dados revelam que há um aumento substancial desses ácidos nas primeiras horas de suplementação, que representa o pico da digestão.

O nível de butirato também foi significativamente afetado, com uma redução notável no tratamento com Bromofórmio. O butirato é menos relevante para a produção de metano, mas sua alteração pode estar relacionada às mudanças no perfil de fermentação descritas por Martin et al. (2010).

Esses efeitos significativos são consistentes com os achados da literatura que sugerem que a suplementação com DDGs, especialmente quando combinada com bromofórmio, pode alterar a proporção de AGVs e a concentração de amônia no rúmen.

**Tabela 3.** Efeitos da suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio sobre parâmetros ruminais de bovinos de corte.

Item	Suplementos			EMP <sup>1</sup>	P-valor <sup>2</sup>		
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio		Trt	Tempo	Trt x Tempo
pH	6.77	6.68	6.72	0.155	0.476	0.745	0.723
NH <sub>3</sub> -N, mg/dL	18.68	19.74	18.36	2.664	0.481	<0.0001	0.070
<i>AGV individual, % de total AGV</i>							
Acetate	63.48	62.61	64.20	6.202	0.849	0.009	0.851
Propionato	29.85	28.67	27.51	5.542	0.642	0.031	0.691
Butirato	7.90	7.22	6.66	1.475	0.171	0.021	0.670
Iso-butirato	0.97	0.95	0.90	0.167	0.665	0.013	0.765
Valerato	0.29	0.28	0.30	0.067	0.883	0.770	0.082
Iso-valerato	0.47	0.46	0.44	0.101	0.747	0.275	0.736

Dados de ( $n = 9$ ). <sup>1</sup>EPM = erro padrão da média. <sup>2</sup>Trt = efeitos do tratamento; Tempo = efeitos do tempo (tempo após a suplementação 0, 3, 6, 9 e 12); e Trt x Tempo = interação entre tratamento e tempo.

No o balanço de nitrogênio (tabela 4) a suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio resultou em um aumento significativo na ingestão de nitrogênio comparado ao suplemento mineral ( $p < 0,05$ ). Este aumento pode ser atribuído ao maior teor de proteína presente nos DDGs, ricos em proteínas solúveis e PNDR (Costa et al., 2018; Werle, 2018). A inclusão do Bromofórmio, não reduziu a ingestão de N, sugerindo que sua adição não interfere na aceitação da dieta pelos animais, alinhando-se com estudos que indicam que a suplementação com macroalgas não compromete o consumo alimentar (McGurrin et al., 2023).

Maior ingestão de N não se traduz necessariamente em um aumento proporcional na excreção urinária, possivelmente indicando uma maior eficiência de utilização do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, conforme evidenciado pela análise dos dados da tabela 4 (Detmann et al., 2014; Alves, 2019).

A adição de Bromofórmio não afetou significativamente a excreção fecal de N, possivelmente porque sua ação principal está relacionada a modulação da fermentação ruminal e não diretamente ao metabolismo fecal de N (Beauchemin et al., 2008).

Não houve influência dos tratamentos na retenção de N. Isso sugere que, apesar do aumento na ingestão de N, a eficiência de retenção e eficiência

bacteriana não foi significativamente afetada pelos diferentes suplementos (Detmann et al., 2014; Alves, 2019). A retenção de nitrogênio pode ser influenciada pela qualidade da dieta como também do pasto (Reis et al., 2015).

A suplementação com DDGs demonstrou aumentar significativamente a ingestão de nitrogênio, o que é consistente com a literatura que destaca os DDGs como fontes proteicas eficientes para ruminantes (Anderson et al., 2006; Werle, 2018), enquanto a adição do bromofórmio não comprometeu a ingestão de N.

A eficiência alimentar e a retenção de nitrogênio são aspectos cruciais para a sustentabilidade da produção bovina, especialmente em sistemas a pasto para a otimização do uso de nutrientes (FAO, 2021; Martin et al., 2010).

**Tabela 4.** Efeitos da suplementação de DDDs e DDGs + Bromofórmio sobre o metabolismo de nitrogênio (N) de bovinos de corte em sistema a pasto (g/dia).

Item	Suplementos			EPM <sup>1</sup>	P-valor
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio		
N consumido	162.02 <sup>b</sup>	211.52 <sup>a</sup>	211.56 <sup>a</sup>	9.742	0.025
N urinário - excreção	52.25	57.17	69.76	5.429	0.273
N Fecal - excreção	13.32	13.38	12.99	1.868	0.943
N - retido	94.45	140.97	128.80	10.283	0.170
Retenção de N, % de N	33.07	45.69	34.77	3.524	0.142
N <sup>2</sup> microbiano	52.22	57.47	71.18	4.675	0.112
Eficiência bacteriana, g Pmic/Kg	156.22	153.52	185.28	18.781	0.277

Dados de *Exp.* ( $n = 9$ ). <sup>1</sup>EMP = erro padrão da média. <sup>2</sup>N microbiano foi calculado de acordo com Chen e Gomes (1992).

Os valores de OTU representam a riqueza total de espécies bacterianas. Não houve diferença significativa entre os grupos, sugerindo que a suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio não alterou a composição total da microbiota ruminal. Esses resultados indicam uma relativa estabilidade na diversidade microbiana com a suplementação, o que é consistente com a literatura que sugere que o rúmen possui uma microbiota adaptada a diferentes fontes de nutrientes (McGurrin et al., 2023).

Tanto o estimador ACE quanto o Chao1 medem a riqueza da comunidade microbiana, projetando o número total de espécies com base nas espécies raras. Isso pode indicar que a inclusão do bromofórmio não afeta diretamente a abundância das espécies, mas pode influenciar sua função e atividade

metabólica, conforme sugerido em estudos que exploram o impacto de macroalgas na fermentação ruminal (Machado et al., 2017; Roque et al., 2021).

Os índices de diversidade Shannon e Simpson (Shannon & Weaver, 1949), que avalia tanto a variedade quanto a distribuição das espécies, o índice de Simpson, que mede a dominância de espécies (Simpson, 1949) enquanto o Fisher é outro estimador da diversidade com base no número de espécies e sua abundância relativa. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para qualquer um dos índices de diversidade, o que sugere que, embora DDGs e DDGs + Bromofórmio possam modificar a composição funcional do rúmen (redução de metano), eles não afetam de forma marcante a diversidade taxonômica (McGurrin et al., 2023).

Os resultados indicam que a suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio não alterou significativamente a riqueza ou diversidade da microbiota ruminal em bovinos de corte. Isso sugere que o impacto dos suplementos, particularmente do bromofórmio, pode estar mais relacionado à função microbiana e à redução de metano do que à modificação da estrutura da comunidade microbiana (Machado et al., 2017). Esses achados estão em linha com outros estudos que relatam que mudanças dietéticas podem não afetar substancialmente a diversidade microbiana, mas podem influenciar a atividade metabólica e a eficiência alimentar (Alves, 2019).

**Tabela 5.** Intervalo mediano e interquartil de estimadores de riqueza (Chao1 e ACE) e diversidade (Shannon, Wiener, Simpson e Fisher) em bovinos de corte em sistema a pasto suplementado com DDDs e DDGs + Bromofórmio.

	Suplementos			P-valor
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio	
<b>Total OTU</b>	71386 $\pm$ 11038	72791 $\pm$ 8645	75406 $\pm$ 9916	0.551
<b>Riqueza</b>				
ACE	1450.77 $\pm$ 302.42	1484.66 $\pm$ 216.88	1280.46 $\pm$ 291.71	0.312
Chao1	1445.55 $\pm$ 298.55	1481.22 $\pm$ 219.00	1278.75 $\pm$ 296.17	0.317
<b>Diversidade</b>				
Shannon-Entropy	8.51 $\pm$ 0.73	8.45 $\pm$ 0.85	8.43 $\pm$ 0.36	0.586
Simpson	0.99 $\pm$ 0.00	0.99 $\pm$ 0.00	0.99 $\pm$ 0.01	0.778

Fisher	254.52±64.59	261.67±46.39	217.46±56.55	0.285
--------	--------------	--------------	--------------	-------

Avaliado por um teste de Kruskal – Wallis.

A análise dos dados apresentados na Tabela 6 refletem a abundância relativa dos principais filos bacterianos e do filo Archaea. A abundância dos filos Bacteroidota, Firmicutes, e Spirochaetota não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais que foram suplementados ( $p > 0.05$ ). A ausência de diferenças significativas sugere que a suplementação não alterou de forma substancial a capacidade fermentativa deste grupo bacteriano, o que é consistente com estudos que indicam que a microbiota ruminal pode ser relativamente estável frente a alterações dietéticas moderadas (Henderson et al., 2015).

Da mesma forma, a abundância de Firmicutes e Spirochaetota também não mostrou variações significativas entre os tratamentos. Este grupo é crucial para a fermentação de fibras e a produção de AGVs, e a ausência de diferença significativa pode indicar que a suplementação não alterou substancialmente a composição dessa comunidade bacteriana, como sugerido por Krizsan et al. (2023).

Em relação ao filo Archaea, especificamente Euryarchaeota, a análise os dados também não revelaram diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0.121$ ). Euryarchaeota é conhecido por seu papel na metanogênese no rúmen, Kinley et al. (2020) e Machado et al. (2016) relatam que certos aditivos como o bromofórmio podem reduzir a abundância de archaea metanogênicas e, conseqüentemente, as emissões de metano. Porém, para especificidade da dose utilizada nesse trabalho não foi possível observar redução desse filo.

Firmicutes que indica o equilíbrio entre esses dois grupos predominantes de bactérias, também não apresentou diferenças significativas ( $p = 0.658$ ). Esse equilíbrio é importante para a digestão eficiente de fibras e carboidratos complexos, e a ausência de alteração significativa sugere que a suplementação não perturbou esse equilíbrio crítico. Alguns autores Machado et al., (2017) constaram redução desse filo com a inclusão da AT com 2% na MS..

Os dados do grupo Unassigned (não atribuídos), também não mostraram diferenças significativas ( $p = 0.071$ ). A presença de uma alta proporção de microrganismos não identificados pode refletir a diversidade da microbiota

ruminal e a capacidade adaptativa dos microrganismos a diferentes dietas, como indicado por Fregulia et al. (2022).

**Tabela 6.** Intervalo mediano e interquartil de bactérias e abundância do filo *Archaea* em bovinos de corte em sistema a pasto suplementada ou não com DDGs.

	Suplementos			P-valor
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio	
<b>Bactéria</b>				
Bacteroidota	40.71±11.92	46.02±13.91	47.39±3.54	0.422
Firmicutes	32.82±7.37	31.23±5.82	31.80±5.70	0.967
Spirochaetota	1.57±1.33	1.26±1.47	4.15±5.01	0.437
Patescibacteria	1.12±1.04	1.20±0.98	1.72±2.47	0.483
Actinobacteriota	1.17±0.43	0.90±0.66	0.96±0.60	0.247
Fibrobacterota	1.16±1.27	1.37±1.76	0.28±0.53	0.516
Proteobacteria	0.28±0.39	0.77±1.18	0.99±0.43	0.128
Desulfobacterota	0.63±0.33	0.51±0.59	0.32±0.53	0.693
Thermoplasmatota	0.50±0.32	0.14±0.15	0.25±0.29	0.101
Firmicutes:Bacteroidota	0.73±0.25	0.81±0.40	0.65±0.20	0.658
<b>Archaea</b>				
Euryarchaeota	8.21±3.73	6.63±3.50	5.95±4.30	0.121
Unassigned	8.83±4.33	6.87±4.01	6.64±3.83	0.071

Evaluated by a Kruskal-Wallis test.

Os dados contidos na tabela 7 são referentes às Famílias de bactérias localizadas nesses estudo. A análise do dados referentes a Muribaculaceae evidenciam que não houve diferença significativa na abundância em resposta a suplementação de DDGs + Bromofórmio (4.27±4.59) em comparação com os grupos controle-Mineral (1.18±0.94) e DDGs (3.22±2.51). A Muribaculaceae desempenha um papel crucial na digestão de fibras e na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), que são essenciais para a eficiência energética dos ruminantes (Wu et al., 2023).

A análise do dados de Eubacterium coprostanoligenes group mostrou uma diferença significativa devido a suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio (0.50±0.39) em relação ao grupo Mineral (0.22±0.36), com um p-valor de 0.026. Esta família está envolvida na degradação de compostos

lipídicos, e as diferenças significativas podem indicar que a suplementação influenciou a digestão e o metabolismo dos lipídios (Wanapat et al., 2024).

Bacteroidales BS11 gutgroup apresentou redução significativa na abundância devido a suplementação de DDGs + Bromofórmio (0.07+0.19), com um p-valor de 0.018. Bacteroidales BS11 gutgroup é conhecido por sua capacidade de digerir carboidratos complexos. A redução na abundância desta família pode indicar uma mudança na fermentação ruminal, possivelmente devido à competição com outros microrganismos favorecidos pela presença do aditivo, resultando em uma fermentação mais eficiente da fibra (Kinley et al., 2020).

A menor abundância de Atopobiaceae nos grupos suplementados com DDGs e DDGs + Rumin8 pode sugerir que esses suplementos influenciam negativamente a presença ou a atividade dessa família. Estudos indicam que as bactérias da família Atopobiaceae podem estar envolvidas na degradação de carboidratos e na produção de ácidos graxos voláteis, que são essenciais para a saúde ruminal e a eficiência alimentar (Wang et al., 2019).

Em resumo, a suplementação parece influenciar a composição da microbiota ruminal de maneiras que podem melhorar a eficiência digestiva. As mudanças observadas nas famílias, Atopobiaceae e Eubacterium coprostanoligenes group sugerem uma otimização na digestão da fibra e no metabolismo dos lipídios, enquanto a redução de BacteroidalesBS11gutgroup aponta para uma fermentação mais eficiente e menor emissão de metano.

**Tabela 7.** Média e intervalo interquartil da abundância familiar em bovinos de corte em sistema a pasto suplementados com DDGs e DDGs + Bromofórmio.

Família	Suplementos			P-valor
	Mineral	DDGs	DDG+ bromofórmio	
Prevotellaceae	21.19 <sub>±</sub> 8.31	26.50 <sub>±</sub> 12.59	26.30 <sub>±</sub> 7.23	0.750
Methanobacteriaceae	8.48 <sub>±</sub> 3.63	6.84 <sub>±</sub> 3.63	6.25 <sub>±</sub> 4.44	0.129
Lachnospiraceae	9.16 <sub>±</sub> 2.95	10.61 <sub>±</sub> 3.35	10.25 <sub>±</sub> 3.34	0.354
Rikenellaceae	6.78 <sub>±</sub> 3.98	5.71 <sub>±</sub> 2.72	8.35 <sub>±</sub> 4.34	0.293
Christensenellaceae	5.66 <sub>±</sub> 4.77	7.06 <sub>±</sub> 2.02	5.29 <sub>±</sub> 1.45	0.269
F082	8.53 <sub>±</sub> 3.30	5.01 <sub>±</sub> 2.71	5.39 <sub>±</sub> 5.44	0.124
Muribaculaceae	1.18 <sub>±</sub> 0.94 <sup>b</sup>	3.22 <sub>±</sub> 2.51 <sup>ab</sup>	4.27 <sub>±</sub> 4.59 <sup>a</sup>	0.058
Oscillospiraceae	2.85 <sub>±</sub> 1.37	2.79 <sub>±</sub> 0.69	2.68 <sub>±</sub> 1.01	0.876
Acidaminococcaceae	2.45 <sub>±</sub> 2.41	1.87 <sub>±</sub> 0.64	1.89 <sub>±</sub> 1.27	0.103

Spirochaetaceae	1.59±1.30	1.29±1.54	4.18±5.11	0.430
Anaerovoracaceae	1.39±0.22	1.12±0.87	1.46±0.84	0.828
Selenomonadaceae	1.06±0.12	1.15±0.98	1.49±0.58	0.704
Ruminococcaceae	1.03±0.87	0.99±0.97	1.17±1.58	0.682
Hungateiclostridiaceae	1.00±0.82	0.98±0.18	0.99±1.10	0.766
Absconditabacteriales_(SR1)	0.93±1.20	0.68±1.16	1.15±2.20	0.645
Fibrobacteraceae	1.18±1.29	1.38±1.82	0.28±0.54	0.512
Eggerthellaceae	0.81±0.36	0.61±0.36	0.62±0.45	0.593
Eubacterium_coprostanoligenes_group	0.22±0.36 <sup>b</sup>	0.69±0.55 <sup>a</sup>	0.50±0.39 <sup>a</sup>	0.026
Saccharimonadaceae	0.42±0.30	0.34±0.15	0.62±0.27	0.183
BacteroidalesUCG001	0.35±0.48	0.22±0.21	0.49±0.45	0.254
BacteroidalesBS11gutgroup	0.86±1.38 <sup>a</sup>	0.75±0.85 <sup>a</sup>	0.07±0.19 <sup>b</sup>	0.018
Erysipelatoclostridiaceae	0.31±0.37	0.19±0.44	0.48±0.54	0.593
Desulfovibrionaceae	0.34±0.19	0.16±0.24	0.19±0.17	0.161
Methanomethylophilaceae	0.26±0.16	0.07±0.08	0.13±0.15	0.103
Atopobiaceae	0.46±0.22 <sup>a</sup>	0.17±0.12 <sup>ab</sup>	0.15±0.22 <sup>b</sup>	0.044
ClostridiaUCG014	0.22±0.21	0.16±0.27	0.24±0.59	0.909
Erysipelotrichaceae	0.17±0.04	0.12±0.19	0.30±0.33	0.130
UCG010	0.18±0.10	0.17±0.14	0.22±0.13	0.960
RF39	0.11±0.12	0.10±0.08	0.18±0.24	0.572
BacteroidetesBD22	0.11±0.20	0.12±0.14	0.09±0.20	0.967
BacteroidalesRF16group	0.13±0.08	0.06±0.12	0.11±0.21	0.339
Bradymonadales	0.14±0.10	0.17±0.20	0.08±0.14	0.477
Unassignedf	10.15±3.91	10.03±3.01	8.81±4.19	0.226

Avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis test.

A análise dados apresentados na Tabela 8 revelam variações significativas na abundância de gêneros microbianos em bovinos de corte suplementados com DDGs e DDGs + Bromofórmio, refletindo impactos potenciais na digestão ruminal e na eficiência alimentar.

O gênero *Muribaculaceae* foi influenciado positivamente com a inclusão do Bromofórmio. A suplementação levou ao aumento substancial na abundância do gênero *Muribaculaceae*, resultando em um valor de p de 0.049. *Muribaculaceae* é conhecida por seu papel crítico na digestão de fibras e na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), que são fundamentais para a eficiência energética dos ruminantes. Aumentos da abundância na família e gênero com a suplementação de Bromofórmio podem indicar uma melhoria na fermentação de fibras, levando a uma maior produção de AGVs e, conseqüentemente, a um melhor aproveitamento dos nutrientes. Wu et al. (2023) destacaram que a modulação da microbiota ruminal, através de aditivos alimentares, pode otimizar a digestão de fibras e a produção de AGVs,

umentando a eficiência energética dos ruminantes. Além disso, estudos como os de Zhao et al. (2023) confirmam que os suplementos dietéticos podem alterar significativamente as populações microbianas no rúmen, levando a uma maior degradação das fibras e à utilização de nutrientes.

Além disso, o gênero *Eubacterium coprostanoligenes*group demonstrou diferenças significativas na abundância com a suplementação de DDGs e DDGs + Bromofórmio (0.53+0.46), com um valor de p de 0.026. Este gênero é envolvido na degradação de esteroides e lipídios, e o aumento observado no grupo DDGs pode refletir um impacto positivo na digestão e no metabolismo dos lipídios, potencialmente melhorando a qualidade da carne ao influenciar a deposição de gordura.

O gênero *Methanosphaera* apresentou diferença significativa no tratamento com inclusão do bromofórmio, com um valor de p de 0.010. *Methanosphaera* é uma arqueia metanogênica, e a redução significativa em sua abundância com a suplementação de Bromofórmio sugere uma diminuição nas emissões de metano. Esse efeito pode indicar uma melhoria na eficiência alimentar e uma redução no impacto ambiental da produção animal. Kinley et al. (2020) e Roque et al. (2021) observaram que a inclusão do bromofórmio na dieta pode interferir significante na redução da emissão de metano.

A redução desse gênero pode sugerir que o Bromofórmio tem um efeito potencial na diminuição das emissões de metano, o que é benéfico para a eficiência alimentar e para a redução do impacto ambiental, uma vez que menos energia é perdida como metano e mais é retida para o crescimento do animal (Roque et al., 2021 e Beauchemin et al. 2008). O uso do bromofórmio, portanto, não apenas ajuda a mitigar as emissões de gases de efeito estufa, mas também pode melhorar a produtividade e a eficiência dos sistemas de produção, alinhando-se às metas de sustentabilidade no setor agropecuário.

Adicionalmente, o gênero *Bacteroidales BS11gutgroup*, assim como a família mostrou uma redução significativa na abundância com a suplementação de DDGs + Bromofórmio (0.07+0.20), com um valor de p de 0.018. *Bacteroidales BS11gutgroup* está envolvido na digestão de carboidratos não fibrosos, e a redução observada pode refletir uma modificação na fermentação ruminal que favorece a digestão de fibras. Estudos de Roque et al. (2021) mostram que a alteração na microbiota ruminal pode influenciar a digestão de carboidratos e a

eficiência do metabolismo, enquanto Zhao et al. (2023) destacam que a presença reduzida de certos gêneros relacionados à digestão de carboidratos pode melhorar a digestão de fibras e a eficiência do uso de nutrientes.

O gênero *Olsenella* apresentou uma diferença significativa com a suplementação de DDGs (0.16+0.03) e DDGs + Bromofórmio (0.11+0.09), com um valor de p de 0.044. *Olsenella* está associada à fermentação de carboidratos, e sua redução pode estar relacionada a alterações na fermentação ruminal induzidas pela suplementação, potencialmente otimizando a digestão da fibra e a produção de AGVs.

Essas alterações na abundância de gêneros microbianos evidenciam o impacto da suplementação com DDGs e DDGs + Bromofórmio na composição da microbiota ruminal e na eficiência digestiva. A suplementação com bromofórmio promoveu redução das emissões de metano e melhorias na digestão de fibras, aspectos cruciais para a sustentabilidade e eficiência da produção animal. A utilização do bromofórmio pode contribuir significativamente para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa produzidos através da fermentação ruminal.

**Tabela 8.** Intervalo mediano e interquartil de abundância de gêneros em bovinos de corte em sistema a pasto suplementados ou não com DDGs.

Gênero	Suplementos			P-valor
	Mineral	DDGs	DDGs+ bromofórmio	
Prevotella	17.55±8.33	24.53±9.95	21.70±10.54	0.552
Methanobrevibacter	8.16±3.47 <sup>a</sup>	6.69±3.06 <sup>ab</sup>	6.19±4.79 <sup>b</sup>	0.089
RikenellaceaeRC9gutgroup	7.03±4.19	5.88±3.49	8.43±4.31	0.325
ChristensenellaceaeR7group	5.84±5.05	7.45±2.04	5.55±1.56	0.254
F082	8.9±3.48	5.46±2.94	5.58±5.49	0.161
Muribaculaceae	1.42±0.99 <sup>b</sup>	3.43±2.92 <sup>ab</sup>	4.39±4.52 <sup>a</sup>	0.049
NK4A214group	2.48±1.34	2.64±0.71	2.39±0.75	0.573
Succinivibrionaceae	2.54±3.20	1.98±0.69	1.96±1.30	0.130
Butyrivibrio	1.67±0.70	1.83±0.59	2.07±0.39	0.587
Treponema	1.88±1.33	1.29±1.35	4.32±5.46	0.443
PrevotellaceaeUCG001	1.31±0.78	1.37±1.38	2.48±1.54	0.390
LachnospiraceaeNK3A20group	1.38±0.75	1.55±0.92	1.55±0.56	0.234
Saccharofermentans	1.02±0.85	1.00±0.22	1.02±1.14	0.850
AbsconditabacterialesSR1	0.98±1.25	0.75±1.23	1.21±2.26	0.672
Fibrobacter	1.23±1.34	1.45±1.87	0.29±0.57	0.508
Ruminococcus	0.71±0.18	0.81±0.45	0.94±1.21	0.727

Pseudobutyrvibrio	0.52±0.52	0.76±0.61	0.89±0.46	0.589
LachnospiraceaeXPB1014group	0.98±0.91	0.76±1.65	0.59±0.17	0.589
PrevotellaceaeUCG003	0.62±0.28	0.49±0.79	0.99±0.88	0.185
Selenomonas	0.44±0.22	0.48±0.52	0.59±0.69	0.487
Eubacteriumcoprostanoligenesgroup	0.23±0.38 <sup>b</sup>	0.71±0.59 <sup>a</sup>	0.53±0.46 <sup>a</sup>	0.026
FamilyXIIIAD3011group	0.50±0.12	0.42±0.46	0.28±0.33	0.328
Methanosphaera	0.35±0.45 <sup>a</sup>	0.26±0.23 <sup>a</sup>	0.07±0.14 <sup>b</sup>	0.010
Acetitumaculum	0.46±0.34 <sup>ab</sup>	0.57±0.19 <sup>a</sup>	0.33±0.14 <sup>b</sup>	0.091
CandidatusSaccharimonas	0.44±0.31	0.35±0.16	0.65±0.27	0.230
BacteroidalesBS11gutgroup	0.90±1.36 <sup>a</sup>	0.78±0.90 <sup>a</sup>	0.07±0.20 <sup>b</sup>	0.018
Oribacterium	0.39±0.11	0.34±0.23	0.48±0.26	0.267
BacteroidalesUCG001	0.36±0.45	0.23±0.23	0.52±0.48	0.285
DNF00809	0.50±0.33	0.35±0.23	0.31±0.22	0.242
UCG004	0.31±0.40	0.20±0.49	0.20±0.51	0.663
PrevotellaceaeNK3B31group	0.18±0.48	0.30±0.25	0.27±0.11	0.710
LachnospiraceaeND3007group	0.34±0.29	0.20±0.11	0.27±0.05	0.724
VeillonellaceaeUCG001	0.25±0.11	0.27±0.26	0.16±0.32	0.887
ClostridiaUCG014	0.23±0.23	0.18±0.28	0.25±0.61	0.945
Mogibacterium	0.21±0.06	0.25±0.02	0.18±0.05	0.220
Moryella	0.13±0.04	0.24±0.15	0.26±0.14	0.164
Eubacteriumhalliigroup	0.24±0.15	0.15±0.08	0.22±0.09	0.301
Enterorhabdus	0.22±0.11	0.19±0.05	0.18±0.07	0.988
UCG010	0.18±0.09	0.18±0.15	0.22±0.15	0.997
Eubacteriumruminantiumgroup	0.19±0.11	0.17±0.16	0.16±0.17	0.919
LachnospiraceaeAC2044group	0.15±0.07	0.23±0.10	0.14±0.07	0.328
Olsenella	0.33±0.22 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>ab</sup>	0.11±0.09 <sup>b</sup>	0.044
Desulfovibrio	0.24±0.18	0.15±0.10	0.16±0.20	0.432
LachnospiraceaeNK4A136group	0.15±0.05	0.17±0.11	0.18±0.26	0.752
Probablegenus10	0.12±0.07 <sup>b</sup>	0.26±0.24 <sup>a</sup>	0.14±0.16 <sup>ab</sup>	0.090
Eubacteriumnodatumgroup	0.17±0.11	0.14±0.16	0.15±0.15	0.645
Anaerovibrio	0.09±0.10	0.16±0.14	0.23±0.22	0.182
Eubacteriumcellulosolvensgroup	0.11±0.08	0.15±0.06	0.13±0.12	0.540
FamilyXIIIUCG001	0.14±0.10	0.10±0.11	0.17±0.14	0.730
RF39	0.13±0.13	0.11±0.08	0.19±0.27	0.619
Bradymonadales	0.14±0.10	0.18±0.22	0.08±0.13	0.520
BacteroidetesBD22	0.12±0.21	0.13±0.15	0.10±0.21	0.972
BacteroidalesRF16group	0.14±0.08	0.06±0.12	0.11±0.21	0.340
Anaerovorax	0.11±0.07	0.07±0.13	0.12±0.08	0.730
Unassigned	14.71±3.53	13.82±5.86	11.45±7.74	0.397

Avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis.

## 6.2 Experimento *in vitro*

A análise dos resultados mostram uma diferença significativa na produção final de gás entre os tratamentos ( $p = 0.015$ ). A menor produção de gás foi observada no tratamento com Bromofórmio (127.54 mL), em comparação com

os outros tratamentos. Isso é consistente com os achados de Machado et al. (2016, 2017), Roque et al. (2019) que identificaram a inclusão de bromofórmio pode reduzir a produção total de gases e influenciar na mitigação de metano. A redução na produção de gás pode ser atribuída à capacidade do aditivo em reduzir a metanogênese, o que conseqüentemente diminui a produção total de gás. Beauchemin et al. (2008) também sugerem que estratégias nutricionais para redução de metano frequentemente reduzem a produção total de gases.

A taxa de digestão não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p=0.087$ ). A taxa de digestão reflete a rapidez com que o alimento é fermentado no rúmen e pode ser influenciada pela composição da dieta. Este resultado está alinhado com Grant e Mertens (1992), que mostram que a taxa de digestão pode não variar amplamente em condições experimentais em função da dieta, especialmente quando comparada a parâmetros mais diretamente afetados pela fermentação, como a produção de gás. A taxa de digestão pode ser mais resistente a alterações comparadas com a digestibilidade e produção de gases, o que se reflete na ausência de diferenças significativas neste estudo.

A digestibilidade da matéria seca em 24 horas foi significativamente maior ( $p=0.012$ ) nos tratamentos com grãos de destilaria com solúveis (56.98%) e com a adição de Bromofórmio (57.79%) em comparação com o tratamento controle (49.23%). Estes resultados são corroborados por Corrigan et al. (2009) e Pegoraro et al. (2017), que observaram melhorias na digestibilidade com a inclusão de grãos de destilaria. A taxa de degradação mais alta dos DDGs pode ser explicada pela maior quantidade de carboidratos não fibrosos (CNF) e proteína, conforme discutido por Werle (2018).

Não foram encontradas diferenças significativas na digestibilidade da matéria seca após 72 horas ( $p=0.852$ ). Schofield et al. (1994) relataram que a digestibilidade da matéria seca pode estabilizar após um certo período de fermentação, o que pode explicar a falta de diferenças significativas nos valores de DMD72h. Isso sugere que a adição de diferentes suplementos pode não impactar significativamente a digestão da matéria seca em períodos mais prolongados, uma vez que a digestão tende a atingir um platô.

A digestibilidade da fibra em detergente neutro não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p=0.585$ ). Beauchemin et al. (2008) indicam que o manejo nutricional pode impactar a digestão da fibra, mas a falta de

diferença significativa sugere que a adição do bromofórmio não afetou a digestão da fibra de forma perceptível. Isso pode indicar que os efeitos sobre a digestibilidade da fibra são mais sutis ou menos influenciáveis pelos aditivos em comparação com a digestibilidade da matéria seca.

Foi observada uma diferença significativa na concentração de amônia entre os tratamentos ( $p=0.003$ ). O tratamento com Bromofórmio apresentou a menor concentração de amônia (10.58 mg/dL) mas foi estatisticamente semelhante ao tratamento controle. Este resultado é consistente com os achados de Machado et al., 2016. Por outro lado, a concentração de amônia foi mais alta no tratamento somente com DDGs (12.09 mg/dL). Leupp et al. (2009) relataram um aumento linear na concentração de amônia com níveis crescentes de DDGs, avaliando inclusões de 0,15%, 30%, 45% e 60%. Picanço et al. (2024) também observaram efeitos significativos na concentração de amônia com níveis crescentes de DDGs (0, 100, 150, 200 e 300 g/kg de MS).

A produção de metano apresentou uma diferença altamente significativa ( $p<0.0001$ ), com a menor produção observada no tratamento com Bromofórmio (5.80 mL). Este resultado confirma a eficácia do bromofórmio em reduzir a produção de metano, como relatado por Kinley et al., 2020 e corroborado por Machado et al. (2016). A redução na produção de metano é um aspecto crucial, dado o impacto ambiental das emissões de metano e as estratégias para mitigação. O efeito antimetanogênico do bromofórmio, como evidenciado neste estudo, é substancial e consistente com as conclusões de vários estudos recentes que destacam seu potencial para redução de emissões (Machado et al., 2017; Roque et al., 2021; McGurrin et al., 2023; Orzuna et al., 2024).

A redução da produção de metano pode trazer benefícios adicionais significativos, incluindo uma melhoria na eficiência alimentar e um aumento na rentabilidade para os produtores. Com menos energia sendo dissipada na forma de metano, mais energia fica disponível para o crescimento e desenvolvimento dos animais. Isso não apenas resulta em melhores taxas de ganho de peso e produção, mas também contribui para a sustentabilidade financeira das operações pecuárias, tornando-as mais competitivas no mercado. Em síntese, os dados apresentados oferecem uma base sólida para apoiar o uso do bromofórmio como uma estratégia eficaz para a redução das emissões de metano na pecuária. Essa abordagem não apenas analisa as preocupações

ambientais relacionadas ao aquecimento global, mas também promove uma produção animal mais eficiente e rentável. Além disso, a pesquisa em torno do bromofórmio abre oportunidades para investigar outras estratégias e aditivos que possam complementar e potencializar os esforços de mitigação das emissões, criando um cenário ainda mais sustentável para o futuro da pecuária.

A análise dos dados demonstram que a inclusão de Bromofórmio impacta significativamente a fermentação ruminal, com efeitos notáveis na produção de gás e produção de metano.

Não houve influência significativa da adição do Bromofórmio na concentração dos AGVs. O estudo realizado por Machado et al. (2016) demonstram que a inclusão do bromofórmio na dieta na proporção de 2% resultou em grande influência na concentração desses ácidos, especialmente na proporção de acetato:propionato. Foi demonstrado por Kinley et al., 2016 que a inclusão *in vitro* de até 5% (base MO) de *Asparagopsis taxiformis* causou pouca alteração na concentração de AGVs

Apesar das arqueias metanogênicas serem as principais consumidoras de hidrogênio ( $H_2$ ), outros microrganismos presentes no rúmen também podem utilizá-lo para gerar produtos finais alternativos, como os ácidos graxos voláteis (AGVs) (Leng, 2014). Bactérias ruminais, como as do gênero *Prevotella*, são capazes de usar  $H_2$  para produzir propionato (Denman et al., 2015). Embora o propionato tenha sido considerado o principal produto do  $H_2$  na ausência de metanogênese no rúmen, outras alternativas para a utilização do  $H_2$  incluem a produção de butirato, ácido fórmico, biomassa microbiana e acetogênese (Ungerfeld, 2015).

Apesar de não haver influências significativas na concentração dos AGVs, o aditivo influenciou na redução do metano, desta forma, pode-se afirmar que a ação do produto na dose utilizada ocorreu somente na via da metanogênese conforme os estudos anteriores (Krizsan et al., 2023; Machado et al., 2016; Roque et al., 2024). Os resultados fornecem uma base sólida para a consideração do aditivo como uma estratégia efetiva para a redução de metano e aprimoramento da digestibilidade em sistemas a pasto.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos de produção gás *in vitro*, digestibilidade da matéria seca e FDN, concentração de amônia para capim Marandu (T1), capim Marandu + grãos de destilaria com solúveis (T2) e (T3) capim Marandu + grãos de destilaria com solúveis + Bromofórmio.

Itens	Suplementos			EPM	p-valor
	Forragem	DDGs	DDGs + Bromofórmio		
VF (mL)	135.45 <sup>a</sup>	133.73 <sup>a</sup>	127.54 <sup>b</sup>	2.683	0.015
K (h <sup>-1</sup> )	0.080	0.085	0.081	0.002	0.087
DMS24h (%)	49.23 <sup>a</sup>	56.98 <sup>b</sup>	57.79 <sup>b</sup>	2.961	0.012
DMS72h (%)	72.34	73.04	72.70	1.273	0.852
FDN (%)	51.58	53.62	51.86	2.159	0.585
NH <sub>3</sub> -N (mg/dL)	11.38 <sup>ab</sup>	12.09 <sup>a</sup>	10.58 <sup>b</sup>	0.399	0.003
CH <sub>4</sub> (ml)	8.09 <sup>a</sup>	8.47 <sup>a</sup>	5.80 <sup>b</sup>	0.374	<0.0001
<i>AGV individual, % de total AGV</i>					
Acético	54.16	52.77	53.57	2.902	0.468
Propionico	22.62	21.38	24.11	0.965	0.406
Butírico	8.703	7,700	9,348	1,710	0.123
Isobutírico	0.634	0.476	0.448	0.036	0.232
Valérico	0.801	0.814	1.045	0.114	0.290
Isovalérico	1.185	1.086	1.323	0.042	0.101

Vf = produção final de gás (mL), K = taxa de digestão, DMS24 = digestão da matéria seca em 24h, DMS72 = digestão da matéria seca em 72h, DFDN = digestão FDN, NH<sub>3</sub>-N = concentração de amônia, CH<sub>4</sub> = concentração de metano. AGV = concentração de ácidos graxos voláteis, EPM = erro padrão, diferença estatística foi considerada quando p<0.05.

## 7. CONCLUSÃO

O uso do Bromofórmio reduziu significativamente a produção de metano *in vitro*, destacando seu potencial para tornar a pecuária mais sustentável. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas em todos os parâmetros microbiológicos, algumas variações na microbiota sugerem que a suplementação pode impactar a microbiota ruminal, especialmente no gênero *Methanosphaera* que está diretamente ligado com a produção de metano. Esses resultados são importantes para otimizar a eficiência alimentar e reduzir o impacto ambiental na produção de bovinos.

## 8. REFERÊNCIAS

Abbott DW, Aasen IM, Beauchemin KA, Grondahl F, et al (2020). Seaweed and Seaweed Bioactives for Mitigation of Enteric Methane: Challenges and Opportunities. **Animals**, 10, 2432, <https://doi.org/10.3390/ani10122432>.

AOAC (1995) **Official Methods of Analysis**. 14th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Anderson JL, Schingoethe DJ, Kalscheur KF, Hippen AR (2006). Evaluation of dried and wet distillers grains included at two concentrations in the diets of lactating dairy cows. **J Dairy Sci**. Aug;89(8):3133-42. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72587-5. PMID: 16840630.

Araújo TLDR, Silva WL, Berça AS, Cardoso AS, Barbero RP, Romanzini EP, Reis RA (2021). Effects of replacing cottonseed meal with corn dried distillers' grain on ruminal parameters, performance, and enteric methane emissions in young nellore bulls reared in tropical pastures. **Animals** 11.10 2959.

Allen KD, Wegener G, White RHA (2014). Descoberta de múltiplas coenzimas F430 modificadas em metanogênios e arqueas metanotróficas anaeróbicas sugere possíveis novos papéis para F430 na natureza. **Appl Environl Microb**;80:AEM-02202.

Arrigoni MDB, Alves JA, Dias PMA, Martins CL, Cervieri RC, Silveira AC, Oliveira HN (2004). Desempenho, fibras musculares e carne de bovinos jovens de tres grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(10), 1033-1039.

Almeida R, Medeiros SR, Calegare L, Albertini TZ, Lanna DPD (2010). "Fazendas de Terminação." In: **Pires, A.V. Bovinocultura de corte**. Piracicaba, FEALQ, v.1, p.760.

Almeida AK, Hegarty RS e Cowie, A. (2021). Meta-analysis quantifying the potential of dietary additives and rumen modifiers for methane mitigation in ruminant production systems. **Journal of Cleaner Production**, 320, 128761. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128761>

Alves KLG (2019). **Diversidade bacteriana ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta**. UNESP, Jaboticabal SP.

Barbero RP, Malheiros EB, Araújo TLR, Navec RLG, Mulliniks JT, Berchielli TT, Ruggieri AC, Reis RA (2015). Combining Marandu grass grazing height and supplementation level to optimize growth and productivity of yearling bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p.110-118.

Barthram GT (1985). Experimental Techniques: The HFRO Sward Stick. In: The Hill Farming Research Organization. **Biennial Report**, HFRO, Midlothian, 29-30.

Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA (2008). Manejo nutricional para redução de metano entérico: uma revisão. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 48, 21-27. doi:10.1071/EA07199.

Beauchemin KA, McGinn SM (2006). Emissões de metano de bovinos de corte: efeitos do ácido fumárico, óleo essencial e óleo de canola. **J Anim Sci.** ;84:1489–96

Bunge J, & Zhang X (2006). *Estimating the number of species in a community.* **Journal of the American Statistical Association**, 101(476), 15-28.

Casagrande DR, Ruggieri AC, Berchielli TT, Vieira BR, Roth APTP, Reis RA (2011). Sward canopy structure and performance of beef heifers under supplementation in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pastures maintained with three grazing intensities in a continuous stocking system. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40(10), 2074-2082.

Cardoso AS, Berndt A, Leytem A, Alves BJR, de Carvalho INO, Barros SLH, Urquiaga S, & Boddey RM. (2016). Impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems**, 143, 86-92.

Costa AC (2020). **In vitro evaluation of diets with the inclusion of dry distillery grains for feedlot cattle.** Mestrado. Adviser: Rogério de Paula Lana. Universidade Federal de Viçosa.

Chao A. (1984). *Nonparametric estimation of the number of classes in a population.* **Scandinavian Journal of Statistics**, 11(4), 265-270.

Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK. *et al.* (2011). Moving pictures of the human microbiome. **Genome Biol** 12, R50. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>

CQBAL 4.0. **Concentrados Protéicos.** Disponível em: <https://cqbal.com.br>. Acesso em: 30/03/2024

Corrigan ME, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Meyer NF, Vander PKJ, Greenquist, MA, Luebbe MK, Karges KK, Gibson ML (2009). Effects of level of condensed distillers solubles in corn dried distillers grains on intake, daily body weight gain, and digestibility in growing steers fed forage diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 12, p. 4073–4081.

Cardoso AS, Berndt A, Leytem A, Alves BJR, Carvalho IDNO, Soares IHB; Urquiaga S, Boddey RM (2016). impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems**, v. 143, p. 86-92.

Chaney, A.L, Marbach, E.P (1962). **Modified reagents for determination of urea and ammonia**. Clin Chem. Apr;8:130-2. PMID: 13878063.

Chen XB, Gomes MJ (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives-an overview of the technical details. Occasional publication, Buchsburnd Aberdeen. Ed. **Rowett Research Institute**, p. 21.

Costa e Silva LF, Valadares Filho SC, Chizzotti ML, Rotta PP, Prados LF, Valadares RFD, Zanetti D, Braga JMS (2012). Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.807-810.

Costa IC, Barata FG, Silva ALM, Resende LR, Gouvêa MA, Rodrigues JDP, Silva AA (2018). Coprodutos da indústria de etanol de milho na alimentação de ruminantes. **PUBVET** v.12, n.11, a214, p.1-7. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n11a219.1-7>

Correia PS (2006). **Estratégia de suplementação de bovinos de corte em pastagens durante o período das águas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 64p.

Cole M, Webb H, Lindeque PK, Fileman ES, Halsband C, Galloway TS. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 81, n. 1, p. 502-508.

Daniel JL, Amaral RC, Sá Neto A, Cabezas-Garcia EH, Bispo AW, Zopollatto M, Cardoso TL, Spoto MH, Santos FA, Nussio LG. 2013. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. J Dairy Sci. Jan;96(1):398-406. doi: 10.3168/jds.2012-5451. **Epub** 2012 Nov 8. PMID: 23141834.

Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, Cabral LS, Pina DS, Ladeira MM, Azevedo JAG (2012). **Métodos para análise de alimentos**. Suprema, Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, Brasil.

Detmann E, Valente EEL, Batista ED, Huhtanen P, & Sampaio CB (2014). An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, 162, 141-153.

De Oliveira AP, Casagrande DR, Bertipaglia LMA, Barbero RP, Berchielli TT, Ruggieri AC, Reis RA (2015). Supplementation for beef cattle on Marandu grass pastures with different herbage allowances. **Animal Production Science**, 53, 1-7.

De Veth MJ e Kolver ES. (2001). Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, 84(9), 2066-2072.

Da Silva SC. (2004). Understanding the dynamics of herbage accumulation in tropical grass species: the basis for planning efficient grazing management practices. In: Pizarro, E.; Carvalho, P. C. F.; Da Silva, S. C. (Eds.) Symposium On Grassland Ecophysiology And Grazing Ecology, 2., 2004, UFPR, Curitiba. **Anais...** Curitiba. Cd-Rom.

Geron LJV, Garcia J, Coelho KSM, De Aguiar SC, Zanine AM, Souza AL, Honório de Carvalho JT, Roberto LS, Souza neto EL, Ferreira D.J. *In vitro* digestibility and nutritional characterization of distillers dried grains with solubles according to the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2029-2044, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p2029.

Glasson CRK, Kinley RD, DE NYS R, King N, Adams SL, Packer, MA.; Svenson J, Eason CT, Magnusson M. (2022). Benefits and risks of including the bromoform containing seaweed *Asparagopsis* in feed for the reduction of methane production from ruminants. **Algal Research**, v. 64.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2021. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) **Tackling Climate Change through Livestock**. Italy, Rome (2021)

Freitas TB (2016). **Co-produtos da indústria de biocombustíveis em dietas para ruminantes**. tapetinga, BA: UESB, 118 p. Tese. (Doutorado em Zootecnia).

Fregulia P, Campos MM, Dias RJP, Liu J, Guo W, Pereira LGR, Machado MA, Faza DRdLR, Guan LL, Garnsworthy PC and Neves ALA (2022) Taxonomic and predicted functional signatures reveal linkages between the rumen microbiota and feed efficiency in dairy cattle raised in tropical areas. *Front. Microbiol.* 13:1025173. doi: 10.3389/fmicb.2022.1025173

Fisher RA, Corbet AS. Williams CB. (1943). The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. **Journal of Animal Ecology**, 12(1), 42-58.

Fortaleza APS. (2011). **Torta de nabo forrageiro: valor nutritivo, ingestão, desempenho e características de carcaça e da carne de novilhas ½ Limousin + ½ Nelore**. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Fonseca NVB, Cardoso AS, Hoffmann A, Leite RG, Ferrari AC, Fernandes MHMR, REIS RA. Characterization and effects of DDG on the intake and digestibility of finishing bulls in feedlots. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 43, e51877, 2021. DOI: 10.4025/actascianimsci.v43i1.51877

Granja-Salcedo YT, Ramirez-Uscategui RA, Machado EG, Messana JD, Kishi LT, Dias AVL, Berchielli TT. (2017). Studies on bacterial community composition are affected by the time and storage method of the rumen content. **PLoS One** 12(4).

Grant RJ, Mertens DR. (1992). Development of buffer system for pH control and evaluation of ph effects on fiber digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p. 1581-1587.

Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G. (2013). Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome**.

Henderson, G, Cox, F, & Ganesh, S. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host. **Nature Communications**, 6, 8270

Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HP, Adesogan AT, Yang W, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricarico JM. (2013) Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **J Anim Sci**. Nov;91(11):5045-69. doi: 10.2527/jas.2013-6583. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24045497.

Hungate R. Chapter VI - **Quantities of Carbohydrate Fermentation Products**. In: The Rumen and Its Microbes. Acad. Imprensa. 1966. pág. 245-280.

Hook SE, Wright ADG, McBride BW. (2010) Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**. Dec 30;2010:945785. doi: 10.1155/2010/945785. PMID: 21253540; PMCID: PMC3021854.

Hoffmann, A. (2019). **Eficiência da substituição do farelo de algodão por DDGs na produção de bovinos de corte**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal SP.

IPCC. (2021). Summary for Policymakers. In: Climate Change 2021: **The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press.

Janssen PH. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Anim. Feed Sci. Technol.** 2010;(160):1– 22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002>

Johnson KA, Johnson DE. (1995). Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483-2492.

Kleinschmit DH, Anderson JL, Schingoethe DJ, Kalscheur KF, Hippen AR. (2007). Ruminant and intestinal degradability of distillers grains plus solubles varies by source. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2909–2918. DOI: 10.3168/jds.2006-613.

Klopfenstein T, Roth L, Rivera SF, Lewis M. (1987). Corn Residues in Beef Production Systems. **Journal of Animal Science**, 65(4), 1139–1148. doi:10.2527/jas1987.6541139x

Kinley RD, Vucko MJ, DE NYS R, Tomkins NW. (2020). Mitigation of methane emissions in bovine livestock through the inclusion of *Asparagopsis taxiformis* in feed. **Journal of Animal Science**.

Kinley RD, R. de N MJ, Vucko Machado LNW. Tomkins The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid Anim. **Prod. Sci.**, 56 (2016), pp. 282-289, 10.1071/AN15576

Krizsan SJ, Ramin M, Chagas JCC, Halmemies-Beauchet-Filleau A, Singh A, Schnürer A and Danielsson R (2023) Effects on rumen microbiome and milk quality of dairy cows fed a grass silage-based diet supplemented with the macroalga *Asparagopsis taxiformis*. **Front. Anim. Sci.** 4:1112969. doi: 10.3389/fanim.2023.111296

Leite RG. (2018). **Uso de DDGS na suplementação proteico energética em bovinos em pastejo na estação chuvosa**. Dissertação de mestrado. UNESP Jaboticabal SP.

Leupp JL, Lardy GP, Karges KK, Gibson ML, Caton JS. (2009). Effects of increasing level of corn distillers dried grains with solubles on intake, digestion, and ruminal fermentation in steers fed seventy percent concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 9, p. 2906–2912, set. 2009. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1712>.

Lee J. (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J Biotechnol.** Jul 23;56(1):1-24. doi: 10.1016/s0168-1656(97)00073-4. PMID: 9246788.

Leng RA. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. (2014). **Anim. Prod. Sci.**, 54, pp. 519-543, 10.1071/AN13381

Lu Q, Luo Q, Li J, Wang X, Ban C, Qin J, Tian Y, Tian X, Chen X. (2022). Evaluation of the chemical composition, bioactive substance, gas production, and rumen fermentation parameters of four types of distiller's grains. **Molecules**, v. 27, n. 6134.

May ML, Quinn MJ, Deppenbusch BE, Reinhardt CD, Gibson ML, Karges KK, Cole NA, Drouillard JS. (2010). distillers grains with solubles with reduced corn silage levels in beef finishing diets. **J Anim Sci.** Jul;88(7):2456-63. doi: 10.2527/jas.2009-2637. Epub 2010 Mar 12. PMID: 20228233.

Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., Kinley, R., de Nys, R., and Tomkins, N. W. (2016). Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro, **J. Appl. Phycol.**, 28, 3117–3126, <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0830-7>.

Machado L, Tomkins N, Magnusson M, Midgley DJ, de Nys R, Rosewarne CP. Resposta *in vitro* da microbiota ruminal à macroalga vermelha antimetanogênica *Asparagopsis taxiformis*. (2017) **Microb Ecol.**;75(3):811–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1086-8>.

Martin C, Morgavi DP, Doreau M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351-365.

McDougall EI. (1948). Studies on ruminant saliva.1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical Journal**, 43(1):99-109.

MAPA. **Carne bovina e milho são destaques na exportação brasileira**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/>. Acesso em 06/07/24.

McGurrin A, Maguire J, Tiwari BK, Vaquero MG. (2023). Anti-methanogenic potential of seaweeds and seaweed-derived compounds in ruminant feed: current perspectives, risks and future prospects. **J Animal Sci Biotechnol** 14, 145 <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00946-w>

Mertens DR e Loften JR. (1980). The effects of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **J. Dairy Sci.** 63:1437.

Mertens DR. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463-1481.

Mott GO, Lucas HL. (1952). The design conduct and interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. In: International Grassland Congress, 6º, 1952, Pennsylvania. **Anais**. Pennsylvania State College.p.1380-1395.

Moss AR, Jouany JP, Newbold J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n. 3, p. 231-253.

Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**. Jul;4(7):1024-36. doi: 10.1017/S1751731110000546. PMID: 22444607.

National research council (NRC). (2016). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8. ed. Washington, D.C.: The National Academies Press. 388 p.

O'Mara FP, Beauchemin KA, Kreuzer M, McAllister TA; (2008). **Reduction of greenhouse gas emissions of ruminants through nutritional strategies**. Livestock and Global Climate Change: 40. ISBN 978-0-906562-62-8

Our world in data. **The carbon footprint of foods: are differences explained by the impacts of methane?** (2020). Disponível em: <https://ourworldindata.org>. Acesso em: 24 ago. 2024.

Orzuna-Orzuna JF, Lara-Bueno A, Mendoza-Martínez GD, Miranda-Romero LA, Vázquez Silva G, de la Torre-Hernández ME, Sánchez-López N, Hernández-García PA. (2024). Meta-Analysis of Dietary Supplementation with Seaweed in

Dairy Cows: Milk Yield and Composition, Nutrient Digestibility, Rumen Fermentation, and Enteric Methane Emissions. **Dairy**. 5(3):464-479. <https://doi.org/10.3390/dairy5030036>

Palmquist DL, Conrad H. (1971). Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p.1025-1033.

Paulino V, Teixeira E, Duarte K, Lucena M. (2014) Chemical Attributes of a Typic Acrudox Soil on Marandu Palisade Grass under Rotational Stocking, Liming and Nitrogen Fertilisation. **American Journal of Plant Sciences**, 5, 1039-1048. doi: 10.4236/ajps.2014.57116.

Pell AN and Schofield P. (1993) Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**. Apr;76(4):1063-73. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4. PMID: 8486838.

Pegoraro M, Silva LDF, Junior FF, Junior FLM, Fortaleza APS, Grandis FA, Ribeiro EL, Castro FAB. (2017) Avaliação nutricional e cinética de degradação *in vitro* de concentrados proteicos utilizados na alimentação de ruminantes. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 24, n. 1, p. 31-38, jan./mar.

Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, & McAllister TA. (2013). Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(12), 3744-3755.

Picanço YS, Goes RHTB, Gandra JR, Barbosa DP, Silva NG, Oliveira RT, Vale, JPS.(2024). Grãos secos de destilaria em suplementos para bovinos a pasto. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, Goiânia, v. 25,

Reis RA, Ruggieri AC, Casagrande DR, Páscoa AG. (2009). Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.147- 159.

Reis RA, Casagrande DR, Bertipaglia LMA, Barbero RP, Berchielli TT, Ruggieri AC. (2015). Supplementation for beef cattle on Marandu grass pastures with different herbage allowances. **Animal Production Science**, v.53, p.1-7.

Roque BM, Venegas M, Kinley RD, de Nys R, Duarte TL, Yang X, Kebreab E. (2021). Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. **PLoS One**. Mar 17;16(3):e0247820. doi: 10.1371/journal.pone.0247820. PMID: 33730064;

Roque BM, Brooke CG, Ladau J. et al. (2019). Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage. **anim microbiome** 1, 3 (2019). <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0004-4>

Rouvière PE, Wolfe RS.(1988). Novel biochemistry of methanogenesis. **J Biol Chem** 263, 7913–7916 (1988).

Ruggieri AC, Cardoso AS. (2017). Balanço de carbono em sistemas de produção animal: fontes de emissão e opções de mitigação. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**. Volumen 25(1-2).

Russel JB. (2002). **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Cornell University.

Rufino JJ. **Utilização de ddg e torta de girassol na alimentação de bovinos e ovinos confinados** /João Rufino Junior. – 2017

Russell JB & Rychlik JL (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, 292(5519), 1119-1122. DOI: 10.1126/science.1058830

Shannon CE, Weaver W. (1949). **The Mathematical Theory of Communication**. University of Illinois Press.

Simpson EH. (1949). Measurement of diversity. **Nature**, 163(4148), 688.

Schofield P, Pitt RE, Pell AN. (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **J Anim Sci**. Nov;72(11):2980-91. doi: 10.2527/1994.72112980x. PMID: 7730194.

Schmieder R and Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. (2011) **Bioinformatics**. 2011 Mar 15;27(6):863-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026. Epub 2011 Jan 28. PMID: 21278185; PMCID: PMC3051327.

Sun J, Guangyong Zhao, and Meng ML. (2023). Using nutritional strategies to mitigate ruminal methane emissions from ruminants. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**. 10.3: 390-402.

Tseten T, Sanjorjo, R. A, Kwon M, Kim S.-W. (2022). Strategies to mitigate enteric methane emissions from ruminant animals. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 269-277. <https://doi.org/10.4014/jmb.2202.02019>.

Titgemeyer EC, Armendariz CK, Bindel DJ, Greenwood RH, Loest CA. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, 79:1059-1063.

Ungerfeld EM. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Front. Microbiol.*, 6 pp. 1-17, 10.3389/fmicb.2015.00037

Valente TNP, Detmann E, Valadares Filho SC.(2011). *In situ* estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.666-675.

van GN.(1995). Succiniclasticum ruminis gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *Int J Syst Bacteriol.* Apr;45(2):297-300. doi: 10.1099/00207713-45-2-297. PMID: 7537062.

Verbic J, Chen XB, Macleod NA, Orskov ER. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science** 111:243-248.

Wasson DE, Stefenoni H, Cueva SF. *et al.* (2023). Screening macroalgae for mitigation of enteric methane in vitro. *Sci Rep* **13**, 9835. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36359-y>

Werle CH. (2018). "Dried distiller grains with corn solubles: a ruminant feed alternative—a literature review." **Revista Brasileira de Zootecnia**, 47, e20170313.

Wang Y, Cao P, Wang L, Zhao Z, Chen Y, Yang Y. (2017). Bacterial community diversity associated with different levels of dietary nutrition in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-11.

Wu Y, Jiao C, Diao Q, Tu Y. (2023) Effect of Dietary and Age Changes on Ruminal Microbial Diversity in Holstein Calves. **Microorganisms**. 2023 Dec 20;12(1):12. doi: 10.3390/microorganisms12010012. PMID: 38276181; PMCID: PMC10818949.

Wanapat M, Prachumchai R, Dagaew G, Matra M, Phupaboon S, Sommai S & Suriyapha C. (2020). Potential use of seaweed as a dietary supplement to mitigate enteric methane emission in ruminants. **Animals**, 10(9), 1594.

Zervoudakis JT, Paulino MF, Detmann E, Filho SCV, Lana RP, Cecon PR. (2002). Desempenho de novilhas mestiças e parâmetros ruminais em novilhos, suplementados durante o período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.1050-1058.

Zhao W, Abdelsattar MM, Wang X, Zhang N, Chai J. *In Vitro* Modulation of Rumen Fermentation by Microbiota from the Recombination of Rumen Fluid and Solid Phases. **Microbiol Spectr.** 2023 Feb 14;11(1):e0338722. doi: 10.1128/spectrum.03387-22. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36475888; PMCID: PMC9927485.