

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

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *BLEND* DE
ADITIVOS FITOGÊNICOS SOBRE O DESEMPENHO,
EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO E EMISSÃO DE
METANO DE TOURINHOS NELORE RECRIADOS EM
PASTO DE CAPIM MARANDU**

Ronyatta Weich Teobaldo

Zootecnista

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

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *BLEND* DE
ADITIVOS FITOGÊNICOS SOBRE O DESEMPENHO,
EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO E EMISSÃO DE
METANO DE TOURINHOS NELORE RECRIADOS EM
PASTO DE CAPIM MARANDU**

Ronyatta Weich Teobaldo

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis

Coorientadores: Dr. Abmael da Silva Cardoso

Dra. Yury Tatiana Granja Salcedo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

T314e	Teobaldo, Ronyatta Weich Efeitos da suplementação com blend de aditivos fitogênicos sobre o desempenho, eficiência de uso de nitrogênio e emissão de metano de tourinhos nelore recriados em pasto de capim Marandu / Ronyatta Weich Teobaldo. -- Jaboticabal, 2022 128 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Ricardo Andrade Reis Coorientador: Abmael da Silva Cardoso 1. Extratos de plantas. 2. Forragem. 3. Metano. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM BLEND DE ADITIVOS FITOGÊNICOS SOBRE O DESEMPENHO, EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO E EMISSÃO DE METANO DE TOURINHOS NELORE RECRIADOS EM PASTO DE CAPIM MARANDU

AUTORA: RONYATTA WEICH TEOBALDO

ORIENTADOR: RICARDO ANDRADE REIS

COORIENTADOR: ABMAEL DA SILVA CARDOSO

COORIENTADORA: YURY TATIANA GRANJA-SALCEDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

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

Prof.Dr. NELCINO FRANCISCO DE PAULA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Mato Grosso - Cuiabá/MT

Prof.Assoc. LUCIANO DA SILVA CABRAL (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia e Extensão Rural / Universidade Federal de Mato Grosso - Cuiabá/MT

Prof. Dr. JOANIS TILEMAHOS ZERVOUDAKIS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal / UFMT - Câmpus Cuiabá / Cuiabá/MT

Dra. MÁRCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RONYATTA WEICH TEOBALDO – nascida em Cuiabá, Mato Grosso, em dez de março de 1993, filha de Jair Teobaldo de Assis e Ivanir Weich. Bacharel em Zootecnia pela Faculdade de Agronomia e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) – Campus Cuiabá – MT (2015), com bolsa de Iniciação Científica CNPq e FAPEMAT. Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UFMT (2018), sob orientação do Prof. Dr. Nelcino Francisco de Paula, e coorientação do Prof. Dr. Joanis Tilemahos Zervoudakis, com bolsa de estudos CAPES. Doutorado em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Jaboticabal (2021), sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis e coorientação do Dr. Abmael da Silva Cardoso e Dra. Yury Tatiana Granja Salcedo, com bolsa de estudos CNPq.

“O plantio é livre, mas a colheita é obrigatória!”

(autor desconhecido)

*Aos meus pais, Jair e Ivanir,
As minhas irmãs, Indayá e Tayla,
Ao meu companheiro de vida, Maurício,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria, coragem e determinação para enfrentar os momentos de angústia e medo, e por me ensinar a reconhecer os momentos de conquistas e alegrias, que sempre superam os momentos ruins.

Aos meus pais, Jair e Ivanir, pelo amor incondicional, colo e por ser a minha base. Tudo que faço é por vocês e para vocês. Obrigada por nunca negarem esforços para estarem comigo em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Indayá e Tayla, pelo companheirismo, amor e suporte. Com vocês divido a vida.

Ao meu companheiro de vida, Maurício, pelo amor, dedicação, companheirismo, e por aguentar ao meu lado todo choro e incertezas nesses quase 04 anos de doutorado. Por compartilhar comigo todas as conquistas e alegrias. Sinto muito orgulho em ver nosso crescimento pessoal e profissional nesses 07 anos caminhando juntos.

À minha segunda família, Mah, Maitê, Heitor, Igor e Conxita. Vocês foram e são fundamentais em toda caminhada. Agradeço à Deus por ter vocês sempre por perto. Não poderia ter dado mais certo o encontro das nossas famílias.

À Thaís e ao Geovany, por terem transformado nossa estadia em Jaboticabal mais leve. A amizade de vocês foi e é essencial para todas as conquistas. À Thaís, por ter sido meu braço direito durante todo experimento de campo e laboratório. A sua tranquilidade me fez mais forte. Obrigada por acreditar em mim.

À Kamila, Juliana e Renata, pela amizade de toda hora, por sorrir e chorar comigo. A distância nunca foi um problema para acompanharem todos os momentos. Vocês estão dentre as minhas pessoas preferidas no mundo.

Às meninas, Lareska, Mariane, Leni e Naidia, pelo carinho, acolhimento e amizade construída em meio ao trabalho. Obrigada por estarem comigo, por me escutarem e pelos cafezinhos na Kopenhagen.

Ao professor Ricardo Reis, por me acolher como sua orientada e tornar-se um amigo e colega de profissão. O respeito, carinho e gratidão são gigantescos. Levarei seus conselhos por onde eu for. Obrigada por toda mensagem para bater papo.

Ao Abmael Cardoso, a Yury Granja Salcedo, pela coorientação, e ao Eliéder Romanzini, por não medirem esforços para me auxiliar. Não poderia ter escolhido melhor o meu comitê de orientação. Vocês são profissionais exemplares, e nem se eu quisesse conseguiria agradecer o suficiente.

À Márcia Fernandes, pela ajuda e contribuição com todo o trabalho desde o preparo do experimento em 2018. Aos professores Joanis Tilemahos, Nelcino de Paula e Luciano Cabral, que me acompanham no mínimo desde 2012, e são referências no meu crescimento e atuação.

Ao Zé (Rhaony), parceiro de experimento, pelo companheirismo durante o doutorado e amizade construída. Ao Eric, Diego, Fiona, Iago e Maria Luisa, por toda trajetória e amizade em Jaboticabal. Ao grupo de pesquisa UnespFor, pelas reuniões e crescimento com as discussões técnicas. À equipe do setor de forragicultura, pela ajuda na execução do experimento. Vocês fazem parte dessa conquista.

Ao Welton Cabral por acreditar no meu trabalho desde 2014, quando ainda procurava estágio na faculdade. À toda equipe Gesta'Up, por serem colegas de profissão, amigos e companheiros de risada.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pela oportunidade de cursar o tão sonhado doutorado em uma universidade renomada.

Obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Manejo de Pasto	4
2.2. Aditivos fitogênicos na alimentação de ruminantes.....	7
2.2.1. Taninos na alimentação de ruminantes	7
2.2.2. Óleos essenciais na alimentação de ruminantes.....	14
3. REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 – CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E DESEMPENHO PRODUTIVO EM TOURINHOS NELORE EM PASTOS DE CAPIM MARANDU RECEBENDO SUPLEMENTO COM A INCLUSÃO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS	27
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Local e área experimental	30
2.2. Animais e tratamentos experimentais	32
2.3. Avaliação da forragem – Massa de forragem, composição morfológica e oferta de forragem.....	34
2.4. Valor nutritivo – Análises químico-bromatológicas.....	35
2.5. Desempenho animal	36
2.6. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes	36
2.7. Emissão de metano entérico.....	37
2.8. Análises estatísticas.....	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Produção e composição da forragem	39
3.2. Desempenho animal	41
3.3. Consumo de matéria seca e dos nutrientes	41
3.4. Digestibilidade da matéria seca e de nutrientes.....	43
3.5. Emissão de metano entérico.....	44
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 3 – ADITIVOS FITOGÊNICOS ALTERAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL, EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E COMUNIDADE	

BACTERIANA RUMINAL DE TOURINHOS NELORE SUPLEMENTADOS E EM PASTEJO NO PERÍODO DAS ÁGUAS?	60
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Local e área experimental	64
2.2. Animais e tratamentos experimentais	65
2.3. Avaliação da forragem – Massa de forragem, composição morfológica e oferta de forragem.....	66
2.4. Valor nutritivo da forragem e suplemento – Análises químico-bromatológicas.....	67
2.5. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes	69
2.6. Parâmetros ruminais e metabolismo	69
2.7. Eficiência de uso de nitrogênio	71
2.8. Comunidade bacteriana ruminal	71
2.9. Análises estatísticas.....	73
3. RESULTADOS	74
3.1. Consumo e digestibilidade de matéria seca e dos nutrientes	74
6.2. Parâmetros ruminais	76
6.3. Eficiência de utilização de nitrogênio e eficiência microbiana	81
6.4. Comunidade bacteriana ruminal	83
7. DISCUSSÃO.....	93
8. CONCLUSÃO	101
9. REFERÊNCIAS	102

CEUA



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12703/15 do trabalho de pesquisa intitulado **"Management strategies to reduce environmental impacts of beef cattle production systems"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de agosto de 2015.

Jaboticabal, 07 de agosto de 2015.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM BLEND DE ADITIVOS
FITOGÊNICOS SOBRE O DESEMPENHO, EFICIÊNCIA DE USO DE
NITROGÊNIO E EMISSÃO DE METANO DE TOURINHOS NELORE
RECRIADOS EM PASTO DE CAPIM MARANDU**

RESUMO – Objetivou-se avaliar o consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes, desempenho produtivo, produção de metano entérico, parâmetros ruminais, eficiência de uso de nitrogênio e a comunidade microbiana ruminal de tourinhos da raça Nelore mantidos em pasto de capim Marandu no período das águas, recebendo suplemento energético ou mineral, com ou sem inclusão de aditivos fitogênicos. Os aditivos fitogênicos continham carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis, em que o *blend* comercial foi fornecido nos tratamentos objetivando proporcionar a dose de 1,5 g/kg de MS ingerida. Foram realizados dois experimentos durante os meses de dezembro de 2018 e abril de 2019. No experimento 1, foram utilizados 48 tourinhos Nelore com peso corporal inicial médio de 211 kg $\pm$ 30,20 kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, em quatro tratamentos e três repetições para a avaliação de desempenho produtivo e produção de metano entérico. A avaliação do consumo e digestibilidade de nutrientes e produção de metano entérico foram realizadas em 24 animais (seis animais por tratamento), com peso corporal médio de 326 kg $\pm$ 38,27 kg. O experimento 2 foi realizado utilizando oito tourinhos Nelore, castrados, canulados no rúmen, com peso corporal médio de 456,6 kg $\pm$ 32,8 kg, distribuídos em delineamento quadrado latino 4 x 4 duplo, em arranjo fatorial 2 x 2, com quatro períodos experimentais e quatro tratamentos, para a avaliação dos parâmetros ruminais e comunidade microbiana ruminal. Os tratamentos avaliados nos dois experimentos foram: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; e Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos. A massa de forragem foi maior durante o mês de fevereiro (sendo 8,16 t/ha de MS). Não houve interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes (experimentos 1 e 2), emissão de CH₄ entérico e desempenho produtivo (experimento 1), e parâmetros ruminais e eficiência de utilização de nitrogênio (experimento 2) ($P > 0,05$). No experimento 1: o consumo de MS total ($P = 0,015$), MO ($P = 0,023$), PB ($P = 0,012$), FDNcp ($P = 0,044$) e de energia ($P < 0,05$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. O consumo de MS e de nutrientes não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos aditivos fitogênicos. A digestibilidade da MS ($P = 0,001$), PB ($P = 0,044$) e da energia ($P = 0,050$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. A digestibilidade da MS ($P < 0,0001$), FDNcp ($P = 0,025$) e da energia ($P = 0,023$) foram menores nos animais que consumiram aditivos fitogênicos. O GMD ($P = 0,013$), taxa de lotação ($P = 0,024$) e ganho por área ($P = 0,005$) foram maiores para os animais que consumiram suplemento energético. O consumo de suplemento energético proporcionou tendência de aumento na

emissão de CH₄ entérico ($P = 0,065$). No experimento 2, o consumo da MS total ($P = 0,001$), MO ($P = 0,003$), PB ($P = 0,006$), FDNcp ($P = 0,017$) e de energia ($P < 0,05$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. O consumo de MS e de nutrientes não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos aditivos fitogênicos. A digestibilidade da MS ($P = 0,0004$), MO ($P < .0001$), PB ($P < .0001$), FDNcp ($P = 0,0006$) e de energia ($P < .0001$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. A digestibilidade da MS apresentou tendência de redução ($P = 0,073$) nos animais que consumiram aditivos fitogênicos. O pH, AGCC total e proporção de isobutirato (%) não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos aditivos fitogênicos. Houve tendência de maior proporção de propionato ($P = 0,074$) no rúmen dos animais que consumiram os aditivos fitogênicos, proporcionando incremento de 1,98%. Houve interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos na excreção de N na urina ($P = 0,033$), sendo maior a excreção em animais que consumiram suplemento energético sem aditivos fitogênicos. Não houve efeito dos suplementos e aditivos fitogênicos na eficiência microbiana ($P > 0,05$). Os aditivos fitogênicos tenderam reduzir a abundância da família *Ruminococcaceae. UCG-010* ($P = 0,089$), *Roseburia spp.* ($P = 0,081$) e *Lachnospiraceae NK3A20 group* ($P = 0,089$). A inclusão de aditivos fitogênicos, compostos por carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis, na dose 1,5 g/kg MS ingerida, apresenta tendência em reduzir a digestibilidade da MS, pode alterar a comunidade microbiana ruminal e não tem efeitos sobre a emissão de CH₄ entérico e o desempenho produtivo. O fornecimento de suplemento energético melhora a eficiência de utilização do nitrogênio e desempenho produtivo de tourinhos Nelore em pastejo de capim Marandu durante o período das águas.

Palavras-chave: extratos de plantas, forragem, suplementação, uso de nitrogênio, taninos

EFFECTS OF BLEND SUPPLEMENTATION OF PHYTOGENIC ADDITIVES ON PERFORMANCE, NITROGEN USE EFFICIENCY AND METHANE EMISSION OF NELORE BULLS RECREATED IN MARANDU GRASS PASTURE

ABSTRACT – The objective was to evaluate the intake and digestibility of dry matter and nutrients, productive performance, enteric methane production, rumen parameters, nitrogen use efficiency and the ruminal microbial community of Nelore bulls kept on Marandu grass pasture in the period of water, receiving energy or mineral supplement, with or without the inclusion of phytogenic additives. The phytogenic additives contained carvacrol, cinnamaldehyde and hydrolysable tannins, in which the commercial blend was supplied in the treatments aiming to provide a dose of 1.5 g/kg of DM ingested. Two experiments were carried out during the months of December 2018 and April 2019. In experiment 1, 48 Nelore bulls with an average initial body weight of 211 kg $\pm$ 30.20 kg were used, distributed in a completely randomized design, in a 2 x 2 factorial arrangement, in four treatments and three replications for the evaluation of productive performance and enteric methane production. The assessment of nutrient intake and digestibility and enteric methane production were performed in 24 animals (six animals per treatment), with an average body weight of 326 kg $\pm$ 38.27 kg. Experiment 2 was carried out using eight Nelore bulls, castrated, cannulated in the rumen, with an average body weight of 456.6 kg $\pm$ 32.8 kg, distributed in a 4 x 4 double Latin square design, in a 2 x 2 factorial arrangement, with four experimental periods and four treatments, for the evaluation of rumen parameters and ruminal microbial community. The treatments evaluated in the two experiments were: Energy supplement without inclusion of phytogenic additives; Energy supplement with inclusion of phytogenic additives; Mineral supplement without inclusion of phytogenic additives; and Mineral supplement with inclusion of phytogenic additives. Forage mass was higher during the month of February (8.16 t/ha of DM). There was no supplement x blend interaction of phytogenic additives on the intake and digestibility of dry matter and nutrients (experiments 1 and 2), enteric CH₄ emission and performance (experiment 1), and ruminal parameters and nitrogen utilization efficiency (experiment 2) ($P > 0.05$). In experiment 1: total MS intake ($P = 0.015$), MO ($P = 0.023$), CP ($P = 0.012$), NDFcp ($P = 0.044$) and energy ($P < 0.05$) were higher in animals that consumed an energy supplement. DM and nutrient intake were not influenced ($P > 0.05$) by phytogenic additives. The digestibility of DM ($P = 0.001$), CP ($P = 0.044$) and energy ($P = 0.050$) were higher in animals that consumed an energy supplement. The digestibility of DM ($P < .0001$), NDFcp ($P = 0.025$) and energy ($P = 0.023$) were lower in animals that consumed phytogenic additives. The ADG ($P = 0.013$), stocking rate ($P = 0.024$) and gain per area ($P = 0.005$) were higher for animals that consumed energy supplement. The energy supplement intake provided a tendency to increase the emission of enteric CH₄ ($P = 0.065$). In experiment 2, the total MS intake ($P = 0.001$), MO ($P = 0.003$), CP ($P = 0.006$), NDFcp ($P = 0.017$) and energy ($P < 0.05$) were higher in animals that consumed an energy supplement. DM and nutrient intake were not influenced ($P > 0.05$) by phytogenic additives. The digestibility of DM ($P = 0.0004$), OM ($P < .0001$), CP ($P < .0001$), NDFcp

($P = 0.0006$) and energy ($P < 0.0001$) were higher in animals that consumed an energy supplement. DM digestibility showed a tendency to decrease ($P = 0.073$) in animals that consumed phytogetic additives. The pH, total SCFA and proportion of isobutyrate (%) were not influenced ($P > 0.05$) by phytogetic additives. There was a trend towards a higher proportion of propionate ($P = 0.074$) in the rumen of the animals that consumed the phytogetic additives, providing an increase of 1.98%. There was an interaction supplement x blend of phytogetic additives in the excretion of N in the urine ($P = 0.033$), with higher excretion in animals that consumed SE. There was no effect of supplements and phytogetic additives on microbial efficiency ($P > 0.05$). Phytogetic additives tended to reduce the abundance of the family Ruminococcaceae. UCG-010 ($P = 0.089$), *Roseburia* spp. ($P = 0.081$) and Lachnospiraceae NK3A20 group ($P = 0.089$). The inclusion of phytogetic additives, composed of carvacrol, cinnamaldehyde and hydrolysable tannins, at a dose of 1.5 g/kg DM ingested, tends to reduce DM digestibility, can alter the ruminal microbial community and has no effect on the emission of enteric CH_4 and performance. Energy supplement supply improves nitrogen utilization efficiency and productive performance of Nellore young bulls grazing on Marandu grass during rainy season.

Keywords: forage, nitrogen use, plant extracts, supplementation, tannins

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A produção de ruminantes tem sido vista como uma problemática global em virtude principalmente da produção de metano (CH_4) no rúmen, a qual está associada a emissão de gases de efeito estufa e, conseqüentemente, com as mudanças climáticas, independente do sistema de produção adotado. No entanto, no Brasil, cerca de 85,94% dos bovinos são terminados a pasto (ABIEC, 2020) e mesmo aqueles terminados em confinamento, tiveram a cria e recria em sistemas a pasto utilizando carboidratos fibrosos como alimento, os quais não podem ser utilizados como alimento pelos humanos.

Obstante a isso, em sistemas de consumo de dietas de alta forragem, pode haver perda de 6 a 12% da energia consumida em forma de metano (Johnson e Johnson, 1995). Por outro lado, o aumento nas perdas de nitrogênio nas fezes e urina pode ocorrer com o consumo de forragens com alta proporção de proteína solúvel, pois a eficiência de utilização do nitrogênio consumido pelos ruminantes é tipicamente baixa e muito variável, em torno de 10 a 40% (Callaway et al., 2003; Calsamiglia et al., 2010).

O excesso de nitrogênio excretado na urina, devido ao aumento no consumo de proteína solúvel, reduz a eficiência de utilização de nitrogênio e aumenta os impactos ambientais causados pela volatilização de amônia (NH_3), emissão de óxido nitroso (N_2O) e lixiviação de nitrato (NO_3) (Dijkstra et al., 2013).

Assim, a utilização de práticas e tecnologias para minimizar esses efeitos e buscar a intensificação sustentável do sistema de produção a pasto, são encontradas por meio do conhecimento das características da estrutura do dossel forrageiro, uso de suplementação da dieta, conhecimento da emissão de gases de efeito estufa e a utilização de ingredientes na dieta que não competem com a alimentação humana (Cardoso et al., 2020).

Essas práticas e tecnologias podem proporcionar o aumento no desempenho animal, o entendimento dos custos adicionais da implementação de novas tecnologias, e ainda, a redução dos danos ambientais causados pelas excreções de nitrogênio na urina e emissão de metano.

O manejo do pasto é realizado com intuito de ajustar a massa de forragem e a taxa de lotação, e pode ser realizado por meio do ajuste da quantidade de animais e forragem de diferentes formas, podendo ser expresso como pressão de pastejo, oferta de forragem, massa de forragem residual, IAF residual, altura do dossel, etc. (Reis et al., 2009). A altura do pasto apresenta relação mais consistente com as respostas de plantas e animais quando comparada com as outras formas (Hodgson, 1990).

A manutenção do pasto na sua altura ideal visa proporcionar ao animal maior facilidade na colheita de forragem, sendo determinante da velocidade de ingestão por animais em pastejo (Carvalho et al., 2001, Silva e Carvalho, 2005). Além disso, a altura é considerada uma prática de fácil aplicabilidade (Da Silva et al., 2013) e possui relação linear e positiva com a massa de forragem, podendo ser utilizada como uma medida indireta de massa de forragem em pastos de gramíneas tropicais (Casagrande et al., 2011).

Aliada ao manejo do pasto, a suplementação da dieta é uma estratégia empregada para melhorar o desempenho animal, através da associação da quantidade e qualidade da forragem disponível, e da quantidade e características do suplemento fornecido (Reis et al., 2009).

Nas características dos suplementos fornecidos, opta-se por incluir aditivos para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes pelos animais. A utilização de aditivos como os ionóforos, antibióticos e inibidores metanogênicos na manipulação do ambiente ruminal tem sido alvo de estudos com o objetivo de melhorar a utilização dos nutrientes pelo animal e reduzir as perdas de energia na forma de metano. No entanto, a preocupação com possíveis resíduos desses aditivos em produtos de origem animal e possível resistência dos microrganismos (Tedeschi et al., 2011; Clark et al., 2012), tem levado alguns países como os da União Europeia a restringir o seu uso (Hristov et al., 2013) e estimular a utilização de produtos naturais, como os aditivos fitogênicos (Ahnert et al., 2015; Adamczyk et al., 2017a; Aboagye et al., 2018; Aboagye et al., 2019).

Os aditivos fitogênicos envolvem compostos secundários de plantas, como óleos essenciais e taninos. Em função da variedade de estruturas químicas que podem ser construídas a partir das unidades básicas formadoras dos

taninos, os resultados verificados na modulação do ambiente ruminal e desempenho animal são variados e inconsistentes.

Além disso, pode haver a ocorrência dos dois grupos de taninos em uma mesma planta e em concentrações diferentes de acordo com a parte da planta (Waghorn, 2008), mas algumas plantas podem possuir predominantemente os taninos hidrolisáveis, enquanto outras, os taninos condensados, gerando uma grande variedade de estruturas químicas (Adamczyk et al., 2017a) sendo necessário a realização de análise para verificar o tipo de tanino encontrado em determinada parte da planta selecionada.

Em geral, os taninos exercem efeitos na fermentação ruminal, como redução na degradação de proteína no rúmen, redução na produção de metano e podem, ainda, melhorar o ganho de peso (Cieslak et al., 2012). Em dietas com alta concentração de proteína degradável no rúmen, o potencial dos taninos pode ser um efeito benéfico, pois pode melhorar a utilização do nitrogênio e, assim, reduzir as perdas de nitrogênio na urina (Ebert et al., 2017).

Com efeitos semelhantes no metabolismo ruminal, os óleos essenciais não são lipídeos verdadeiros, e são provenientes do metabolismo secundário das plantas (Benchaar et al., 2008), proporcionando modulação do ambiente ruminal, sem efeitos na digestibilidade da matéria seca, e com aumento na retenção de nitrogênio e síntese de proteína microbiana (Soltan et al., 2018), e redução na excreção de nitrogênio urinário (Oh et al., 2019).

A utilização desses compostos fitogênicos pode apresentar benefícios na nutrição de ruminantes. No entanto, a oferta de forrageiras ou plantas ricas em taninos para os animais no cocho ou a consorciação com gramíneas apresenta dificuldades de manejo, logística e custo. Logo, a oferta destes compostos via aditivo em suplemento constitui-se em uma opção prática para redução dos impactos ambientais e aumentar a eficiência de uso do N em sistemas de produção de bovinos de corte, proporcionando intensificação sustentável da pecuária de corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Manejo de Pasto

A gestão do manejo de pasto permite a garantia de disponibilidade de forragem em quantidade e qualidade suficientes para atender o metabolismo dos microrganismos ruminais e do animal, atendendo os requerimentos de manutenção, crescimento e reprodução, ao longo de toda vida do animal, em períodos com fatores edafoclimáticos favoráveis ao desenvolvimento da planta.

Tendo em vista alcançar metas produtivas superiores, o fornecimento de nutrientes limitantes por meio da suplementação da dieta proporciona o atendimento das exigências dos animais, e a intensificação do sistema de produção a pasto proporciona, ainda, menor emissão de gases do efeito estufa, tanto por quilograma de carne produzida quanto por emissões totais, causada pelo aumento na captação do dióxido de carbono atmosférico (CO₂) no solo em sistemas de produção em que são utilizadas as gramíneas tropicais (Soussana et al., 2010).

Em condições de pastejo, o consumo de matéria seca será definido pela habilidade do animal em colher a forragem, expressa pelos fatores não-nutricionais, e é altamente influenciada pela estrutura do dossel forrageiro e o comportamento ingestivo do animal. Posteriormente, fatores relacionados a digestibilidade da forragem, taxa de passagem e produtos gerados no metabolismo são os fatores nutricionais responsáveis pela modulação da ingestão de forragem (Poppi et al., 1987).

Dessa forma, o ajuste na intensidade do pastejo é o princípio básico para obter, simultaneamente, ganhos em qualidade e quantidade de forragem, e como resultado, maiores ganhos por animal e por área. Como consequência do aumento da taxa de lotação ocorre redução na altura do pasto e na massa de forragem (Barbero et al., 2014). Logo, esse aumento na intensidade de pastejo pode afetar o valor nutritivo da forragem (Vendramini et al., 2013).

O ganho por animal pode ser maximizado em condições de sub pastejo, em que a seletividade da forragem pelo animal é maior em função da baixa taxa de lotação. Nessas condições, o ganho por área é reduzido e à medida que há incrementos na taxa de lotação visando aumentar o ganho por área, o ganho

máximo por animal não é permitido. Em contraste, em condições em que a taxa de lotação foi 1,5 vezes superior àquela considerada pressão ótima de pastejo, ocorreu o super pastejo, e o ganho por área foi nulo, em função do baixo desempenho por animal (Mott, 1960).

A alteração da estrutura do pasto influenciada pelo manejo irá determinar a facilidade com que o animal apreende a forragem (Carvalho et al., 2005). Pastos manejados mais altos, com elevadas massas de forragem proporcionam maior número de refeições, de menor duração cada uma, com qualidade superior em função da maior seletividade fornecida (Carvalho, 2005), e maior intervalo entre as refeições, direcionando tempo para outras atividades como ruminação e descanso. Situações de pastos manejados em alturas baixas se observa o contrário.

Em pastagens tropicais manejadas em sistema de lotação contínua (capim marandu), a altura de manejo avaliada em 10, 20, 30 e 40 cm esteve estreitamente associada à massa do bocado, a taxa de bocado e a ingestão de matéria seca, com a variação no consumo de 1,3 a 2,0% PC para as alturas de 10 e 40 cm (Sarmento, 2003).

Em sistemas de lotação contínua, a altura de 25 cm foi a mais indicada para *Urochloa brizantha* cv. Marandu por proporcionar melhorias nas características de estrutura, e consequentemente, na oferta de forragem e qualidade (maior teor de proteína bruta). Nessas condições, avaliando altura de 35 cm, os autores observaram aumento nos teores de fibra, em consequência ao espessamento da parede celular (Casagrande et al., 2011). Ressalta-se, ainda, a importância dos fatores climáticos influenciando mudanças na estrutura do dossel forrageiro e na massa de forragem, pois esses são diretamente relacionados com o consumo e o desempenho (Casagrande et al., 2011; Oliveira et al., 2014).

O aumento da espessura da parede celular pode estar relacionado com o aumento na proporção de bainha parenquimática dos feixes vasculares em pastos avaliados com altura de 35 cm, enquanto que em pastos com altura de 15 e 25 cm há maior proporção de mesófilo do que em pastos com 35 cm de altura (Basso et al., 2011), e a proporção de mesófilo está positivamente relacionado com a digestibilidade (Queiroz et al., 2000).

Em pastejo contínuo, a interceptação luminosa (IL) de 95% permite o maior acúmulo líquido de forragem e alta taxa fotossintética (Brougham, 1956; Parsons et al., 1988). Aliado ao manejo de pasto adequado, o fornecimento estratégico de suplemento concentrado auxilia no aumento do desempenho animal, possibilitando aumento também na taxa de lotação (Reis et al., 2009), resposta essa que está diretamente dependente das características da forragem consumida e do suplemento utilizado. Além disso, a espécie forrageira, adubação e a época do ano também influenciam nessas respostas.

O consumo de forragem e o consumo de suplemento podem apresentar interações e proporcionar respostas diferentes no animal, como: i) efeito aditivo: o consumo de forragem permanece constante em virtude do consumo de suplemento, e o consumo total é aumentado no mesmo nível em que o suplemento foi fornecido; ii) efeito combinado: ocorre redução no consumo de forragem, com aumento no consumo total; iii) efeito substitutivo: o consumo de suplemento causa redução no consumo de forragem na mesma proporção em que é consumido, mantendo o consumo total constante (Moore, 1980).

A escolha do suplemento deve estar associada as características da forragem, pois de acordo com Poppi e McLennan (1995) a eficiência de transferência da proteína ingerida para o intestino é dependente da relação entre o teor de proteína bruta da forragem e a quantidade de matéria orgânica digestível (MOD). Quando esses valores são inferiores a 160 g de PB/kg MOD, ocorre a transferência com maior eficiência, e quando excedem 210 g de PB/kg MOD, ocorrem perdas e/ou transferência incompleta. Em pastos tropicais, valores maiores que 210 g de PB/kg MOD são encontrados em sistemas de produção intensivos, em que a forragem é adubada, e os valores de proteína bruta são superiores a 14% (Santos et al., 2005; Ferrari, 2019; Hoffmann, 2019).

Pastos de *Urochloa brizantha* cv. Marandu manejados em pastejo contínuo com taxa de lotação variável, manejados em altura de 25 cm, promoveram aumento no ganho por área e por animal quando associados a suplementos proteico-energéticos (Oliveira, 2014).

Ainda, Koscheck (2016) observou maior ganho médio diário de carcaça em pastos manejados a 15 cm de altura e com fornecimento de suplemento 0,6% PC, enquanto que ganhos semelhantes foram obtidos em pastos manejados a 25 cm de altura e suplemento proteico-energético fornecido a

0,3% PC. Dessa forma, busca-se eficiência no manejo de pasto para adequar a quantidade e característica do suplemento que melhor atenda as condições.

A associação do manejo de pasto com a suplementação estratégica permite maior ganho por área em pastos mais baixos e com maiores níveis de suplementação quando comparados com pastos mais altos e com baixa dose de suplementação, pois para reduzir a altura do dossel forrageiro, é necessário aumentar a taxa de lotação (Barbero et al., 2015).

2.2. Aditivos fitogênicos na alimentação de ruminantes

Os aditivos fitogênicos envolvem compostos secundários de plantas, como taninos e óleos essenciais. Os taninos eram vistos, inicialmente, apenas de forma negativa como fator antinutricional por causar redução no consumo de alimento e utilização dos nutrientes (Kumar e Vaithiyanathan, 1990). Os taninos são polímeros fenólicos solúveis em água, com potencial para formarem complexos com proteína e com polissacarídeos como o amido, celulose, hemicelulose e pectina (Smith et al., 2005), devido à presença de grupos fenólicos hidroxila (Patra e Saxena, 2011).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas e são compostos lipofílicos voláteis, extraídos das plantas por tratamento a vapor ou solventes, e não são lipídeos verdadeiros (Benchaa et al., 2008).

Os óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas (Calsamiglia et al., 2007) e assim como os taninos, apresentam variações no modo de ação em função da composição química, a qual pode ser influenciada por fatores genéticos (Morais, 2009), local encontrado na planta (folhas, flores, caule, sementes, raízes e caule), idade da planta e ambiente em que a planta cresce (Benchaa et al., 2008), sazonalidade e horário de coleta (Morais, 2009).

2.2.1. Taninos na alimentação de ruminantes

O potencial de ação dos taninos é influenciado pela dose utilizada, a composição da dieta, espécie animal, *status* fisiológico do animal e estrutura química dos taninos e esses são fatores determinantes para que os diferentes tipos de taninos tenham potencial para proporcionar tanto efeitos benéficos,

como adversos no metabolismo ruminal, e consequentemente, no desempenho animal (Mueller-Harvey, 2006), o que proporciona uma vasta discrepância de resultados obtidos com a utilização dos taninos na alimentação de ruminantes.

De acordo com a estrutura e reatividade, os taninos podem ser divididos em taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados têm maior peso molecular (1.900-28.000 Da), e são principalmente polímeros de flavonóides (unidades de flavan-3-ol(epi) catequina e (epi) galocatequina) e monômeros, como profisetidininas, probinetidininas e proguibortinidininas, unidos por ligações interflavonoides (Ferreira et al., 1999; Mueller-Harvey et al., 2019). O número de unidades monoméricas determinará o grau de polimerização dos taninos condensados, e assim, indicará a estrutura química e as propriedades biológicas fornecidas por eles (Waghorn, 2008).

Os taninos hidrolisáveis possuem menor peso molecular (500-3.000 Da) do que os taninos condensados e tem como núcleo central da estrutura uma molécula com múltiplos grupos hidroxila (poliol), como a glicose, glucitol, ácido quínico e ácido chiquímico, ligados, parcialmente ou totalmente, por ligação éster a um composto fenólico, como o ácido gálico, formando os galotaninos (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) e elagitaninos (dímero do ácido gálico, ácido hexa-hidroxidifênico). Devido a essa estrutura, os taninos hidrolisáveis estão propensos à hidrólise por ácidos, bases ou esterases (Haslam, 1989).

A complexidade dos taninos hidrolisáveis é determinada pelo tipo e número de compostos fenólicos esterificados ao núcleo de carboidrato, determinando, consequentemente, a atividade da molécula (Salminen J-P e Karonen, 2011).

Os taninos condensados e os hidrolisáveis podem reduzir a fermentação de grãos como o trigo e o milho (Martínez et al., 2006), visto que o efeito dos taninos é dependente do tipo de grão, em função da arquitetura do endosperma, alterando a reatividade dos taninos.

Os taninos condensados podem reduzir a degradabilidade da proteína no rúmen por se ligar à proteína da dieta. A formação do complexo tanino-proteína pode ser feita, ainda, com a proteína microbiana, da mucosa e proteína endógena (Aboagye e Beauchemin, 2019).

O complexo tanino-proteína é reversível se for uma ligação não-covalente (hidrogênio e hidrofóbica; Jerónimo et al., 2016) e é formado pela ligação entre

os compostos, a agregação, e posteriormente, a formação do precipitado (Kawamoto et al., 1995, citado por Adamczyk et al., 2017a), são estáveis e insolúveis, em pH 3,5 a 7,0, e se dissociam e liberam proteína a pH <3,5 (Jones e Mangan, 1977), evidenciando que o pH é um fator determinante na reação reversível do complexo formado.

Os taninos hidrolisáveis também podem interagir com as proteínas e formar ligações de hidrogênio entre o grupo fenólico do tanino e o grupo carboxila da cadeia de proteína. A força dessa ligação, determinará a resposta do tanino na digestibilidade da proteína (Mueller-Harvey, 2006). No entanto, quando ocorre a despolimerização dos taninos hidrolisáveis em subunidades monoméricas de baixo peso molecular no rúmen, a afinidade dessas subunidades com a proteína é mais fraca (Field e Lettinga, 1992; Costa et al., 2018), proporcionando menor adsorção, quando comparada com a afinidade verificada pelos taninos condensados.

A ligação éster entre a glicose e o composto fenólico pode ser clivada por microrganismos ruminais, por meio das enzimas tanil-acil-hidrolases e esterases (McSweeney et al., 2001). Dessa forma, os taninos hidrolisáveis podem ser facilmente absorvidos no trato digestivo, e isso proporciona maior potencial para causar toxicidade no animal (McLeod, 1974), principalmente quando ocorre a ingestão de altas concentrações de taninos hidrolisáveis, pois pode provocar a liberação de metabólitos no rúmen, e conseqüentemente, danos celulares (Murdiati et al., 1992). Todavia, quando consumidos em concentrações baixas a moderadas podem proporcionar efeitos benéficos (Reed, 1995).

A maior afinidade com os taninos, em geral, é vista por compostos nitrogenados com massas de maior peso molecular (Tavendale et al., 2005) e estruturas com mais grupos aminas. Os taninos formam precipitados com outros compostos nitrogenados além das proteínas e peptídeos, como com a arginina, bases nitrogenadas, poliaminas, quitina e quitosanas (Adamczyk, et al., 2011). Assim, os taninos podem reagir com compostos nitrogenados orgânicos não proteicos de forma semelhante à reação com proteínas (Adamczyk et al., 2017a).

As diferentes concentrações de taninos podem causar efeitos adversos quando ligados a enzimas. Podem causar a inibição, mas também a modificação da atividade enzimática, visto esse efeito na formação do complexo tanino-enzima no solo. A atividade catalítica das enzimas pode ser aumentada,

em baixas concentrações de taninos, pois esse causa o aumento das estruturas em espiral das enzimas (Adamczyk et al., 2017b).

A possível inibição de enzimas extracelulares causada pela ação dos taninos condensados (Scalbert, 1991), pode ser uma das causas para a redução na digestão da forragem, pois sugere-se que ocorra inibição da digestão da celulose (Lyford et al., 1967).

A atividade extracelular da endoglucanase foi reduzida quase por completa quando 400 µg de taninos condensados/mL foram adicionados no meio de cultivo da bactéria *Fibrobacter succinogenes* S85, por meio da formação de complexos tanino-enzima e inibição no crescimento do número de células, sendo possível confirmar as propriedades bacteriostáticas dos taninos condensados (Bae et al., 1993). Os autores sugerem, ainda, interferência dos taninos no processo de adesão da bactéria *F. succinogenes* S85 à celulose, causado pela formação do complexo tanino-proteína na superfície da célula da bactéria.

Em consequência da formação do complexo tanino-proteína causado pela ação dos taninos condensados com a proteína da dieta, com a utilização dos taninos em dietas para ruminantes pode ser obtida a redução da degradação de proteína no rúmen e aumentar a quantidade de proteína digerida no intestino delgado (Patra e Saxena, 2011).

Assim os taninos teriam potencial para serem utilizados em dietas em que há o consumo de forragem de alta qualidade, com altas concentrações de nitrogênio, pois a proteína solúvel é disponibilizada durante a mastigação, e cerca de 56-65% da concentração de proteína no rúmen como proteína solúvel é liberada, aumentando a concentração de amônia, a qual será parcialmente absorvida pelo rúmen e excretada na urina (Ulyatt et al., 1975), contribuindo para aumento no impacto ambiental.

A excreção fecal de N é influenciada pela digestibilidade da fonte de proteína fornecida e pela ingestão de nitrogênio (Shuba et al., 2017). Com o consumo de taninos condensados, pode se observar a mudança na rota de excreção do nitrogênio, ocorrendo maior perda de N fecal, com redução na perda de N na forma volátil como N urinário (Ebert et al., 2017) e, conseqüentemente, menor emissão de amônia (Powell et al., 2011; Koenig et al., 2018), o que reduz a possibilidade de produção de N₂O (Whitehead, 1995), e conseqüentemente, diminuem os impactos ambientais.

Ainda que o complexo tanino-proteína não seja totalmente dissociado pelo baixo pH do abomaso, também será contabilizado como maior excreção de N fecal (Waghorn et al., 2008).

No rúmen, a redução na concentração de amônia ruminal também foi observada por Aboagye et al. (2018) com a inclusão de taninos hidrolisáveis, com e sem a adição de taninos condensados, nas doses de 0,25% e 1,5% da MS da dieta, em dietas de alta forragem. Apesar de se acreditar inicialmente que os taninos hidrolisáveis teriam maior potencial para causar toxidade no animal, estudos como esse comprovaram efeitos benéficos, semelhante aos encontrados com o uso dos taninos condensados, e ainda, esses efeitos podem ser evitados por adaptação gradual (Silanikove et al., 2000) e fornecimento de baixas concentrações (<5 g/ 100 g MS; Stewart et al., 2019).

Apesar do efeito dos taninos condensados na concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, inclusões de 4% e 6% de taninos condensados, proporcionaram redução na digestibilidade total aparente da fibra, da matéria seca e da matéria orgânica no trato total (Ahnert et al., 2015). A redução na digestibilidade da fibra com a inclusão de maiores níveis de taninos condensados pode reduzir o fornecimento de ácidos graxos de cadeia curta aos animais, e a síntese de proteína microbiana, em função da redução na disponibilidade de energia (Ahnert et al., 2015).

O aumento do fluxo de proteína não degradável no rúmen também pode prejudicar a síntese de proteína microbiana, sendo necessário atender primeiramente as exigências de proteína degradável no rúmen, justificando os diferentes efeitos dos taninos dependentes das fontes de alimentos proteicos utilizados na dieta. Dessa forma, o fluxo de proteína metabolizável pode não ser aumentado com o uso dos taninos (MacAdam e Villalba, 2015).

A redução na produção de CH₄ pode ocorrer e pode ser por efeito direto dos taninos nos microrganismos ruminais, e indiretamente na digestão da fibra, reduzindo a produção de hidrogênio que é substrato para as Archaeas metanogênicas (Tavendale et al., 2005) e por inibição de protozoários associados à produção de metano (Cieslak et al., 2012). Ainda, observa-se que os taninos hidrolisáveis exercem efeito tóxico nas metanogênicas (Jayanegara et al., 2015).

A suplementação com *Vaccinium vitisidaea* (2 g de tanino/kg MS) para vacas leiteiras corrobora com esses efeitos, a qual resultou em redução de 45,9% e 8,5% nas concentrações de amônia total e metano, respectivamente (Cieslak et al., 2012).

A menor perda de energia na forma de metano no rúmen pode ser aproveitada para incrementos no desempenho animal, mas isso é dependente de diversos fatores desde o consumo e a digestibilidade dos nutrientes não serem afetados negativamente, até a eficiência de conversão da energia metabolizável em energia líquida para ganho.

Caso a rota alternativa para utilização do H₂ disponível no rúmen não puder ser utilizada como substrato na produção de energia pelos animais (por exemplo, formato ou H₂ gasoso) pode haver redução na produção de CH₄ sem proporcionar aumento no ganho de peso dos animais (Aboagye e Beauchemin, 2019). Ainda, ressalta-se que em casos que a redução na produção de metano é associada à redução na digestibilidade da matéria orgânica, o desempenho dos animais pode ser negativamente afetado (Jayanegara et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que os taninos podem reduzir a produção de CH₄ entérico (Beauchemin et al., 2007; Aboagye et al., 2018) e estudos recentes comprovam o potencial dos taninos hidrolisáveis para esse efeito (Jayanegara et al., 2015; Yang et al., 2017; Stewart et al., 2019), sem impactar negativamente a digestibilidade (Aboagye et al., 2019). Dessa forma, justifica-se a avaliação do uso de taninos hidrolisáveis via suplemento associado com pastos de alta qualidade e seus efeitos no desempenho animal e emissões de metano entérico.

Ainda, Jayanegara et al. (2012) avaliaram 30 experimentos *in vivo* em uma meta-análise, na qual observaram redução na produção de CH₄ apenas com a inclusão de tanino maior que 2% da MS da dieta. No entanto, altas concentrações como essas podem afetar negativamente a ingestão de matéria seca e a digestibilidade dos nutrientes.

Efeitos de redução no consumo de matéria seca foram verificados com o fornecimento de taninos condensados para ovinos, contrariamente do verificado com o fornecimento de taninos hidrolisáveis fornecidos na mesma dose (100 g/kg MS), confirmando o maior efeito inibitório dos taninos condensados do que dos taninos hidrolisáveis, o que foi associado parcialmente a menor

palatabilidade das dietas com extratos de taninos condensados e, possivelmente, a menor digestibilidade da matéria seca (Costa et al., 2018). A redução no consumo de alimento tem sido observada apenas com a inclusão de tanino condensado em mais de 3% da MS (Makkar, 2003).

A ingestão de alimento do animal é um dos principais fatores que determinam a composição estrutural e a função do microbioma ruminal. Os microrganismos mais ativos no ambiente ruminal são as bactérias e as Archaeas, as quais estão associadas a atividades metabólicas importantes (Henderson et al., 2015), como a degradação de fibra e proteínas vegetais ingeridos pelos ruminantes e produção de CH₄ entérico (Brulc et al., 2009).

Os taninos condensados podem afetar o crescimento e inibir a atividade dos microrganismos ruminais através da ligação com as lipoproteínas da membrana, o que causa a redução na permeabilidade da mesma, e ainda, quando consumidos em alta concentração, podem causar a ruptura das membranas (Smith et al., 2005).

A atividade proteolítica das células de bactérias como *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Streptococcus bovis* podem ser inibidas pela ação dos taninos condensados que penetram a parede celular dessas bactérias e reagem com os componentes estruturais da célula, ligando-se aos polímeros de revestimento das células em crescimento (Jones et al., 1994). As subunidades monoméricas dos taninos hidrolisáveis também podem causar toxicidade sobre as bactérias no rúmen por provocar distúrbios na fluidez da membrana (Scalbert, 1991).

A redução na fluidez da membrana através do enriquecimento da membrana lipídica com ácidos graxos trans insaturados é uma resposta adaptativa das bactérias devido à presença de substâncias consideradas tóxicas (Keweloh e Heipieper, 1996).

Assim como observado por Bae et al. (1993), em que a adição de taninos condensados em meio de cultivo de bactérias *Fibrobacter succinogenes* causou inibição no crescimento do número de células, Costa et al. (2018) verificaram redução na abundância de bactérias fibrolíticas como *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* e *B. proteoclasticus* no rúmen de ovinos que receberam taninos condensados em comparação ao fornecimento de taninos hidrolisáveis na mesma dose (100 g/kg MS). No entanto, Jayanegara et al. (2015) reportaram menor abundância de *R. flavefaciens* com o fornecimento de taninos

hidrolisáveis do que com o fornecimento de taninos condensados, e redução similar na abundância de *F. succinogenes*.

Os taninos hidrolisáveis podem ter a subunidade ácido gálico e os seus metabólitos pirogalol, resorcinol e floroglucinol hidrolisados por microrganismos do rúmen em acetato e butirato para gerar energia (McSweeney et al., 2001).

As divergências verificadas nesses estudos demonstram a dificuldade de comparação entre os estudos em função das doses de taninos e o modelo experimental utilizados.

A bactéria *F. succinogenes* é uma bactéria Gram-negativa e sua sensibilidade aos taninos condensados já foi bem documentada (Bae et al., 1993; McSweeney et al., 2001), e, aliada à maior abundância no número de cópias 16S rRNA com a utilização de taninos hidrolisáveis quando comparado com taninos condensados (Costa et al., 2018), demonstra a necessidade da escolha do tipo de tanino a ser utilizado em animais em sistema de pastejo.

Visto a divergência de resultados encontrados na literatura com taninos hidrolisáveis e taninos condensados, é notável que os efeitos negativos causados pelos taninos são dependentes das concentrações utilizadas, pois os dois tipos de taninos podem causar efeitos benéficos e adversos nos animais (Aboagye e Beauchemin, 2019).

2.2.2. Óleos essenciais na alimentação de ruminantes

Os efeitos dos óleos essenciais são influenciados pelas variações de composição química, doses utilizadas e associações entre dois ou mais óleos essenciais, além das diferenças de experimentos *in vitro* vs *in vivo* que dificultam a avaliação e comparação entre estudos. Em experimentos *in vitro*, verificou-se a redução na concentração de amônia ruminal com a inclusão de óleos essenciais provenientes da casca de canela e folhas de orégano (Cobellis et al., 2016b), e óleo essencial de cravo, juntamente com óleos de canela e orégano (Busquet et al., 2006).

Em contraste, em experimento *in vivo*, a inclusão de *blend* composto por timol, guaiacol, eugenol, vanilina, salicilaldeído e limoneno não influenciou a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (Vendramini et al., 2016).

Animais em pastos de capim marandu durante o período das águas, consumindo suplemento proteico de baixo consumo (0,1% PC/dia) e *blend* comercial de óleos essenciais obtiveram ganho adicional de 0,070 kg/dia em relação aos animais que não receberam aditivo. No entanto, animais que receberam monensina como aditivo ganharam 0,130 kg/dia a mais que os animais suplementados com óleos essenciais (Fernandes et al., 2012).

Resultados semelhantes foram verificados por Souza et al. (2014) em que houve ganho adicional de 0,180 kg/dia com a inclusão de óleos essenciais de caju e mamona em suplemento mineral para bovinos Nelore em pasto de capim marandu, no período seco do ano. Resultados como esses demonstram o potencial dos óleos essenciais em melhorar o desempenho de bovinos de corte a pasto. No entanto, a eficiência para substituir aditivos ionóforos ainda não é bem documentada.

O não comprometimento do desempenho dos animais pode ser documentado visto que a utilização de *blend* de óleos essenciais composto por carvacrol, eugenol e timol, na dose de 35 g/cab/dia para vacas leiteiras (Oh et al., 2019) e *blend* contendo óleos essenciais de tomilho, cravo e canela (0,8 e 1,6 mL/cab/dia) não tiveram efeito na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro em ovinos (Khateri et al., 2017).

O efeito na digestibilidade da FDN em animais em pastejo pode ser vista de forma negativa, em que maior dose de óleos essenciais, 300 mg/kg MS consumida, (*blend* de óleo de copaíba, de mamona e de castanha de caju), mas também pode ser estimulada pelo consumo de menor dose 150 mg/kg MS. Ainda, quando fornecida a menor dose, os animais apresentaram melhor eficiência na utilização do nitrogênio (Teobaldo et al., 2020).

Em contraste, a suplementação com *blend* de óleos essenciais de capim-limão, hortelã-pimenta e de alho, um *blend* comercial óleo de casca de castanha de caju, óleo de mamona e óleo de copaíba não afetou o consumo de MS e a digestibilidade dos nutrientes (Wanapat et al., 2013; De Jesus et al., 2016; Moura et al., 2017).

Os óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas, e de acordo com cada tipo de óleo essencial, o modo de ação na membrana celular das bactérias é diferente. Em geral, os óleos essenciais têm ação na membrana

celular das bactérias, promovendo a sua desestabilização, e na tentativa de restabelecer o gradiente iônico da célula, o crescimento é reduzido. Essa alteração na população microbiana do rúmen provoca mudanças no perfil de fermentação (Calsamiglia et al., 2007).

Compostos como timol e carvacrol não inibem seletivamente bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Calsamiglia et al., 2007). A interação de compostos como o carvacrol com a membrana celular de bactérias Gram-negativas pode provocar a perda de conteúdo celular e lise da célula (Cobellis et al., 2016a). A ação do carvacrol na membrana celular microbiana é atribuída à presença do grupo carbonila, o qual inativa enzimas na membrana da célula (Benchaar e Greathead, 2011). Esse fato demonstra que apesar dos óleos essenciais terem maiores efeitos em bactérias Gram-positivas (Helander et al., 1998), algumas especificidades são vistas, e as bactérias que sofrerão a ação dos óleos essenciais são dependentes do composto ou do *blend* utilizado.

No entanto, os microrganismos ruminais podem desenvolver resposta adaptativa aos óleos essenciais quando utilizados em baixos níveis (Benchaar et al., 2008), dessa forma, o efeito dos óleos essenciais ao longo do tempo pode ser perdido.

Da mesma forma, doses elevadas podem inibir a fermentação ruminal (Calsamiglia et al., 2007), como proposto por Busquet et al. (2005a), em que a adição de óleo de alho *in vitro* na dose de 300 mg/L, em cultura contínua de 24 horas, reduziu a concentração de ácidos graxos voláteis totais, e quando utilizada a dose acima de 312 mg/L, não verificaram efeitos sobre os ácidos graxos voláteis, visto que os efeitos na fermentação microbiana ruminal desapareceram após 6 dias do início da incubação (Busquet et al., 2005b).

O fornecimento contínuo de um *blend* de óleos essenciais composto por eugenol, acetato de geraniol e óleo de coentro na dose 0,17 g/kg MS corrobora com esses resultados, em que o maior efeito na mitigação de metano foi observado nas duas primeiras semanas em comparação a quinta semana de fornecimento, indicando adaptação dos microrganismos ao *blend* de óleos essenciais (Klop et al., 2017).

Alguns efeitos verificados em estudos *in vitro* e não verificados *in vivo* podem ser devido ao tempo de exposição da microbiota ruminal aos óleos

essenciais, gerando adaptação dos microrganismos e/ou até mesmo a degradação dos compostos (Benchaar e Greathead, 2011).

Resultados discrepantes são encontrados com o uso dos óleos essenciais e seus compostos na alimentação de ruminantes e são difíceis de serem preditos devido à complexidade do ambiente ruminal e a interação desses compostos com os microrganismos ruminais e a fermentação da dieta. Além disso, quando fornecidos em forma de *blend* podem apresentar efeitos sinérgicos e antagônicos. Esses efeitos podem ser vistos pela ação juntamente com os compostos fenólicos dos taninos. No entanto, não há estudos na literatura com essa mistura de compostos.

3. REFERÊNCIAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil**, 2020.

Aboagye IA, Beauchemin KA (2019) Potential of Molecular Weight and Structure of Tannins to Reduce Methane Emissions from Ruminants: A Review. **Animals** 9:856.

Aboagye IA, Oba M, Castillo AR, Koenig KM, Iwaasa AD, Beauchemin KA (2018) Effects of hydrolyzable tannin with or without condensed tannin on methane emissions, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. **Journal of Animal Science** 96:5276-5286.

Aboagye IA, Oba M, Koenig KM, Zhao GY, Beauchemin KA (2019) Use of gallic acid and hydrolyzable tannins to reduce methane emission and nitrogen excretion in beef cattle fed a diet containing alfalfa silage. **Journal of Animal Science** 97:2230-2244.

Adamczyk B, Adamczyk S, Smolander A, Kitunen V (2011) Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. **Soil Biology & Biochemistry** 43:628-637.

Adamczyk B, Karonen M, Adamczyk S, Engström MT, Laakso T, Saranpää P, Kitunen V, Smolander A, Simon J (2017b) Tannins can slow-down but also speed-up soil enzymatic activity in boreal forest. **Soil Biology & Biochemistry** 107:60-67.

Adamczyk B, Simon J, Kitunen V, Adamczyk S, Smolander A (2017a) Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. **Chemistry Open** 6:610 – 614.

Ahnert S, Dickhoefer U, Schulz F, Susenbeth A (2015) Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. **Livestock Science** 177:63-70.

Bae HD, Mcallister TA, Yanke J, Cheng KJ, Muir AD (1993) Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied and Environmental Microbiology** 59(7):2132-2138.

Barbero RP, Barbosa MAFB, Castro LM, Ribeiro ELA, Mizubuti IY, Bumbieris Júnior VH, Silva LDF, Massaro Júnior FL (2014) Desempenho de novilhas de corte em pastos de capim-tanzânia sob quatro alturas de desfolha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66:481-488.

Barbero RP, et al. (2015) Combining Marandu grass grazing height and supplementation level to optimize growth and productivity of yearling bulls. **Animal Feed Science and Technology** 209:110-118.

Basso KC, Lempp B, Baldi F, Azenha MV, Oliveira AA, Reis RA. Anatomia foliar do capim marandu submetido a alturas de pastejo sob lotação contínua. In: **Proceedings of the III International Symposium on Forage Breeding**, November 7th to 11th, 2011 / Bonito, MS / Brazil.

Beauchemin KA, McGinn SM, Martinez TF, McAllister TA (2007) Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science** 85:1990–1996.

Benchaaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister, TA, Beauchemin KA (2008) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology** 145:209–228.

Benchaaar C, Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 166:338-55.

Brougham, RM (1956) Effects of intensity of defoliation on regrowth of pastures. **Australian Journal of Agricultural Research** 7(5):377-387.

Bulc JM, Antonopoulos DA, Miller MEB, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, et al (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America** 106(6):1948–1953.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Cardozo PW, Kamel C (2005b) Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science** 88:2508–2516.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD, Kamel C (2005a) Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science** 88:4393–4404a.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2006) Plant extracts effect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science** 89:761-771.

Callaway TR, Edrington TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS, Bischoff KM, Anderson RC, Nisbet DJ (2003) Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology** 4:43-51.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A (2007) Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science** 90:2580–2595.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren AM (2010) Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal** 4:1184–1196.

Cardoso AS, Barbero RP, Romanzini EP, Teobaldo RW, Ongaratto F, Fernandes MHMR, Ruggieri AC, Reis RA (2020) Review – Intensification: A key strategy to achieve great animal and environmental beef cattle production sustainability in *Brachiaria* grasslands. **Sustainability** 12:6656.

Carvalho PCF, Moraes A. Comportamento ingestivo de ruminantes: bases para o manejo sustentável do pasto. In: Simpósio sobre Manejo Sustentável das Pastagens, Maringá. **Anais...CD-ROM**. 2005.

Carvalho PCF, Ribeiro Filho HMN, Poli CHEC, et al. Importância da estrutura da pastagem na ingestão e seleção de dietas pelo animal em pastejo. In: Mattos, W. R. S. (Org.). A produção animal na visão dos brasileiros. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, 2001, p.853-871. 2001.

Casagrande DR, Azenha MV, Valente ALS, Vieira BR, Moretti M, Ruggieri AC, Berchielli TT, Reis RA (2011) Estrutura do dossel e comportamento de novilhas nelores recebendo suplementação em pastagem de capim-marandu manejada em lotação contínua com três intensidades de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40(11):2294-2301.

Cieslak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E, Szumacher-Strabel M (2012) Effects of tannins source (*Vaccinium vitis-idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. **Animal Feed Science and Technology** 176:102-106.

Clark S, Daly R, Jordan E, Lee J, Mathew A, Ebner P (2012) The future of biosecurity and antimicrobial use in livestock production in the United States and the role of extension. **Journal Animal Science** 90:2861–2852.

Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC, Yu Z (2016b) Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. **Animal Feed Science and Technology** 215:25-36.

Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Yu Z (2016a) Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. **Science of the Total Environment** 545:556-568.

Costa M, Alves SP, Cappucci A, Cook SR, Duarte A, Caldeira RM, McAllister TA, Bessa RJB (2018) Effects of condensed and hydrolysable tannins on rumen metabolism with emphasis on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66:3367-3377.

Da Silva SC, Gimenes FMA, Sarmiento DO, Sbrissia AF, Oliveira DE, Hernandez-Garay A, Pires AV (2013) Grazing behaviour, herbage intake and animal performance of beef cattle heifers on Marandu palisade grass subjected to

intensities of continuous stocking management. **Journal of Agricultural Science** 151:727–739.

De Jesus EF, Del Valle TA, Calomeni GD, Silva TH, Takiya CS, Vendramini THA, Paiva PG, Silva GG, Netto AS, Rennó FP (2016) Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 219:59–67.

Delevatti LM, Cardoso AS, Barbero RP, Leite RG, Romanzini EP, Ruggieri AC, Reis RA (2019) Effect of nitrogen application rate on yield, forage quality, and animal performance in a tropical pasture. **Scientific Reports** 9:7596.

Dijkstra J, Oenema O, Van Groenigen JW, Spek JW, Van Vuuren AM, Bannink A (2013) Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal** 7(2):292–302.

Ebert PJ, Bailey EA, Shreck AL, Jennings JS, Cole NA (2017) Effect of condensed tannin extract supplementation on growth performance, nitrogen balance, gas emissions, and energetic losses of beef steers. **Journal of Animal Science** 95:1345–1355.

Fernandes RM, Siqueira GR, Roth MT, Moretti MM, Resende FD, Campos WC (2012) Aditivos manipuladores da fermentação ruminal na suplementação protéica de bovinos Nelore durante a recria. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 49, Brasília, 2012. **Anais...** Brasília: SBZ, 2012, CD-ROM.

Ferrari AC (2019) **Aportes nutricionais na recria a pasto e sistemas na terminação de tourinhos Nelore: metabolismo, desempenho e qualidade da carne**. 150p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP.

Ferreira D, Brandt EV, Coetzee J, Malan E (1999) Condensed tannins. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products** 77:22–59.

Field JA, Lettinga G (1992) Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In Plant Polyphenols; Hemingway, R. W., Laks, P. E., Eds. Plenum Press: New York, 1992; pp 673–692.

Haslam E (1989) **Plant Polyphenols**. Cambridge University Press, Cambridge.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright AV (1998) Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry** 46:3590–3595.

Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH (2015) Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports** 5(April):14567.

Hodgson, J. **Grazing management: science into practice**. Ed. Longman Scientific & Technical. 203p. 1990.

Hoffman A (2019) **Eficiência da Substituição do Farelo de Algodão por DDGS na Produção de Bovinos de Corte**. 84p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP.

Hristov AN, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, Firkins J, Rotz A, Dell C, Adesogan A, Yang W, Tricarico J, Kebreab E, Waghorn G, Dijkstra J, Oosting S (2013) **Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production – A review of technical options for non-CO₂ emissions**. Edited by Pierre J. Gerber, Benjamin Henderson and Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 177. FAO, Rome, Italy.

Jayanegara A, Goel G, Makkar HPS, Becker K (2015) Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. **Animal Feed Science and Technology** 209:60–68.

Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M (2012) Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition** 96:365–375.

Jerónimo E, Pinheiro C, Lamy E, Dentinho MT, Sales-Baptista E, Lopes O, Silva FC (2016) **Tannins in ruminant nutrition: Impact on animal performance and quality of edible products**. In Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties; Combs, C.A., Ed.; Nova Science Publisher Inc.: Hauppauge, NY, USA, p. 121–168.

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. 73: **Journal of Animal Science** 2483–2492.

Jones GA, McAllister TA, Muir AD, Cheng KJ (1994) Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 60(4):1374-1378.

Jones WT, Mangan JL (1977) Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein and their reversal by polyethylene glycol and pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 28:126–136.

Kardel M, Taube F, Schulz H, Schütze W, Gierus M (2013) Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts—review and new aspects. **Journal of Applied Botany and Food Quality** 86:154-166.

Keweloh H, Heipieper HJ (1966) Trans Unsaturated Fatty Acids in Bacteria. **Lipids** 31(2):129-137.

Khateri N, Azizi O, Jahani-Azizabadi H (2017) Effects of a specific blend of essential oils on apparent nutrient digestion, rumen fermentation and rumen microbial populations in sheep fed a 50:50 alfalfa hay:concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 30(3):370-378.

Klop G, Dijkstra J, Dieho K, Hendriks WH, Bannink A (2017) Enteric methane production in lactating dairy cows with continuous feeding of essential oils or rotational feeding of essential oils and lauric acid. **Journal Dairy Science** 100:3563-3575.

Koenig KM, Beauchemin KA, McGinn SM (2018) Feeding condensed tannins to mitigate ammonia emissions from beef feedlot cattle fed high-protein finishing diets containing distillers grains. **Journal of Animal Science** 96:4414-4430.

Koscheck JFW (2016) **Intensificação do manejo do pasto e uso da suplementação nos parâmetros produtivos na recria e terminação de bovinos de corte**. 122p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP.

Kumar R, Vaithiyathan S (1990) Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal Feed Science Technology** 30:21–38.

Lyford SJ, Jr. WWG, Smart Jr., Bell TA (1967) Inhibition of rumen cellulose digestion by extracts of *Sericea lespedeza*. **Journal Animal Science** 26:632-63.

MacAdam JW, Villalba JJ (2015) Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. **Agriculture** 5:475–491.

Makkar HPS (2003) Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin rich feeds. **Small Ruminant Research** 49:241– 256.

Martínez TF, McAllister TA, Wang Y, Reuter T (2006) Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 86:1244-1256.

McLeod NM (1974). Plant tannins - their role in forage quality. **Nutrition Abstracts & Reviews** 44:803–815.

McSweeney CS, Palmer B, Mcneill DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science Technology** 91:83–93.

Moore JE. Forage crops. In: HOVELAND, C.S. (Ed.). **Crop quality, storage, and utilization**. Madison: Crop Science Society of America, 1980.

Morais LAS (2009) Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira** 27:S4050- S4063.

Moura LV, Oliveira ER, Fernandes ARM, GabrielAMA, Silva LHX, Takiya CS, Cônsolo NRB, Rodrigues GCG, Lemos T, Gandra JR (2017) Feed efficiency and carcass traits of feedlot lambs supplemented either monensin or increasing doses of copaiba (*Copaifera* spp.) essential oil. **Animal Feed Science and Technology** 232:110–118.

Mueller-Harvey I (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 86:2010–2037.

Mueller-Harvey I, Bee G, Dohme-Meier F et al. (2019) Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. **Crop Science** 59:861–885.

Murdiati TB, McSweeney CS, Lowry JB (1992) Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid, and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. **Australian Journal of Agricultural Research** 43:1307–1319.

Oh J, Harper M, Hristov AN (2019) Effects of lowering crude protein supply alone or in a combination with essential oils on productivity, rumen function and nutrient utilization in dairy cows. **Animal** 1-9.

Oliveira AA. **Manejo do pasto de capim marandu e suplementação com diferentes fontes de energia na recria de tourinhos Nelore**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP, 2014. 121p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2014.

Parsons AJ, Chapman DF (1988) **The principles of pasture growth and utilization**. In: Hopkins, A. (Ed.). Grass: its production & utilization. Okehampton: British Grassland Society, 1988, p.31-80.

Patra AK, Saxena J (2011) Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition – Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91:24-37.

Poppi DP, Hugues JP, L’huillier PJ (1987) Intake of pasture by grazing ruminants. In: NICOL, A.M. (Ed.). **Feeding livestock on pasture**. New Zealand: Society of Animal Production, 1987. p.55-63.

Poppi DP, McLennan SR (1995) Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science** 73:278- 290.

Powell JM, Aguerre MJ, Wattiaux MA (2011) Tannin Extracts Abate Ammonia Emissions from Simulated Dairy Barn Floors. **Journal of Environmental Quality** 40:907–914.

Queiroz DS, Gomide JA, Maria J (2000) Avaliação da Folha e do Colmo de Topo e Base de Perfilhos de Três Gramíneas Forrageiras. 2. Anatomia1. **Revista Brasileira Zootecnia** 29(1):61-68.

Reed JD (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science** 73:1516–1528.

Reis RA, Ruggieri AC, Casagrande DR, Páscoa AG (2009) Supplementation of beef cattle as strategy of pasture management. **Revista Brasileira de Zootecnia** 38:147–159.

Salminen J-P and Karonen M (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology** 25:325–338.

Santos FAP, Pereira EM, Pedroso AM. Suplementação energética de bovinos de corte em confinamento. In: Simpósio De Bovinocultura De Corte, 5., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005.

Sarmiento DOL. **Comportamento ingestivo de bovinos em pastos de capim marandu submetidos a regime de lotação contínua.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 2003. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP, 2003.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** 30:3875-3883.

Schuba J, Südekum KH, Pfeffer E, Jayanegara A (2017) Excretion of faecal, urinary urea and urinary non-urea nitrogen by four ruminant species as influenced by dietary nitrogen intake: A meta-analysis. **Livestock Science** 198:82–88.

Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD (2000) Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 91:69–81.

Silva SC, Carvalho PCF. Foraging behaviour and intake in the favourable tropics/sub-tropics. In: McGiloway, D.A. (Ed.) **Grassland: a global resource.** Wageningen Academic Publishers, p.81-95. 2005.

Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI (2005) Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. **Microbial Ecology** 50:197–205.

Soltan YA, Natel AS, Araujo RC, Morsy AS, Abdalla AL (2018) Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend of essential oils: Ruminant fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and microbial protein synthesis. **Animal Feed Science and Technology** 237:8-18.

Soussana JF, Tallec T, Blanford V (2010) Mitigating the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. **Animal** 4:334-350.

Souza LR, Taveira RZ, Dib RT, Silveira Neto OJ (2014) Desempenho de bovinos Nelore suplementados com óleos essenciais de caju e mamona, mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **PUBVET**, Londrina, v.8, n.6, ed.255, art. 1692.

Stewart EK, Beauchemin KA, Dai X, MacAdam JW, Christensen RG, Villalba JJ (2019) Effect of tannin-containing hays on enteric methane emissions and nitrogen partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 97(8):3286-3299.

Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S (2005) Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science Technology** 123–124:403–419.

Tedeschi LO, Callaway TR, Muir JP, Anderson RC (2011) Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:291-309.

Teobaldo RW, De Paula NF, Zervoudakis JT, Fonseca MA, Cabral LS, Martello HF, Rocha JKL, Ribeiro IJ, Mundim AT (2020) Inclusion of a blend of copaiba, cashew nut shell and castor oil in the protein-energy supplement for grazing beef cattle improves rumen fermentation, nutrient intake and fibre digestibility. **Animal Production Science** 60:1039–1050.

Ulyatt MJ, Mcrae JC, Clarke TJ, Pearce PD (1975) Quantitative digestion of fresh forages by sheep. 4. Protein synthesis in the stomach. **Journal of Agricultural Science (Camb)** 84:453–458.

Vendramini JMB, Sollenberger LE, Blount AR, Aguiar AD, Galzerano L, Valente ALS, Alves E, Custodio L (2013). Bahiagrass cultivar response to grazing frequency with limited nitrogen fertilization. **Agronomy Journal** 105:938–944.

Vendramini THA, Takiya CS, Silva TH, Zanferar F, Rentas MF, Bertoni JC, Consentini CEC, Gardinal R, Acedo TS, Rennó FP (2016) Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 214:12-21.

Waghorn GC (2008) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology** 147:116–139.

Wanapat M, Kang S, Khejornsart P, Wanapat S (2013) Effects of plant herb combination supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility in beef cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 26:1127–1136.

Whitehead DC (1995) **Grassland nitrogen**. CAB Int., Wallingford, UK.

Yang K, Wei C, Zhao GY, Xu ZW, Lin SX (2017) Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 101:302-310.

CAPÍTULO 2 – CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E DESEMPENHO PRODUTIVO EM TOURINHOS NELORE EM PASTOS DE CAPIM MARANDU RECEBENDO SUPLEMENTO COM A INCLUSÃO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS

RESUMO – Objetivou-se avaliar o consumo e digestibilidade de nutrientes, emissão de CH₄ entérico e desempenho produtivo de tourinhos Nelore em pastos de capim Marandu recebendo suplemento energético ou suplemento mineral, sem ou com inclusão de aditivos fitogênicos, compostos por carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis, na dose de 1,5 g/kg de MS ingerida, durante o período das águas. A avaliação do desempenho foi realizada em 48 tourinhos Nelore, com peso corporal inicial médio de 211 kg $\pm$ 30,20 kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2, alocados em 12 piquetes (4 animais *testers*/piquete). O período de avaliação do desempenho foi de 102 dias (15 dias de adaptação a dieta e 87 dias de avaliações) e os tratamentos avaliados foram: 1 – Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos (SE); 2 – Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos (SEAF); 3 – Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos (SM); 4 – Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos (SMAF). Os suplementos energéticos foram fornecidos na quantidade de 0,3% do peso corporal e o suplemento mineral, com e sem inclusão dos aditivos fitogênicos, foram fornecidos *ad libitum*. A avaliação de consumo e digestibilidade dos nutrientes, e emissão de CH₄ entérico foram realizadas em 24 animais (6 animais/tratamento, sendo 2 animais/piquete), após a avaliação do desempenho produtivo. O peso corporal médio dos animais foi de 326 $\pm$ 38,27 kg e utilizou-se a técnica do traçador hexafluoreto de enxofre SF₆. Não houve interação suplemento e *blend* de aditivos fitogênicos sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes, emissão de CH₄ entérico e desempenho produtivo ($P > 0,05$). O consumo de MS total ($P = 0,015$), PB ($P = 0,012$), FDNcp ($P = 0,044$) e de energia ($P < 0,05$), a digestibilidade da MS ($P = 0,001$), PB ($P = 0,044$) e da energia ($P = 0,050$), e o GMD ($P = 0,013$), taxa de lotação ($P = 0,024$) e ganho por área ($P = 0,005$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético em comparação aos animais que consumiram suplemento mineral. A digestibilidade da MS ($P < 0,001$), FDNcp ($P = 0,025$) e da energia ($P = 0,023$) foram menores nos animais que consumiram aditivos fitogênicos. O consumo de suplemento energético proporcionou tendência de aumento na emissão de CH₄ entérico (g/dia) ($P = 0,065$). O fornecimento de suplemento energético proporciona maior consumo de nutrientes, sem influenciar a emissão de CH₄ entérico, e melhora a digestibilidade de nutrientes, proporcionando maior desempenho produtivo dos animais. A inclusão dos aditivos fitogênicos afetam negativamente o consumo e digestibilidade de nutrientes, não apresentam potencial para reduzir a emissão de CH₄ entérico e não influenciam o desempenho produtivo de tourinhos Nelore em pastejo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, recebendo suplemento energético ou suplemento mineral, durante o período das águas.

Palavras-chave: bovinos, metano entérico, óleos essenciais, suplementação, taninos hidrolisáveis

CHAPTER 2 – NUTRIENT INTAKE AND DIGESTIBILITY, ENTERIC METHANE PRODUCTION AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN NELLORE BULLS IN MARANDU GRASS PASTURES RECEIVING A SUPPLEMENT WITH THE INCLUSION OF PHYTOGENIC ADDITIVES

ABSTRACT – This study aimed to evaluate intake and digestibility of nutrients, enteric CH₄ emission and performance of Nellore young bulls in Marandu grass pastures receiving energy supplement or mineral supplement, without or with the inclusion of phytogenic additives, composed of carvacrol, cinnamaldehyde and hydrolysable tannins, at a dose of 1.5 g/kg of DM ingested during the rainy season. The performance evaluation was carried out in 48 Nellore bulls, with a mean initial body weight of 211 kg ± 30.20 kg, distributed in a completely randomized design, in a 2x2 factorial arrangement, allocated in 12 paddocks (4 testers/ paddock). The performance evaluation period was 102 days (15 days of diet adaptation and 87 days of evaluations) and the treatments evaluated were: 1 – Energy supplement without inclusion of phytogenic additives (SE); 2 – Energy supplement with inclusion of phytogenic additives (SEAF); 3 – Mineral supplement without inclusion of phytogenic additives (SM); 4 – Mineral supplement with inclusion of phytogenic additives (SMAF). Energy supplements were provided in the amount of 0.3% of body weight and mineral supplements, with and without the inclusion of phytogenic additives, were provided ad libitum. The evaluation of intake and digestibility of nutrients, and emission of enteric CH₄ were performed in 24 animals (6 animals/treatment, 2 animals/patch), after the evaluation of productive performance. The mean body weight of the animals was 326 ± 38.27 kg and the SF₆ sulfur hexafluoride tracer technique was used. There was no interaction of supplement and blend of phytogenic additives on the intake and digestibility of dry matter and nutrients, enteric CH₄ emission and productive performance ($P > 0.05$). Total MS intake ($P = 0.015$), CP ($P = 0.012$), NDFcp ($P = 0.044$) and energy ($P < 0.05$), DM digestibility ($P = 0.001$), CP ($P = 0.044$) and energy ($P = 0.050$), and the ADG ($P = 0.013$), stocking rate ($P = 0.024$) and gain per area ($P = 0.005$) were higher in animals that consumed energy supplement compared to animals that consumed mineral supplement. MS digestibility ($P < .0001$), NDFcp ($P = 0.025$) and energy ($P = 0.023$) were lower in animals that consumed phytogenic additives. The energy supplement intake provided a tendency to increase the emission of enteric CH₄ (g/day) ($P = 0.065$). The supply of energy supplement provides greater consumption of nutrients, without influencing the emission of enteric CH₄, and improves the digestibility of nutrients, providing greater productive performance of the animals. to reduce enteric CH₄ emission and do not influence the productive performance of Nellore bulls grazing on *Urochloa brizantha* cv. Marandu, receiving energy supplement or mineral supplement, during the rainy season.

Keyword: bovines, enteric methane, essential oils, hydrolyzable tannins, supplementation

1. INTRODUÇÃO

A intensificação dos sistemas de produção a pasto é fortemente influenciada pelo manejo adequado do pasto, que, sob o critério de altura, e interceptação luminosa de 95%, proporciona o ajuste entre a massa de forragem e a taxa de lotação (Reis et al., 2009), possibilitando maior proporção de folhas, e conseqüentemente, menor concentração de fibra indigestível (FDNi), alteração da estrutura e qualidade do pasto (Dubeux et al., 2006).

Aliado ao manejo do pasto, o fornecimento estratégico de suplemento tem potencial para proporcionar ganho adicional de aproximadamente 0,250 kg/animal/dia durante o período das águas (Casagrande et al., 2011; Valente et al., 2014). Nessas situações, a suplementação estratégica permite reduzir a emissão de metano (CH_4) por kg de produto produzido (Cardoso et al., 2016).

Na suplementação da dieta dos animais, os promotores de crescimento, como os antibióticos ionóforos proporcionam melhor eficiência alimentar e desempenho dos animais, mas têm sido banidos devido à possibilidade de resistência bacteriana e problemas à saúde humana (Clark et al., 2012). Assim, os aditivos fitogênicos, como os óleos essenciais e taninos apresentam potencial de substituição por apresentarem propriedades antimicrobianas, e proporcionarem redução na concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, como com o uso de óleos essenciais (Cobellis et al., 2016b).

Adicionalmente, os taninos têm potencial para se ligar com a proteína da dieta, aumentando o fluxo de proteína para o intestino delgado (Patra e Saxena, 2011), possibilitando tanto o aumento no desempenho animal (Hristov et al., 2013), como redução dos impactos ambientais causados pela volatilização de amônia, emissão de óxido nitroso (N_2O) e lixiviação de nitrato (NO_3^-), devido ao aumento no consumo de proteína solúvel (Dijkstra et al., 2013), como visto por animais consumindo pasto que foram fertilizados com nitrogênio e manejados para manter alta proporção de folhas.

O ganho médio diário de bovinos de corte em confinamento com a inclusão de óleos essenciais de cravo ou canela, nas doses 3,5 g/dia ou 7,0 g/dia foi superior aos animais controle, em virtude do maior consumo de matéria seca, possivelmente causado pela melhor aceitabilidade dessas dietas, sem acarretar

efeitos negativos na eficiência alimentar (Ornaghi et al., 2017), além de demonstrar a habilidade dos óleos essenciais em manipular o ambiente ruminal, como na redução na proporção molar de acetato e na relação acetato:propionato (Vakili et al., 2013).

A inclusão de taninos hidrolisáveis e condensados apresenta potencial para melhorar a eficiência de utilização de nitrogênio (Zhang et al., 2019) e reduzir o nitrogênio ureico no plasma de bovinos de corte alimentados com dietas com alta proporção de forragem (Aboagye et al., 2019). No entanto, não são encontrados na literatura os efeitos do uso combinado de taninos hidrolisáveis e óleos essenciais para bovinos de corte em pastejo.

As hipóteses estudadas foram que o consumo de suplemento energético melhora o consumo e digestibilidade dos nutrientes, reduz a emissão de CH₄ entérico e consequentemente, melhora o desempenho animal. Ainda, o uso combinado de taninos hidrolisáveis e óleos essenciais melhora a utilização dos nutrientes, mitiga a emissão de CH₄ entérico e melhora o desempenho animal. Sendo assim, objetivou-se avaliar o consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes, a emissão de CH₄ entérico e o desempenho produtivo de tourinhos Nelore em pastejo em *Urochloa brizantha* cv. Marandu durante o período das águas, recebendo suplemento energético ou suplemento mineral, com ou sem a inclusão de aditivo fitogênico composto por carvacrol e cinamaldeído, e taninos hidrolisáveis, fornecido na dose de 1,5 g/kg MS ingerida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental cumpriu os Princípios Éticos para Pesquisa em Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP; Protocolo nº 12703/15).

2.1. Local e área experimental

O estudo foi realizado no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Jaboticabal, São Paulo, durante a fase de recria dos animais no período das águas 2018/2019, entre os meses de

dezembro e abril, para avaliar o desempenho dos animais e a produção de metano entérico. O clima verificado na região é subtropical do tipo AW de acordo com a classificação de Köppen. O solo da área experimental é Latossolo Vermelho Amarelo (Embrapa, 2018).

Os dados meteorológicos, temperatura (°C), precipitação (mm), dias de chuva e balanço hídrico (Tabela 1), foram registrados durante o período experimental pela Estação Agroclimatológica do Campus de Jaboticabal, localizada na latitude 21°14'05" sul, e longitude 48°17'09" oeste com altitude de 615 metros, e após o término do experimento, os dados foram extraídos do acervo de dados do Departamento de Ciências Exatas da Estação Agroclimatológica.

Tabela 1. Temperatura (°C), precipitação (mm), dias de chuva e balanço hídrico (mm) durante o período das águas 2018/2019.

Mês	Temperatura ¹ (°C)			Precipitação (mm)	Dias de chuva	Balanço hídrico (mm) ²	
	Máx	Mín	Média			Def	Exc
Ano 2018							
Outubro	31,1	19,5	24,4	157,0	15	0	0
Novembro	29,7	19,7	23,8	330,1	18	0	163
Dezembro	32,0	20,2	25,2	88,2	16	10	0
Ano 2019							
Janeiro	32,7	20,9	26,1	148,1	11	0	0
Fevereiro	30,9	20,4	24,4	282,6	17	0	171
Março	31,0	20,1	24,5	115,2	12	0	0
Abril	30,6	19,0	23,9	97,6	6	0	0

¹Temperatura: Máx: máximo; Mín: mínimo; ²Balanço hídrico: Def: deficiência; Exc: excedente.

Os animais foram mantidos durante a fase de recria em uma área formada por *Urochloa brizantha* cv. Marandu, em 12 piquetes experimentais, com área total de 12 ha, divididos em piquetes de 0,7 e 1,3 ha. Um piquete reserva de 1 ha foi utilizado para o ajuste da taxa de lotação. Todos os piquetes foram providos de cocho com acesso de ambos os lados (30 cm lineares por animal) e bebedouro. O centro de manejo é dotado de curral com tronco de contenção, balança digital e apartador.

A análise de solo dos piquetes foi realizada e apresentou as seguintes características químicas: pH de 5,27 em CaCl₂; 35 g/dm³ de matéria orgânica; 16,0 mg/dm³ fósforo resina; 3,07 mmolc/dm³ de potássio; 22,44 mmolc/dm³ de

cálcio; 10,44 mmolc/dm³ de magnésio; 29,89 mmolc/dm³ de hidrogênio+alumínio; e 54,44% de saturação por bases.

A adubação de manutenção na área experimental foi realizada de acordo com a análise de solo descrita, e foram aplicados 100 kg/ha de P₂O₅, 200 kg/ha de K₂O, divididos em duas aplicações, e 180 kg/ha de N, divididos em três aplicações. A fonte de nitrogênio utilizada foi o nitrato de amônio, e as aplicações foram realizadas em 16 de dezembro de 2018, 24 de janeiro de 2019 e 02 de março de 2019, coincidindo com as condições climáticas favoráveis a aplicação.

2.2. Animais e tratamentos experimentais

Os animais foram alocados na área experimental 15 dias antes do início do experimento para adaptação às condições experimentais. O período de avaliação do desempenho dos animais em pastejo foi de 102 dias (15 dias de adaptação e 87 dias de avaliações), com início dia 18 de dezembro de 2018 e término dia 30 de março de 2019. Após o período de avaliação do desempenho, foi realizada a mensuração da produção de metano entérico.

Foram utilizados 48 tourinhos Nelore, com peso corporal inicial médio de 211 kg ± 30,20 kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 (A: suplemento energético e suplemento mineral; B: sem e com aditivos fitogênicos), em quatro tratamentos e três repetições (piquetes), totalizando 4 animais *testers* por piquete e 12 animais por tratamento. Os animais foram vermifugados e identificados com brincos numerados para o acompanhamento do desempenho individual.

Os piquetes formados de *Urochloa brizantha* cv. Marandu foram manejados a 25 cm de altura, por meio da técnica “*put and take*” (Mott & Lucas, 1952), com os animais mantidos em sistema de pastejo contínuo e taxa de lotação variável. Dessa forma, além dos animais *testers*, animais adicionais (reguladores) foram usados para ajustar a pressão de pastejo no sentido de manter a altura do pasto ao redor de 25 cm.

Os quatro tratamentos testados foram: 1 – Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos (SE); 2 – Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos (SEAF); 3 – Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos (SM); 4 – Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos

(SMAF) (Tabela 2). O *blend* de aditivos fitogênicos continha carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis, fornecidos nos tratamentos na dose de 1,5 g/kg de MS ingerida.

Os suplementos foram fornecidos diariamente as 09:00 h, sendo os suplementos energéticos fornecidos na proporção de 0,3% do peso corporal (PC), em que foram feitos ajustes semanais na quantidade ofertada. Os suplementos minerais (suplemento mineral) foram fornecidos *ad libitum*.

Os suplementos energéticos utilizados são suplementos comerciais e não foi autorizada a divulgação da composição percentual dos ingredientes. Os suplementos não continham ureia.

Tabela 2. Composição química dos suplementos utilizados na fase de recria durante o período das águas

Item	Suplementos ¹			
	SE	SEAF	SM ³	SMAF ⁴
<i>Composição química²</i>				
MM (%)	34,02	33,12	-	-
MO (%)	65,98	66,88	-	-
FDNcp (%)	30,32	30,31	-	-
FDNi (%)	15,75	15,61	-	-
Lignina (%)	1,70	1,16	-	-
EE (%)	1,81	2,11	-	-
EB (MJ/kg MS)	12,58	13,33	-	-
PB (%)	14,87	15,02	-	-
CNF (%)	5,07	6,40	-	-
<i>Fração (% PB)</i>				
A (% PB)	29,01	36,98	-	-
B1 (% PB)	6,33	6,48	-	-
B2 (% PB)	50,92	45,01	-	-
B3 (% PB)	10,89	8,76	-	-
C (% PB)	2,85	2,77	-	-

¹SE: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SEAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SM: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ²Composição química – MM: Matéria mineral; MO: Matéria orgânica; CNF: Carboidratos não fibrosos; FDNcp: Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; EE: Extrato etéreo; EB: Energia bruta; PB: Proteína bruta. ³Níveis de garantia suplemento mineral: Cálcio – 123,0 g kg⁻¹; Fósforo – 90 g kg⁻¹; Cobre – 1.040,00 mg kg⁻¹; Manganês – 500 mg kg⁻¹; Zinco – 2.000,0 mg kg⁻¹; Cobalto – 15,0 mg kg⁻¹; Iodo – 67,0 mg kg⁻¹; Selênio – 14,0 mg kg⁻¹. ⁴SMAF – Níveis de garantia semelhantes ao SM com inclusão dos aditivos fitogênicos, composto por carvacrol, cinamaldeído e taninos.

2.3. Avaliação da forragem – Massa de forragem, composição morfológica e oferta de forragem

A altura média do dossel forrageiro foi mensurada semanalmente durante o período experimental a partir da medição de 80 pontos aleatórios por hectare, com auxílio de régua graduada, para a manutenção da altura do pasto em 25 cm por meio do ajuste nas taxas de lotação.

Foi realizada a avaliação da massa de forragem e componentes morfológicos a cada 28 dias. Foram identificados três pontos representativos da altura média do dossel forrageiro, e delimitado a área de corte da forragem rente ao solo com o auxílio de uma moldura circular de 0,25 m².

As amostras foram coletadas, pesadas e, posteriormente, obtidas duas sub-amostras. A primeira sub-amostra foi separada manualmente para a determinação da composição morfológica em: material morto (lâmina foliar seca e colmo seco + bainha), lâmina foliar verde, e colmo verde + bainha. A estimativa da disponibilidade de matéria seca total (MST, kg MS/ha) de forragem de cada piquete foi obtida na segunda sub-amostra. As sub-amostras foram pesadas e secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas, e posteriormente pesadas novamente.

A carga animal em cada piquete foi avaliada e utilizada juntamente com a massa de forragem para a obtenção da estimativa de oferta de forragem (kg MS/kg de PC). Da mesma forma, a massa de forragem de folhas (kg de lâmina foliar verde) e a carga animal foram utilizados para a obtenção da oferta de forragem de folhas (kg MS de folhas/kg de PC).

A matéria seca potencialmente digestível (MSpd) foi calculada de acordo com Paulino et al. (2006):

$$\text{MSpd} = 0,98 \times (100 - \text{FDN}) + (\text{FDN} - \text{FDNi})$$

Em que: 0,98 = coeficiente de digestibilidade verdadeiro do conteúdo celular;
FDN = fibra em detergente neutro; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível.

2.4. Valor nutritivo – Análises químico-bromatológicas

A composição química-bromatológica da forragem foi avaliada nas amostras de forragem coletadas por simulação manual de pastejo (Halls, 1954). As amostras foram coletadas a cada 28 dias e após a coleta foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas; processadas em moinho do tipo Willey com peneira de malha com crivo de 2 mm para as amostras destinadas à análise de FDNi (fibra em detergente neutro indigestível), conforme Valente et al. (2011), e com peneira de malha com crivo de 1 mm para as demais análises. Amostras dos suplementos energéticos foram coletadas e destinadas aos mesmos procedimentos de processamento.

As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), e proteína bruta (PB) para a obtenção do valor nutritivo foram realizadas de acordo com os procedimentos da AOAC (1990). O método de Dumas foi utilizado para a determinação do teor de PB por meio da combustão a seco, no equipamento Leco®, modelo FP-528 (Leco Corporation, Michigan, USA).

A fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) foram determinadas no equipamento Ankom® 2000 (Ankom Technologies, New York, USA). Utilizou-se α -amilase termo-estável (Van Soest et al., 1991) para determinação da FDN dos concentrados.

A determinação de FDA e lignina (H_2SO_4 72%) foram realizadas segundo Robertson e Van Soest (1981), e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) conforme recomendações de Licitra et al. (1996). O procedimento de incubação *in situ* por 288 horas de Valente et al. (2011) foi utilizado para a obtenção das estimativas de FDNi da forragem, dos concentrados e das fezes.

O teor de energia bruta (EB) dos alimentos e das fezes foi determinado por bomba calorimétrica adiabática (PARR Instrument Company 6300, Illinois, USA).

A energia digestível (ED) foi calculada a partir da digestibilidade aparente da EB, e a energia metabolizável foi estimada a partir da multiplicação da ED pelo fator corrigido encontrado após as perdas de energia bruta por CH_4 e urina, estimado pela equação de Street et al. (1964):

EB urina (kcal/g) = $0,026 + 0,117 \times \% \text{ nitrogênio da urina}$, de cada tratamento: SE: 0,8457, SEAF: 0,8509, SM: 0,8246, SMAF: 0,8058 (Teobaldo, 2021; dados não publicados).

Foi realizada, ainda, a análise do fracionamento dos compostos nitrogenados dos suplementos fornecidos aos animais e da forragem durante o período das águas (Licitra et al., 1996).

2.5. Desempenho animal

Os animais *testers* foram pesados no início (18 de dezembro de 2018), e no final do período experimental (30 de março de 2019), às 05h30min, após jejum prévio alimentar e hídrico de 14 horas. O ganho médio diário foi calculado pela razão entre a diferença do peso final e inicial dos animais, e o período de avaliação do desempenho (101 dias). Pesagens de acompanhamento foram realizadas a cada 28 dias, sem jejum, no intuito de ajustar a taxa de lotação e o fornecimento de suplemento.

A taxa de lotação e ganho por área foram calculados considerando os dias de ocupação dos animais reguladores em cada piquete. Considerou-se no cálculo de ganho por área os ganhos individuais médios e o número de animais *testers* e reguladores em cada piquete por dia, durante o período de avaliação.

A taxa de lotação em unidades animal por hectare (450 kg PC/ha) foi obtida a partir do peso corporal total dos animais *testers* e reguladores em cada piquete, por dia, e assim, calculada a taxa de lotação média do período avaliado.

2.6. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes

O consumo e digestibilidade dos nutrientes foram avaliados em seis animais *testers* por tratamento (dois animais/piquete; totalizando 24 animais) após o término da avaliação de desempenho, simultaneamente com a avaliação de metano entérico.

A produção fecal foi estimada a partir do uso do marcador externo óxido crômico (Cr_2O_3), acondicionado em cartuchos de papel e fornecidos na dose de 10 gramas durante 10 dias, às 06h00, via sonda esofágica, sendo fornecido por sete dias para adaptação e os três dias finais de coleta de fezes. As fezes foram

coletadas no 8º dia às 17h00, 9º dia às 11h00 e 10º dia às 06h00, e posteriormente, foram secas a 55°C por 72 horas, processadas, realizada uma amostra composta dos 3 dias de coleta por animal, e armazenadas para posterior análise química. A excreção fecal foi determinada através da equação:

$$\text{Excreção fecal (g/dia)} = \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ fornecido (g/dia)} / \text{Concentração Cr}_2\text{O}_3 \text{ (g/kg MS)}$$

A partir da estimativa da excreção fecal e com a utilização da FDNi como marcador interno da forragem e suplemento foi estimado o consumo de forragem. O consumo médio de suplemento na base da MS foi calculado a partir da quantidade média de suplemento fornecida (% do PC) por animal por piquete.

2.7. Emissão de metano entérico

A emissão de metano foi mensurada após o período de avaliação do desempenho nos mesmos animais destinados a avaliação do consumo e digestibilidade. Dessa forma, foram utilizados seis animais *testers* por tratamento (dois animais/piquete; totalizando 24 animais), com peso corporal médio de $326 \pm 38,27$ kg, utilizando a técnica do traçador hexafluoreto de enxofre SF₆ (Johnson & Johnson, 1994; Berndt et al., 2014).

No início do período de 15 dias de adaptação foi inserido no rúmen dos animais, via sonda esofágica, um tubo de permeação contendo SF₆ com taxa de liberação conhecida, calibrado por diferença gravimétrica até atingir peso constante, no intuito de equilibrar o gás traçador no rúmen (Berndt et al., 2014). Sete dias antes do início das coletas de amostras do gás (8º dia da adaptação), os animais foram equipados com cabrestos e cangas de adaptação, sem os aparatos de coleta.

No início do período de avaliação, os cabrestos e cangas de adaptação foram substituídos por um cabresto equipado com tubo capilar, o qual foi ajustado na cabeça do animal, e conectado a uma câmara (canga) de cloreto de polivinila (PVC), equipada com válvula e registro.

As cangas foram previamente submetidas à vácuo e aferidas no momento de serem utilizadas. Os aparatos de coleta foram colocados, também, em locais estratégicos nos piquetes em que os animais estavam para corrigir a quantidade

de gás presente no ambiente e que poderia influenciar as amostras eructadas pelo animal.

Após o período de 24 horas, as cangas foram trocadas, e pressurizadas com N₂ puro, sendo realizada a avaliação durante cinco dias consecutivos. A determinação das concentrações de CH₄ e SF₆ foram realizadas por cromatografia gasosa, em um cromatógrafo a gás Shimadzu 2014 AF, sobre as seguintes condições para mensurar SF₆: injetor a 250°C, coluna a 80°C, usando N₂ como gás de arraste (30 ml/min), e o detector de captura elétrica a 325°C; e CH₄: usando H₂ como gás de arraste (30 ml/min), detector de ingestão de chama a 280°C.

A produção de metano foi calculada com base nas concentrações de CH₄ e SF₆ presentes nas amostras dos animais, subtraído das concentrações presentes no ambiente, e a taxa de liberação de SF₆ das cápsulas, utilizando a seguinte equação descrita por Berndt et al. (2014):

$$\text{Metano} \left(\frac{\text{g}}{\text{dia}} \right) = \text{Taxa de liberação SF}_6 \times \frac{[\text{CH}_4]_{\text{amostra animal}} - [\text{CH}_4]_{\text{background air}}}{[\text{SF}_6]_{\text{amostra animal}} - [\text{SF}_6]_{\text{background air}}} \times \frac{\text{peso molecular CH}_4}{\text{peso molecular SF}_6} \times 1000$$

2.8. Análises estatísticas

As variáveis estudadas durante o experimento de desempenho e emissão de CH₄ foram analisadas em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2 (A x B; Fator A: 2 suplementos – suplemento energético e suplemento mineral e fator B: aditivos fitogênicos – sem ou com os aditivos fitogênicos. Foram testados os efeitos do fator A, fator B e a interação entre os fatores, considerados efeitos fixos. A unidade experimental adotada foi o piquete (n = 12).

Inicialmente os dados foram analisados quanto a normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias. Nas variáveis de produção e composição da forragem foram incluídas medidas repetidas no tempo (meses de coleta). Para a análise, a estrutura da matriz de covariância dos erros que se ajusta aos dados foi escolhida conforme o critério de Akaike corrigido (AICc) e a estrutura que melhor se ajustou foi ‘unstructured’. Os dados foram analisados

utilizando o procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9.2). Efeitos foram declarados significativos quando $P \leq 0,05$ e tendência considerada quando $P > 0,05$ e $< 0,10$, e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1. Produção e composição da forragem

Os possíveis efeitos decorrentes dos tratamentos propostos na produção e composição da forragem foram minimizados a partir dos ajustes nas taxas de lotação e foram não significativos ($P > 0,05$). Dessa forma, considerou-se que os efeitos nas características de produção, morfológicas e bromatológicas foram em função das condições climáticas durante o período de avaliação (Tabela 3).

O fracionamento de compostos nitrogenados da forragem foi: fração A (% PB): 26,64%; fração B1 (% PB): 7,40%; fração B2 (% PB): 45,70%; fração B3 (% PB): 14,20; fração C (% PB): 6,06%.

Tabela 3. Efeito dos meses de avaliação na massa de forragem, composição morfológica e composição químico-bromatológica da forragem (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) durante o período das águas

Item ¹	Meses				EPM ²	P-valor Mês
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril		
MFT (t MS/ha)	5,58 b	8,16 a	6,31 b	6,06 b	0,21	<.0001
Oferta de forragem	3,84 b	4,70 a	3,62 b	3,29 b	0,19	0,001
Oferta de forragem (MSpd)	3,18 ab	3,78 a	2,95 b	2,62 b	0,40	0,002
Oferta de folhas	1,18 ab	1,40 a	1,08 b	1,01b	0,06	0,009
<i>Composição morfológica (%)</i>						
Folhas verdes	30,98	30,54	30,90	31,20	0,68	0,990
Colmos verdes	30,02 a	27,77 ab	19,71 c	25,09 b	0,82	<.0001
M. Morto	39,00 b	41,69 b	49,39 a	43,71 b	1,13	0,005
Folha:Colmo	1,06 b	1,12 b	1,58 a	1,27 ab	0,04	<.0001
<i>Composição química³ (%)</i>						
MO	90,88 c	91,65 a	90,58 d	91,30 b	0,07	<.0001
FDNcp	53,10 c	57,89 a	52,14 c	55,55 b	0,38	<0.001
FDNi	16,13 c	18,74 a	17,41 b	19,32 a	0,26	<.0001
Lignina	3,42 b	3,82 a	3,83 a	4,14 a	0,06	0,002
EE	2,66 a	2,28 c	2,61 ab	2,40 bc	0,05	0,001
EB (MJ/kg MS)	17,85 bc	18,17 a	17,79 c	18,10 ab	0,04	0,002
PB	14,17 c	14,69 bc	17,09 a	15,37 b	0,22	<.0001
MSpd	82,70 a	80,46 b	81,52 ab	79,69 b	0,24	<.0001

¹MFT: Massa de forragem total; Oferta de forragem total (kg MS/kg de PC); Oferta de folhas (kg MS/kg de PC); ²EPM: Erro padrão da média; ³Composição química de amostras obtidas por técnica de pastejo simulado. 1 MJ = 239 Kcal. MO: Matéria orgânica; FDNcp: Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDNi: Fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; EE: Extrato etéreo; EB: Energia bruta; PB: Proteína bruta; MSpd: Matéria Seca Potencialmente Digestível.

A massa de forragem total (disponibilidade de matéria seca total dos pastos) ($P < .0001$) e a oferta de forragem (kg MS/kg de PC) ($P = 0,001$) foram maiores durante o mês de fevereiro (Tabela 3), e a proporção de material morto foi maior ($P = 0,005$) durante o mês de março. Ainda durante o mês de março, o teor de proteína bruta foi maior ($P < .0001$), visto também que houve maior relação folha:colmo ($P < .0001$).

3.2. Desempenho animal

Não houve interação entre os suplementos fornecidos e os aditivos fitogênicos nas variáveis de desempenho produtivo avaliadas ($P > 0,05$) (Tabela 6).

O peso corporal final (kg) dos animais não foi influenciado pelos suplementos fornecidos ou inclusão dos aditivos fitogênicos ($P > 0,05$) (Tabela 6). Entretanto, o ganho médio diário (kg/dia) ($P = 0,013$), a taxa de lotação (UA/ha) ($P = 0,024$) e o ganho por área (kg/ha/dia) ($P = 0,005$) foram maiores nos animais que receberam o suplemento energético em comparação ao suplemento mineral, independente da inclusão dos aditivos fitogênicos (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos no desempenho produtivo de bovinos em pastejo durante o período das águas, na fase de recria

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³	P-valor		
	SE	SEAF	SM	SMAF		Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
PCi (kg)	211,75	213,17	208,91	211,42	4,41	0,802	0,831	0,952
PCf (kg)	349,17	352,50	338,00	338,08	6,15	0,314	0,893	0,898
GMD (kg/dia)	0,840	0,896	0,767	0,774	0,02	0,013	0,422	0,535
TL (UA/ha)	5,32	5,21	4,60	4,72	0,13	0,024	0,977	0,609
Ganho por área (kg/ha/dia)	6,66	7,45	5,94	6,09	0,22	0,005	0,108	0,250

¹PCi: Peso corporal inicial; PCf: Peso corporal final; GMD: Ganho médio diário (kg/dia); TL: Taxa de lotação (UA/ha); ²SE: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SEAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SM: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos;

³EPM: Erro padrão da média.

3.3. Consumo de matéria seca e dos nutrientes

Não houve interação entre os suplementos fornecidos e os aditivos fitogênicos nas variáveis consumo de matéria seca e de nutrientes avaliadas ($P > 0,05$) (Tabela 4).

O consumo de matéria seca (MS) de pasto (kg/dia e % PC) não foi afetado ($P > 0,05$) pelo uso de aditivos fitogênicos, mas apresentou tendência de aumento (CMS pasto kg/dia: $P = 0,073$;

CMS pasto % PC: $P = 0,052$) com o consumo de suplemento energético (Tabela 4).

O consumo de FDNcp (% PC) não foi influenciado pelos suplementos e pelos aditivos fitogênicos. O consumo de MS total ($P = 0,015$), de matéria orgânica (MO) ($P = 0,023$), proteína bruta (PB) ($P = 0,012$), e fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp kg/dia: $P = 0,044$), kg/dia, consumo de MS total, % PC ($P = 0,005$), e consumo de energia bruta (EB MJ/dia: $P = 0,026$), energia digestível (ED MJ/dia: $P = 0,012$) e energia metabolizável (EM MJ/dia: $P = 0,008$) foram maiores nos animais que receberam o suplemento energético em comparação aos animais que receberam apenas suplemento mineral, e não foram afetados pela inclusão dos aditivos fitogênicos ($P > 0,05$) (Tabela 4).

O consumo médio de suplemento mineral foi registrado e a média foi de SM: 106 g/animal/dia e SMAF: 108 g/animal/dia.

A relação entre o teor de proteína e quantidade de matéria orgânica digestível (g PB/kg MOD) apresentou tendência ($P = 0,077$) de aumento nos animais que consumiram suplemento mineral (suplemento energético: 258,74 g PB/kg MOD; suplemento mineral: 272,21 g PB/kg MOD) comparado aos animais que consumiram suplemento energético. Além disso, os animais que consumiram os aditivos fitogênicos apresentaram menor eficiência ($P = 0,0001$) na relação entre o teor de proteína e quantidade de matéria orgânica do que os animais que não consumiram os aditivos fitogênicos (sem aditivos fitogênicos: 247,39 g PB/kg MOD; com aditivos fitogênicos: 283,56 g PB/kg MOD).

Tabela 4. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos no consumo voluntário de nutrientes em bovinos em pastejo durante o período das águas, na fase de recria

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³	P-valor		
	SE	SEAF	SM	SMAF		Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
Consumo (kg/dia)								
MS total	7,87	7,92	5,17	5,03	0,57	0,015	0,964	0,931
MS Pasto	6,99	7,02	5,17	5,03	0,50	0,073	0,958	0,934
MS Suplemento	0,88	0,89	-	-	0,05	-	0,896	-
MO	6,97	7,01	4,71	4,59	0,50	0,023	0,964	0,932
PB	1,18	1,21	0,77	0,78	0,08	0,012	0,893	0,954
FDNcp	4,11	4,12	2,88	2,87	0,29	0,044	0,999	0,982
g PB/kg MOD	244,86	272,61	249,92	294,51	7,04	0,077	0,0001	0,254
Consumo (% PC)								
MS Total	2,40	2,33	1,63	1,55	0,14	0,005	0,751	0,987
MS Pasto	2,13	2,06	1,63	1,55	0,12	0,052	0,747	0,990
FDNcp	1,12	1,31	0,98	1,00	1,10	0,151	0,486	0,570
MJ/dia								
EB	136,5	137,4	93,99	91,20	9,66	0,026	0,959	0,921
ED	85,15	80,59	57,15	47,93	5,97	0,012	0,527	0,830
EM	72,01	68,57	47,13	38,62	8,97	0,008	0,516	0,782

¹MS: Matéria Seca; MO: Matéria Orgânica; PB: Proteína Bruta; FDNcp: Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; EB: Energia Bruta; ED: Energia Digestível; EM: Energia Metabolizável; ²SE: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SEAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SM: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ³EPM: Erro padrão da média.

3.4. Digestibilidade da matéria seca e de nutrientes

Não houve interação entre os suplementos fornecidos e os aditivos fitogênicos nas variáveis digestibilidade da matéria seca e de nutrientes avaliadas ($P > 0,05$) (Tabela 5).

A digestibilidade da MS ($P = 0,001$), proteína bruta ($P = 0,044$) e energia ($P = 0,050$) foram maiores nos animais que receberam o suplemento energético do que nos animais que receberam suplemento mineral. Os animais que receberam a inclusão dos aditivos fitogênicos tiveram menor digestibilidade da MS ($P < 0,0001$; sem aditivos fitogênicos: 64,7%; com aditivos fitogênicos: 55,5%), da FDNcp ($P = 0,025$; sem aditivos fitogênicos: 70,0%; com aditivos fitogênicos: 65,4%) e da energia ($P = 0,023$; sem aditivos fitogênicos: 61,6%; com aditivos fitogênicos: 56,3%). Os animais que receberam a inclusão dos aditivos fitogênicos apresentaram tendência de menor digestibilidade da matéria orgânica (sem aditivos fitogênicos: 65,61%; com aditivos fitogênicos: 61,26%) (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos na digestibilidade de nutrientes em bovinos em pastejo durante o período das águas, na fase de recria

Item ¹ (%)	Tratamentos ²				EPM ³	P-valor		
	SE	SEAF	SM	SMAF		Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
DMS	67,95	57,08	61,45	54,01	1,20	0,001	<.0001	0,138
DMO	66,08	64,63	65,13	57,89	1,19	0,081	0,052	0,180
DPB	62,71	60,04	58,86	52,88	1,39	0,044	0,104	0,519
DFDNcp	70,36	67,74	69,82	63,01	1,09	0,185	0,025	0,287
DE	62,26	60,05	60,90	52,53	1,28	0,050	0,023	0,163

¹DMS: Digestibilidade da Matéria Seca; DMO: Digestibilidade da Matéria Orgânica; DPB: Digestibilidade da Proteína Bruta; DFDNcp: Digestibilidade da Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; DEB: Digestibilidade da Energia Bruta; ²SE: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SEAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SM: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ³EPM: Erro padrão da média.

3.5. Emissão de metano entérico

Não houve interação entre os suplementos fornecidos e aditivos fitogênicos nas variáveis de emissão de metano entérico avaliadas ($P > 0,05$) (Tabela 7).

A produção diária de CH₄ entérico apresentou tendência ($P = 0,065$) de aumento com o fornecimento do suplemento energético (Tabela 7). A produção de CH₄ em relação ao consumo de matéria seca, quantidade de matéria orgânica digestível, ganho médio diário, consumo de energia bruta e de energia metabolizável, e na taxa de conversão de energia bruta em CH₄ (Ym) não foram influenciados pelos suplementos ou aditivos fitogênicos ($P > 0,05$).

Tabela 7. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos na produção de metano entérico de bovinos em pastejo durante o período das águas, na fase de recria

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-valor		
	SE	SEAF	SM	SMAF		Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
CH ₄ (g/dia)	172,61	183,39	127,08	160,46	9,28	0,065	0,208	0,504
CH ₄ (g/kg CMS)	23,53	21,60	23,14	28,84	1,59	0,310	0,568	0,262
CH ₄ (g/kg MO digestível)	40,55	39,04	38,77	52,98	3,20	0,365	0,345	0,249
CH ₄ (kg/kg GMD)	0,21	0,18	0,18	0,19	0,01	0,619	0,459	0,329
CH ₄ (g CEB MJ/dia)	1,37	1,24	1,28	1,60	0,09	0,483	0,610	0,241
Ym (%) ³	7,58	6,86	7,06	8,84	0,48	0,484	0,610	0,241

¹SE: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SEAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SM: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ²EPM: Erro padrão da média; ³Taxa de conversão de energia bruta consumida pelo animal que é transformada em CH₄;

4. DISCUSSÃO

O manejo do pasto em sistemas de produção à base de forragem é uma etapa crucial para o planejamento de um sistema otimizado. Em sistemas de pastejo, o tamanho do bocado é fortemente influenciado pela altura do dossel (Hodgson, 1990), pois a altura molda a estrutura do pasto.

Dessa forma, o critério de interceptação luminosa de 95% permite a alteração da estrutura do pasto, melhorando a composição da forragem implicando em forragem com baixos teores de FDNi, em função da alta proporção de folhas verdes, o qual resulta em elevados teores de proteína bruta, com maior proporção das frações de maior solubilidade (De Oliveira et al., 2015).

O manejo do pasto a 25 cm de altura por meio do ajuste na taxa de lotação, permite que a concentração de FDNi seja minimizada e maior proporção de FDNpd, de modo que não limite o consumo de pasto, fornecendo matéria seca potencialmente digestível (MSpd), a qual se fundamenta dos conceitos de qualidade e oferta de forragem disponível para o animal no momento de pastejo (Paulino et al., 2006) e o fornecimento entre 4% e 5% do PC em MSpd é preconizado para associar a produção por animal, por área e a eficiência de pastejo de 70% (Paulino et al., 2004). A MSpd média verificada durante o período de estudo foi de 81%, ou seja, a oferta de pasto potencialmente digestível é em torno de 3,13 kg MSpd/kg PC.

As maiores produções de forragem total e oferta de forragem durante o mês de fevereiro, e a maior proporção de material morto durante o mês de março foram influenciadas pela precipitação de chuva que foi maior durante o mês de fevereiro e teve reflexo no mês seguinte.

A massa de forragem (kg/ha) promovida pelo manejo proposto no estudo foi semelhante, exceto o valor superior verificado no mês de março devido as condições climáticas, a encontrada em estudos como de Delevatti et al. (2019), o qual utilizou o critério de manejo a 25 cm de altura em pastejo contínuo com taxa de lotação variável.

A maior intensidade de pastejo proporciona o manejo da altura do dossel a 25 cm e possibilita maior taxa de lotação, com efeitos positivos no valor nutritivo da forragem, pois o intervalo de visitas dos animais ao mesmo perfilho é menor, com redução na maturidade média da rebrota e maior proporção de folhas na massa de forragem (Dubeux et al., 2006).

Em relação a estrutura do pasto, a maior relação folha:colmo verificada no mês de março foi devido a menor proporção de colmos verdes durante o mesmo período, visto que não houve alteração da proporção de folhas verdes. Além disso, apesar da maior oferta de forragem durante o mês de fevereiro, os

maiores teores de FDNcp e da fração indigestível, FDNi, podem ter interferido no teor de proteína bruta.

A concentração de proteína bruta sugerida para proporcionar a disponibilidade de nitrogênio amoniacal ruminal necessária para não restringir o crescimento microbiano, e conseqüentemente, a utilização dos carboidratos fibrosos da forragem é de cerca de 100 g/kg de matéria seca (Detmann et al., 2010).

Para haver aumento no consumo voluntário de forragem, a disponibilidade de N deve ser maior que a necessária para a degradação ruminal, elevando essa concentração de PB próxima a 145 g/kg MS (Detmann et al., 2014). Em todo o período de avaliação do estudo, os teores de proteína bruta foram próximos ou superiores (15,33% PB) ao recomendado para não limitar o consumo de forragem.

Em razão da elevada qualidade da forragem presente no estudo, houve apenas tendência de estímulo no consumo de forragem causado pelo fornecimento do suplemento energético. Observou-se que o aumento no consumo total dos animais foi no mesmo nível em que o SE foi fornecido, caracterizando efeito aditivo no consumo (Moore, 1980; Detmann et al., 2010).

O teor elevado de proteína bruta e a alta digestibilidade da forragem foram respostas ao manejo de pasto adotado. Observa-se, ainda, que a forragem apresentou a fração A do N em torno de 26,64%. Dessa forma, para melhor eficiência da utilização da proteína, é necessário a sincronização da degradação ruminal entre energia e proteína do pasto, justificando a utilização do suplemento energético.

De acordo com Poppi e McLennan (1995), quando a relação entre o teor de proteína bruta e o valor energético da forragem excede 210 g de PB/kg de matéria orgânica digestível (MOD) ocorrem perdas e/ou transferência incompleta da proteína ingerida para o intestino, e a maior eficiência ocorre quando esses valores são inferiores a 160 g de PB/kg MOD. Em todos os tratamentos esses valores excederam a referência de 210 g de PB/kg de MOD (valores gerais em média 265,48 g de PB/kg MOD), sugerindo a necessidade do fornecimento de suplemento com maior teor de energia em situações como a do nosso estudo.

Além disso, a menor eficiência apresentada pelos animais que consumiram os suplementos com a inclusão dos aditivos fitogênicos é justificada

pela tendência de menor digestibilidade da matéria orgânica observada no rúmen desses animais.

O consumo de MS total dos animais que receberam apenas suplemento mineral foi abaixo (5,17 kg/dia) do valor predito (6,05 kg/dia) pelas exigências nutricionais estabelecidas pelo BR-Corte 3.0 (Valadares Filho et al., 2016) em animais com peso corporal médio de 270 kg e ganho médio diário de 0,800 kg/dia. O menor consumo de MS total, proporcionou também, menores consumos de energia digestível e energia metabolizável do que o preconizado pelo BR-Corte 3.0 (Valadares Filho et al., 2016).

Consequentemente, o menor consumo de MS total dos animais suplementados apenas com suplemento mineral influenciou o ganho médio diário. O GMD nos animais que receberam apenas suplemento mineral foi 11,5% menor comparado aos animais que receberam suplemento energético.

Considerando essas exigências nutricionais o consumo de MS total dos animais que receberam o suplemento energético (7,87 kg/dia) foi acima do máximo preconizado pelo BR-Corte 3.0 (6,65 kg/dia; Valadares Filho et al., 2016) com maior consumo de energia digestível e metabolizável também. Em virtude do maior consumo de MS advindo do SE, o consumo de proteína bruta desses animais foi 55,23% maior do que o preconizado pelo BR-Corte 3.0 (Valadares Filho et al., 2016) de 760,13 g/dia para ganhos de 800 gramas/dia.

De acordo com a composição químico-bromatológica dos suplementos energéticos, os teores de matéria mineral foram elevados, cerca de 33,5%, indicando a adição de elevado teor de material inerte em sua composição.

Além disso, o suplemento energético foi composto por farelo de glúten de milho, proporcionando suplemento com menor energia bruta (MJ/kg MS) quando comparado a um suplemento composto por milho e polpa cítrica como fonte de energia, conforme visto no estudo de Barbero et al. (2015). Adicionalmente, a oferta de forragem (kg MS/kg PC) e composição foram semelhantes nos dois estudos, justificando o menor ganho de peso proporcionado pelo suplemento energético.

O modelo proposto por Mott (1960) descreve o ponto ótimo de ganho por animal (kg/animal/dia) e ganho por área (kg/ha), visto que quando ocorre maior ganho por animal há condições de sub pastejo, pois, a taxa de lotação (UA/ha) é reduzida, resultando em altura de pastejo maior e alta oferta de forragem, mas

baixo ganho por área. O maior ganho individual ocorre, pois há menor competição de alimento pelos animais, possibilitando maior seletividade da forragem. O incremento no ganho por área pode ocorrer com o aumento na taxa de lotação, no entanto, o máximo ganho por animal não é mais obtido.

O ganho médio diário responde ao aumento da oferta de forragem (kg MS/kg PC), atingindo maior ganho de peso por animal (kg/cab/dia), no entanto, para conciliar com maior ganho por área (kg/ha) é necessário fornecer aos animais nutrientes complementares por meio da suplementação (Sollenberger e Vanzant et al., 2011). Dessa forma, a inclusão do suplemento energético permitiu aumentar a intensidade de pastejo, obtendo maior taxa de lotação (UA/ha), e consequentemente, maior ganho por área (kg/ha), além do maior GMD.

Adicionalmente, a composição do suplemento energético pode ter sido um dos fatores que influenciaram a falta de efeito dos aditivos fitogênicos no GMD, pois outros nutrientes podem ter sido limitantes, como a energia, visto que a EB no suplemento utilizado por Barbero et al. (2015) foi de 20,1 MJ/kg MS enquanto em nosso estudo foi de 12,96 MJ/kg MS. Além disso, a dose dos aditivos fitogênicos fornecida no presente estudo foi de 0,15% da MS ingerida, enquanto Min et al. (2012) encontraram GMD 20% maior em novilhas suplementadas com taninos de castanha, fonte de taninos hidrolisáveis, com dose fornecida de 1,5% do consumo de matéria seca.

Concentrações de tanino acima de 2% da MS da dieta podem reduzir o CMS e, consequentemente, o desempenho animal (Jayanegara et al., 2012). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo foram consistentes, pois a inclusão da baixa concentração de taninos hidrolisáveis não afetou o CMS e GMD. Da mesma forma, Beauchemin et al. (2007) não verificaram efeitos de taninos condensados a 0%, 1% e 2% da MS da dieta sobre esses parâmetros em novilhos (223 kg peso corporal inicial), alimentados com dieta de 70% da MS de forragem.

Os aditivos fitogênicos incluídos na dieta não alteraram a emissão de CH₄ entérico, a qual tendeu ser maior nos animais que receberam suplemento energético, independente da inclusão de aditivos.

Em análise de uma base de dados intercontinental (dados da Europa, América do Norte, Brasil, Austrália e Coreia do Sul) as equações indicaram

relação positiva da produção de CH₄ com o CMS, pois a quantidade de substrato disponível para a fermentação microbiana e, conseqüentemente, para a metanogênese é maior (Van Lingen et al., 2019). Vacas alimentadas com feno que continha 4,5% de taninos hidrolisáveis também tiveram a emissão de CH₄ positivamente correlacionada com o CMS (Stewart et al., 2019).

Associação positiva entre suplemento energético sem aditivo e abundância ruminal de Archaeas do filo Euryarchaeota e do gênero *Methanobrevibacter.spp.* foi verificada em estudo com o fornecimento do mesmo suplemento (Teobaldo, 2021; dados não publicados) e essa associação pode ser relacionada ao efeito na degradação da matéria orgânica (Zhang et al., 2019).

As perdas de energia dos alimentos, calculada pela taxa de conversão de energia bruta consumida pelo animal que é transformada em CH₄ (Ym %) é cerca de 2 a 12% (Johnson e Johnson, 1995) com maiores perdas em animais alimentados com forragem (IPCC, 2019).

O fornecimento de alimentos concentrados pode influenciar a taxa de conversão da energia bruta em CH₄, pois a digestibilidade da dieta influencia a conversão. De acordo com o IPCC (2019) dietas com digestibilidade entre 63% e 70% podem ser caracterizadas como dietas de boa qualidade e apresentam emissão de CH₄ com Ym de 6,3%. No presente estudo, as digestibilidades das dietas foram menores que 63% (exceto em animais suplementados com suplemento energético sem aditivo).

Em relação ao efeito da dose de taninos fornecida, a emissão de CH₄ entérico de bovinos de corte alimentados com dieta de alta forragem, em dose de 1,5% da MS da dieta de taninos condensados, hidrolisáveis ou a combinação apresentou tendência em reduzir as emissões de CH₄ (Aboagye e Beauchemin 2018). Os autores ressaltaram ainda, que, os taninos em baixas concentrações (doses de 0,25% da MS da dieta) se ligam com componentes da dieta como as fibras e proteínas, e são insuficientes para provocar efeito inibitório nas metanogênicas.

Os microrganismos metanogênicos são altamente sensíveis a toxicidade causada pelos produtos da degradação dos taninos hidrolisáveis, como o ácido gálico, ácido galotânico e pirogalol (Scalbert, 1991). No entanto, os taninos condensados têm ligação mais forte com os nutrientes do que os taninos hidrolisáveis e não se degradam no ambiente ruminal (McSweeney et al., 2001),

podendo até mesmo reduzir a digestibilidade dos nutrientes (Ahnert et al., 2015; Yang et al., 2017).

Em estudos *in vitro*, a produção de CH₄ foi reduzida em mais de 40% com a suplementação com extratos de tanino de castanha na dose 37,8 g/kg MS e de valonea em 35,6 g/kg MS, ambos extratos de taninos hidrolisáveis (Hassanat e Benchaar, 2012). Contrariamente, a dose de 11,9 g/kg MS de extrato de tanino de castanha não foi suficiente para reduzir a produção de CH₄ (Krueger et al., 2010). Dessa forma, além da fonte de tanino utilizado, a composição e o nível de suplementação interferem nos resultados obtidos com os extratos de taninos hidrolisáveis.

Além dos taninos hidrolisáveis, o *blend* de aditivos fitogênicos utilizado no estudo foi composto por óleos essenciais (carvacrol e cinamaldeído). A emissão de CH₄ não foi afetada pela inclusão dos aditivos fitogênicos. Isso pode ocorrer em função dos óleos essenciais poderem ser rapidamente metabolizados em formas menos ativas no rúmen, causando uma falta de efeitos, além da sua eficácia ser um fator dose-dependente (Patra, 2011). Altas doses de óleos essenciais podem afetar negativamente o consumo e a digestibilidade de nutrientes, e baixas doses podem, ainda, estimular essas variáveis, consequentemente, o desempenho animal seria melhorado (Patra, 2016; Teobaldo et al., 2020).

Doses maiores são sugeridas para se verificar o possível efeito desses aditivos fitogênicos na emissão de CH₄, em virtude de baixas concentrações poderem ser rapidamente metabolizadas pelos microrganismos do rúmen e ser insuficiente para provocar efeito nos microrganismos ruminais.

A complexidade do ambiente ruminal e a interação dos compostos presentes nos óleos essenciais com a fermentação da dieta dificultam a predição de efeitos dos óleos essenciais. Animais alimentados com dietas de alta forragem e um *blend* de óleos essenciais composto por timol, guaiacol e outros compostos, reduziram a digestibilidade da FDN (Beauchemin e McGinn, 2006). Contrariamente, Oh et al. (2019) não observaram efeito de um *blend* composto por carvacrol, eugenol e timol, fornecido na dose de 35 g/cab/dia, na digestibilidade da FDN.

Os taninos hidrolisáveis, presentes no *blend* utilizado em nosso estudo, geram produtos em sua degradação que são tóxicos para microrganismos

fibrolíticos como *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e populações de fungos anaeróbicos, reduzindo a degradação da fibra no rúmen (Jayanegara et al., 2015). Tendência de redução da abundância de um gênero de bactérias da família *Ruminococcaceae* (*Ruminococcaceae*.UCG-010), *Roseburia spp.* e *Moryella spp.* foi verificado por Teobaldo (2021) avaliando o *blend* de aditivos fitogênicos composto por taninos hidrolisáveis e óleos essenciais (carvacrol e cinamaldeído) utilizado em nosso estudo.

A inclusão de 3% de taninos condensados na dieta de vacas causou redução na digestibilidade da MS, FDN e FDA, e em menor grau, taninos hidrolisáveis na mesma dose afetaram negativamente a digestibilidade desses nutrientes (Zhang et al., 2019). Adicionalmente, a infusão intraruminal de taninos condensados em doses de 4% e 6% da MS ingerida proporcionaram redução na digestibilidade da FDN (Ahnert et al., 2015). Efeito semelhante foi observado nos animais que receberam os aditivos fitogênicos neste estudo na digestibilidade da MS, FDN e energia.

Além disso, os taninos podem formar complexos com as enzimas digestivas secretadas por bactérias (Lee et al., 2009), afetando a digestibilidade de nutrientes no rúmen, e ainda, a fermentação ruminal dos carboidratos pode ser reduzida pela indisponibilização dos carboidratos para a digestão devido a uma formação complexa dos taninos com carboidratos da parede celular que podem impedir a fixação microbiana (McAllister et al., 1994; Smith et al., 2005).

Apesar da redução da digestibilidade desses nutrientes no estudo, o desempenho dos animais que receberam os aditivos fitogênicos não foi comprometido. Adicionalmente, o efeito de redução na digestibilidade da MS e da fibra foram encontrados em estudos com maiores doses de taninos ou de óleos essenciais. Em razão da baixa concentração dos aditivos fitogênicos utilizados nesse estudo esses resultados não eram esperados.

Independente da inclusão dos aditivos fitogênicos nos suplementos, o fornecimento de suplemento energético aumentou a digestibilidade da MS, PB e da energia. Em forragens de alta qualidade, o perfil químico da PB apresenta altas proporções de compostos nitrogenados não-proteicos (NNP) e de compostos nitrogenados associados à fibra insolúvel (PIDN) (Detmann et al., 2005).

Dessa forma, a velocidade de disponibilização da energia da forragem não é compatível com a alta degradação do NNP da forragem, havendo um desbalanço metabólico de proteína metabolizável/energia metabolizável (Detmann et al., 2010), o que pode ser melhorado com o fornecimento do suplemento energético.

5. CONCLUSÃO

O maior consumo de nutrientes ocasionado pelo consumo de suplemento energético não influencia a emissão de metano entérico. A inclusão do suplemento energético melhora a digestibilidade de nutrientes, e consequentemente o desempenho produtivo de tourinhos Nelore em pastejo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, durante o período das águas.

A inclusão de aditivos fitogênicos compostos por óleos essenciais (carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis), na dose de 1,5 g/kg MS ingerida afeta negativamente a digestibilidade de nutrientes e não possui potencial para reduzir as emissões de CH₄ entérico.

6. REFERÊNCIAS

Aboagye IA, Oba M, Castillo AR, Koenig KM, Iwaasa AD, Beauchemin KA (2018) Effects of hydrolyzable tannin with or without condensed tannin on methane emissions, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. **Journal of Animal Science** 96:5276-5286.

Aboagye IA, Oba M, Koenig KM, Zhao GY, Beauchemin KA (2019) Use of gallic acid and hydrolyzable tannins to reduce methane emission and nitrogen excretion in beef cattle fed a diet containing alfalfa silage. **Journal of Animal Science** 97:2230-2244.

Ahnert S, Dickhoefer U, Schulz F, Susenbeth A (2015) Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. **Livestock Science** 177:63-70.

Association of Official Agricultural Chemists – **AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 771 p. 1990.

Barbero RP, et al. (2015) Combining Marandu grass grazing height and supplementation level to optimize growth and productivity of yearling bulls. **Animal Feed Science and Technology** 209:110-118.

Beauchemin KA, McGinn SM (2006) Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science** 84, 1489–1496.

Beauchemin KA, McGinn SM, Martinez TF, McAllister TA (2007) Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science** 85:1990–1996.

Beauchemin KA, McGinn SM, Martinez TF, McAllister TA (2007) Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science** 85:1990–1996.

Berndt A, Boland TM et al. (2014) **Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Pages 166. M. G. Lambert, ed. New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre, New Zealand.

Cardoso AS et al (2016) Impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems** 143:86-92.

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

Clark S, Daly R, Jordan E, Lee J, Mathew A, Ebner P (2012) The future of biosecurity and antimicrobial use in livestock production in the United States and the role of extension. **Journal Animal Science** 90:2861–2852.

Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC, Yu Z (2016b) Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology** 215:25-36.

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.

Delevatti LM, Cardoso AS, Barbero RP, Leite RG, Romanzini EP, Ruggieri AC, Reis RA (2019) Effect of nitrogen application rate on yield, forage quality, and animal performance in a tropical pasture. **Scientific Reports** 9:7596.

Detmann E, Paulino MF, Cecon PR et al. (2005) Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante o período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e dos compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia** 34(4):1380-1391.

Detmann E, Paulino MF, Valadares Filho SC (2010) Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: **Anais** do 7º Simpósio de Produção de Gado de Corte, Viçosa. pp.191-240.

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

Dijkstra J, Oenema O, Van Groenigen JW, Spek JW, Van Vuuren AM, Bannink A (2013) Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal** 7(2):292–302.

Dubeux JCB, Jr. RL, Stewart Jr., Sollenberger LE, Vendramini JMB, Interrante SM (2006) Spatial heterogeneity of herbage response to management intensity in continuously stocked Pensacola bahiagrass pastures. **Agronomy Journal** 98:1453–1459.

Halls LK (1954) The approximation of cattle diet through herbage sampling. **Rangeland Ecology and Management** 7:269–270.

Hassanat F, Benchaar C (2012) Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.

Hodgson J (1990) Grazing management: science into practice. Harlow, Essex, UK: Longman Scientific and Technical.

Hristov AN, et al (2013) Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science** 91, 5045–5069.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2019. Emissions from livestock and manure management. In: **2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. Vol. 4. Bracknell: IPCC.

Jayanegara A, Goel G, Makkar HPS, Becker K (2015) Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. **Animal Feed Science and Technology** 209:60–68.

Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M (2012) Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition** 96:365–375.

Johnson KA, Johnson DE (1994) Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science and Technology** 28:359-362.

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. 73: **Journal of Animal Science** 2483–2492.

Krueger WK et al. (2010) Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology** 159, 1–9.

Kittelmann S, Pinares-Patino CS, Seedorf H, Kirk MR, Ganesh S, McEwan JC, et al. (2014) Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. **Plos One** 9(7):e103171.

Lee JH, Vanguru M, Kannan G, Moore DA, Terrill TH, Kouakou B (2009) Influence of dietary condensed tannins from sericea lespedeza on bacterial loads in gastrointestinal tracts of meat goats. **Livestock Science** 126:314–317.

Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Science Feed Technology** 57: 347.

McAllister TA, Bae HD, Yanke LJ, Cheng K.-J. (1994) Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. **Canadian Journal Microbiology** 0:298Y305.

McSweeney CS, Palmer B, Mcneill DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science Technology** 91:83–93.

Min BR, Pinchak WE, Hernandez K, Hume ME, Valencia E, Fulford JD (2012) Effects of plant tannin supplementation on animal responses and in vivo ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. **The Professional Animal Scientist** 28:464-472.

Moore JE. Forage crops. In: HOVELAND, C.S. (Ed.). **Crop quality, storage, and utilization**. Madison: Crop Science Society of America, 1980.

Mott GO (1960) Grazing pressures and the measurement of pastures production. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 8., 1960, **Proceedings...** Reading: 1960. p.606-611.

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

National Research Council, NRC (1996) **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press.

Oh J, Harper M, Hristov AN (2019) Effects of lowering crude protein supply alone or in a combination with essential oils on productivity, rumen function and nutrient utilization in dairy cows. **Animal** 1-9.

Ornaghi MG, et al (2017) Essential oils in the diet of young bulls: Effect on animal performance, digestibility, temperament, feeding behaviour and carcass characteristics. **Animal Feed Science and Technology** 234:274-283.

Patra AK (2011) Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances** 6:416–428.

Patra AK (2016) Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. **Frontiers in Veterinary Science** 3, 1–17.

Patra AK, Saxena J (2011) Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition – Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91:24-37.

Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC (2006) Suplementação animal em pasto: energética ou protéica? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3, 2006, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZOUFV, 2006. p.359-392.

Paulino MF, Figueiredo DM, Moraes EHBK et al. Suplementação de bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE

CORTE, 4., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: SIMCORTE, 2004. p.93-144.

Poppi DP, McLennan SR (1995) Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science** 73:278- 290.

Reis RA, Ruggieri AC, Casagrande DR, Páscoa AG (2009) Supplementation of beef cattle as strategy of pasture management. **Revista Brasileira de Zootecnia** 38:147–159.

Robertson JB, Van Soest PJ (1981) The detergent system of analysis. In: James WPT, Theander O. (Eds.). **The Analysis of Dietary Fibre in Food**. Marcel Dekker, NY, Chapter 9, p. 123–158.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** 30:3875-3883.

Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI (2005) Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. **Microbial Ecology** 50:197–205.

Sollenberger LE, Vanzant ES (2011) Interrelationships among Forage Nutritive Value and Quantity and Individual Animal Performance. **Crop Science** 51:420-432.

Stewart EK, Beauchemin KA, Dai X, MacAdam JW, Christensen RG, Villalba JJ (2019) Effect of tannin-containing hays on enteric methane emissions and nitrogen partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 97(8):3286-3299.

Street JC, Butcher JE, Harris LE (1964) Estimating urine energy from urine nitrogen. **Journal of Animal Science** 23:1039-1041.

Teobaldo RW, De Paula NF, Zervoudakis JT, Fonseca MA, Cabral LS, Martello HF, Rocha JKL, Ribeiro IJ, Mundim AT (2020) Inclusion of a blend of copaiba, cashew nut shell and castor oil in the protein-energy supplement for grazing beef cattle improves rumen fermentation, nutrient intake and fibre digestibility. **Animal Production Science** 60:1039–1050.

Valadares Filho SC, Costa e Silva LF, Lopes SA et al (2016) BR-CORTE 3.0. **Cálculo de exigências nutricionais, formulação de dietas e predição de desempenho de zebuínos puros e cruzados**. 2016. Disponível em www.brcorte.com.br. Acesso em 15/03/2019.

Valente ALS, et al (2014) Grazing height effect on Marandu characteristics and performance of young Nellore Bulls. In. Australian Society Animal Production. **Proceedings...**Canberra, Australia, 2014.

Valente TNP, Detmann E, Queiroz AC, Valadares Filho SC, Gomes DI, Figueiras JF (2011) Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:2565-2573.

Van Lingen HJ, Niu M, et al. (2019) Prediction of enteric methane production, yield and intensity of beef cattle using an intercontinental database. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 283:106575.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** 74:3583-3597.

Vakili AR, Khorrami B, Mesgaran MD, ParandE (2013) The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 26, 935–944.

Yang K, Wei C, Zhao GY, Xu ZW, Lin SX (2017) Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 101:302-310.

Zhang J, Xu X, Cao Z, Wang Y, Yang H, Azarfar A, Li S (2019) Effect of Different Tannin Sources on Nutrient Intake, Digestibility, Performance, Nitrogen Utilization, and Blood Parameters in Dairy Cows. **Animals** 9:507.

CAPÍTULO 3 – ADITIVOS FITOGÊNICOS ALTERAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL, EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E COMUNIDADE BACTERIANA RUMINAL DE TOURINHOS NELORE SUPLEMENTADOS E EM PASTEJO NO PERÍODO DAS ÁGUAS?

RESUMO – Objetivou-se avaliar o consumo e digestibilidade de nutrientes, parâmetros ruminais, eficiência de utilização de nitrogênio e comunidade bacteriana ruminal de tourinhos Nelore em pastos de capim Marandu durante o período das águas recebendo suplemento energético ou suplemento mineral, sem ou com inclusão de aditivos fitogênicos (*blend* carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis), na dose de 1,5 g/kg de MS ingerida. Oito tourinhos Nelore, castrados, canulados no rúmen, com peso corporal médio de 456,6 kg $\pm$ 32,8 kg, foram distribuídos em delineamento quadrado latino duplo 4x4, com arranjo fatorial 2x2. Os tratamentos avaliados foram: 1 – Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos (SESAF); 2 – Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos (SECAF); 3 – Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos (SMSAF); 4 – Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos (SMCAF). Os suplementos energéticos foram fornecidos na quantidade de 0,3% do peso corporal e os suplementos minerais, foram fornecidos *ad libitum*. Os períodos de avaliação foram de 21 dias (14 dias - adaptação à dieta; 7 dias - coleta de amostras). Não houve interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos no consumo, digestibilidade da MS e de nutrientes e parâmetros ruminais. O consumo da MS total ($P = 0,001$), MO ($P = 0,003$), PB ($P = 0,006$), FDNcp ($P = 0,017$) e de energia ($P < 0,05$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. O consumo de MS e de nutrientes não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos aditivos fitogênicos. A digestibilidade da MS ($P = 0,0004$), MO ($P < .0001$), PB ($P < .0001$), FDNcp ($P = 0,0006$) e de energia ($P < .0001$) foram maiores nos animais que consumiram suplemento energético. A digestibilidade da MS apresentou tendência de redução ($P = 0,073$) nos animais que consumiram aditivos fitogênicos. O pH, AGCC total e proporção de isobutirato (%) não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos aditivos fitogênicos. Houve tendência de maior proporção de propionato ($P = 0,074$) no rúmen dos animais que consumiram os aditivos fitogênicos, com incremento de 1,98%. Houve interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos na excreção de N na urina ($P = 0,033$), sendo maior a excreção em animais que consumiram suplemento energético sem aditivos. Não houve efeito dos suplementos e aditivos fitogênicos na eficiência microbiana ($P > 0,05$). Os aditivos fitogênicos tenderam reduzir a abundância da família *Ruminococcaceae*.UCG-010 ($P = 0,089$), *Roseburia* spp. ($P = 0,081$) e *Lachnospiraceae* NK3A20 group ($P = 0,089$). O suplemento energético melhora a utilização de nutrientes e eficiência de utilização do nitrogênio. A inclusão do *blend* de aditivos fitogênicos, na dose 1,5 g/kg MS consumida, em suplemento energético ou suplemento mineral fornecidos a tourinhos Nelore em pastejo durante o período das águas, altera a comunidade microbiana ruminal e não possui potencial para melhorar a utilização de nutrientes.

Palavras-chave: microbiota ruminal, taninos hidrolisáveis, uso de nitrogênio

CHAPTER 3 – PHYTOGENIC ADDITIVES ALTER RUMINAL FERMENTATION, NITROGEN UTILIZATION EFFICIENCY AND RUMEN BACTERIAL COMMUNITY OF NELLORE BULLS SUPPLEMENTED AND GRAZING IN THE RAINY SEASON?

ABSTRACT – This study aimed to evaluate nutrient intake and digestibility, ruminal parameters, nitrogen utilization efficiency and ruminal bacterial community of Nelore bulls in Marandu grass pastures during the period of water receiving energy supplement or mineral supplement, without or with the inclusion of phytogenic additives (blend carvacrol, cinnamaldehyde and hydrolysable tannins), at a dose of 1.5 g/kg of ingested DM. Eight Nelore bulls, castrated, cannulated in the rumen, with an average body weight of 456.6 kg $\pm$ 32.8 kg, were distributed in a 4x4 double Latin square design, with a 2x2 factorial arrangement. The treatments evaluated were: 1 – Energy supplement without inclusion of phytogenic additives (SESAF); 2 – Energy supplement with inclusion of phytogenic additives (SECAF); 3 – Mineral supplement without inclusion of phytogenic additives (SMSAF); 4 – Mineral supplement with inclusion of phytogenic additives (SMCAF). Energy supplements were provided in the amount of 0.3% of body weight and mineral supplements were provided ad libitum. The evaluation periods were 21 days (14 days - adaptation to the diet; 7 days - sample collection). There was no interaction supplement x blend of phytogenic additives in consumption, DM and nutrient digestibility and ruminal parameters. Total MS intake ($P = 0.001$), MO ($P = 0.003$), CP ($P = 0.006$), NDFcp ($P = 0.017$) and energy ($P < 0.05$) were higher in animals that consumed an energy supplement. DM and nutrient intake were not influenced ($P > 0.05$) by phytogenic additives. MS digestibility ($P = 0.0004$), MO ($P < .0001$), CP ($P < .0001$), NDFcp ($P = 0.0006$) and energy ($P < .0001$) were higher in animals that consumed energy supplement. DM digestibility showed a tendency to decrease ($P = 0.073$) in animals that consumed phytogenic additives. pH, total SCFA and proportion of isobutyrate (%) were not influenced ($P > 0.05$) by phytogenic additives. There was a trend towards a higher proportion of propionate ($P = 0.074$) in the rumen of the animals that consumed the phytogenic additives, with an increase of 1.98%. There was an interaction supplement x blend of phytogenic additives in the excretion of N in the urine ($P = 0.033$), with higher excretion in animals that consumed energy supplement without additives. There was no effect of supplements and phytogenic additives on microbial efficiency ($P > 0.05$). Phytogenic additives tended to reduce the abundance of the Ruminococcaceae family. UCG-010 ($P=0.089$), Roseburia spp. ($P=0.081$), and Lachnospiraceae NK3A20 group ($P=0.089$). The energy supplement improves nutrient utilization and nitrogen utilization efficiency. The inclusion of the blend of phytogenic additives, at a dose of 1.5 g/kg DM consumed, in an energy supplement or mineral supplement provided to Nelore young bulls grazing during the wet season, alters the ruminal microbial community and does not have the potential to improve utilization of nutrients.

Keyword: hydrolyzable tannins, nitrogen use, ruminal microbiota

1. INTRODUÇÃO

A atividade microbiana ruminal é responsável por grande parte do suprimento de nutrientes como proteínas, energia e minerais ao hospedeiro. Compostos como os ionóforos têm potencial para melhorar a eficiência de utilização desses nutrientes, mas sua utilização tem sido banida em função de possível resistência bacteriana e resíduos em produtos de origem animal (Tedeschi et al., 2011; Clark et al., 2012). Dessa forma, os aditivos fitogênicos surgem como alternativa para substituição desses compostos, para manipular o ambiente ruminal e melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes em ruminantes.

Os compostos presentes nos óleos essenciais como o cinamaldeído, derivado da canela, tem demonstrado alto poder antioxidante (Biondo et al., 2017) e atividade antimicrobiana (Patra and Yu, 2012), em função da presença de compostos químicos da classe fenilpropanoides (Geraci et al., 2012). O grupo carbonila presente no cinamaldeído é capaz de se ligar às proteínas e enzimas da parede celular microbiana e causar danos à membrana citoplasmática, com consequente perda de viabilidade (Nazzaro et al., 2013). Estudos *in vitro* sugerem que este composto pode melhorar a eficiência de energia e utilização de N no rúmen (Busquet et al., 2006).

Oriundo do orégano, o composto fenólico carvacrol é considerado um forte antimicrobiano (Calsamiglia et al., 2007), devido ao grupo hidroxila presente em sua molécula, que funciona como um transportador de íons, e a alta hidrofobicidade. Essas moléculas hidrofóbicas penetram, principalmente, na célula das bactérias Gram-positivas, e podem atuar tanto na parede celular como no citoplasma (Nazzaro et al., 2013).

De acordo com a dose do composto utilizado, os óleos essenciais podem prejudicar nas bactérias as enzimas necessárias à produção de energia ou até mesmo desnaturar proteínas (Tiwari et al., 2009). O carvacrol tem o potencial de modular a fermentação ruminal *in vitro*, reduzindo a degradabilidade ruminal da proteína e reduzindo relação acetato:butirato (Garcia et al., 2007).

Por outro lado, os taninos hidrolisáveis (poliésteres de ácido gálico e vários açúcares individuais), que são compostos polifenólicos solúveis em água,

sintetizados durante o metabolismo secundário das plantas e possuem potencial de ação antimicrobiana por reagirem com a parede celular dos microrganismos e com as enzimas extracelulares secretadas, podem influenciar tanto bactérias quanto Archaeas metanogênicas (Jayanegara et al., 2015; Witzig et al., 2018; Aboagye et al., 2018). Apesar de também apresentarem esse potencial, os taninos condensados podem afetar negativamente a digestibilidade dos nutrientes (Ahnert et al., 2015), contrariamente ao observado com a inclusão de taninos hidrolisáveis (Aboagye et al., 2019).

Níveis de inclusão baixos a moderados (normalmente ≤ 20 g/kg de MS) de taninos hidrolisáveis têm sido utilizados (Krueger et al., 2010; Toral et al., 2011; Stewart et al., 2019) para evitar a toxicidade decorrente da sua degradação por alguns microrganismos do rúmen (Nelson et al., 1995) e obter efeitos benéficos, como maior concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen do que quando utilizados taninos condensados (Costa et al., 2018), redução na excreção de nitrogênio urinário (Aboagye et al., 2019) e menor relação acetato:propionato (Yang et al., 2017).

Entretanto, o estudo da associação de taninos hidrolisáveis e óleos essenciais na dieta de bovinos a pasto e seus efeitos no ambiente ruminal é ainda limitado. As hipóteses estudadas foram que o uso combinado de taninos hidrolisáveis e óleos essenciais reduz a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, aumenta a proteína metabolizável, e consequentemente, reduz a excreção de nitrogênio via urina. Além disso, a manipulação do ambiente ruminal reduz a proporção relativa de Archaeas metanogênicas.

Objetivou-se a inclusão de um *blend* de aditivos fitogênicos, óleos essenciais (carvacrol e cinamaldeído) e taninos hidrolisáveis, na dose 1,5 g/kg MS consumida, em suplemento energético ou suplemento mineral, fornecidos a tourinhos Nelore em pastejo em *Urochloa brizantha* cv. Marandu durante o período das águas, para avaliar os efeitos sobre os parâmetros ruminiais, consumo e digestibilidade de nutrientes, eficiência de utilização de nitrogênio e na comunidade bacteriana ruminal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental cumpriu os Princípios Éticos para Pesquisa em Animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP; Protocolo nº 12703/15).

2.1. Local e área experimental

O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo, durante o período das águas, de janeiro de 2018 a abril de 2019, com tourinhos Nelore em pastejo em *Urochloa brizantha* cv. Marandu, recebendo suplemento energético ou suplemento mineral, com ou sem aditivos fitogênicos.

Os dados meteorológicos, temperatura (°C) e precipitação (mm) registrados durante o período experimental pela Estação Agroclimatológica do Campus de Jaboticabal, localizada na latitude 21°14'05” sul, e longitude 48°17'09” oeste com altitude de 615 metros, apresentaram média nos meses de janeiro, fevereiro, março e abril de 26,1°; 24,4°; 24,5°; 23,9° e 148,1 mm; 282,6 mm; 115,2 mm; 97,6 mm, respectivamente. Após o término do experimento, os dados foram extraídos do acervo de dados do Departamento de Ciências Exatas da Estação Agroclimatológica.

A área destinada aos animais era formada por *Urochloa brizantha* cv. Marandu, dividida em 12 piquetes experimentais, com área total de 12 ha, e piquetes de 0,7 e 1,3 ha, foi utilizada juntamente com animais destinados a avaliação de desempenho animal (Teobaldo, 2021; dados não publicados). O ajuste da taxa de lotação foi realizado com o auxílio de uma área reserva de 1 ha. O pasto foi manejado a 25 cm de altura, por meio da técnica “*put and take*” (Mott & Lucas, 1952), com os animais mantidos em sistema de pastejo contínuo e taxa de lotação variável.

A área foi adubada de acordo com a análise de solo realizada, e foram aplicados 100 kg/ha de P₂O₅, 200 kg/ha de K₂O, divididos em duas aplicações, e 180 kg/ha de N, divididos em três aplicações. A fonte de nitrogênio utilizada foi o nitrato de amônio, e as aplicações foram realizadas em 16 de dezembro de

2018, 24 de janeiro de 2019 e 02 de março de 2019, coincidindo com as condições climáticas favoráveis a aplicação.

Os animais tinham acesso a cocho (30 cm lineares por animal) e bebedouro, e o centro de manejo da área é dotado de curral com tronco de contenção, balança digital e apartador, onde foram realizadas as coletas das amostras.

2.2. Animais e tratamentos experimentais

Oito tourinhos Nelore, castrados, canulados no rúmen, com peso corporal médio de $456,6 \text{ kg} \pm 32,8 \text{ kg}$, distribuídos em delineamento quadrado latino duplo 4×4 , em arranjo fatorial 2×2 (A x B; 2 suplementos – A: suplemento energético e suplemento mineral; Aditivo – B: sem aditivos fitogênicos e com aditivos fitogênicos).

Os animais foram alocados na área experimental e foram adaptados ao ambiente em 18 de dezembro de 2018. Após 14 dias de adaptação às condições experimentais, iniciou-se os períodos de avaliação, sendo quatro períodos de 21 dias, em que os 14 dias iniciais eram destinados à adaptação dos animais à dieta experimental e os 7 dias finais à coleta de amostras.

Os tratamentos consistiram de quatro suplementos (Tabela 1): Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos (SESAF); Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos (SECAF); Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos (SMSAF); e Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos (SMCAF). O *blend* de aditivos fitogênicos continha carvacrol, cinamaldeído e taninos hidrolisáveis, fornecidos na dose de 1,5 g/kg de MS ingerida.

Os suplementos foram fornecidos diariamente as 09:00 h, sendo os suplementos energéticos foram fornecidos na proporção de 0,3% do peso corporal (PC), em que foram feitos ajustes semanais na quantidade ofertada. Os suplementos minerais (suplemento mineral) foram fornecidos *ad libitum*.

Tabela 1. Composição química e fracionamento de proteína dos suplementos energético e da forragem utilizados durante o período das águas

Item	Suplementos ¹		Forragem				
	SESAF	SECAF	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Média
<i>Composição química²</i>							
MM (%)	34,02	33,12	-	-	-	-	-
MO (%)	65,98	66,88	90,88	91,65	90,58	91,30	-
FDNcp (%)	30,32	30,31	53,10	57,89	52,14	55,55	-
FDNi (%)	15,75	15,61	16,13	18,74	17,41	19,32	-
Lignina (%)	1,70	1,16	3,42	3,82	3,83	4,14	-
EE (%)	1,81	2,11	2,66	2,28	2,61	2,40	-
EB (MJ/kg MS)	12,58	13,33	17,85	18,17	17,79	18,10	-
PB (%)	14,87	15,02	14,17	14,69	17,09	15,37	-
<i>Fração (% PB)</i>							
A	29,01	36,98	-	-	-	-	26,64
B1	6,33	6,48	-	-	-	-	7,40
B2	50,92	45,01	-	-	-	-	45,70
B3	10,89	8,76	-	-	-	-	14,20
C	2,85	2,77	-	-	-	-	6,06

¹SESAF: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SECAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; ²Composição química – MM: Matéria mineral; MO: Matéria orgânica; CNF: Carboidratos não fibrosos; FDNcp: Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; EE: Extrato etéreo; EB: Energia bruta; PB: Proteína bruta. ³Níveis de garantia suplemento mineral (SM): Cálcio – 123,0 g kg⁻¹; Fósforo – 90 g kg⁻¹; Cobre – 1.040,00 mg kg⁻¹; Manganês – 500 mg kg⁻¹; Zinco – 2.000,0 mg kg⁻¹; Cobalto – 15,0 mg kg⁻¹; Iodo – 67,0 mg kg⁻¹; Selênio – 14,0 mg kg⁻¹. ⁴SMAF – Níveis de garantia semelhantes ao SM com inclusão dos aditivos fitogênicos, composto por carvacrol, cinamaldeído e taninos.

2.3. Avaliação da forragem – Massa de forragem, composição morfológica e oferta de forragem

A manutenção da altura do pasto em 25 cm foi realizada por meio do ajuste nas taxas de lotação. Para isso, durante todo o período experimental, a altura média do dossel forrageiro foi mensurada semanalmente, a partir da medição de 80 pontos aleatórios por hectare, com auxílio de régua graduada.

A avaliação da massa de forragem e componentes morfológicos foi realizada a cada 28 dias. A altura média do dossel foi identificada em três pontos representativos e com o auxílio de uma moldura circular de 0,25 m² foi delimitada a área de corte da forragem rente ao solo.

As amostras coletadas foram pesadas e, posteriormente, obtidas duas sub-amostras. Em uma sub-amostra foi realizada a separação manual dos componentes para a determinação da composição morfológica, em material

morto (lâmina foliar seca e colmo seco + bainha), lâmina foliar verde, e colmo verde + bainha. A segunda sub-amostra foi utilizada para a estimativa da disponibilidade de matéria seca total (MST, kg MS/ha) de forragem de cada piquete. As sub-amostras foram pesadas e secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas, e posteriormente pesadas novamente.

A avaliação da carga animal em cada piquete foi utilizada juntamente com os dados de massa de forragem para a obtenção da estimativa de oferta de forragem (kg MS/kg de PC). Para a obtenção da oferta de forragem de folhas (kg MS de folhas/kg de PC) foram utilizados os dados de massa de forragem de folhas (kg de lâmina foliar verde) e a carga animal.

2.4. Valor nutritivo da forragem e suplemento – Análises químico-bromatológicas

A técnica de simulação manual de pastejo, descrita por Halls (1954), foi utilizada na coleta de amostra de forragem a cada 28 dias, no intuito de avaliar a composição química-bromatológica. Após cada coleta, as amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas.

As amostras foram processadas em moinho do tipo Willey com peneira de malha com crivo de 2 mm para as amostras destinadas à análise de FDNi (fibra em detergente neutro indigestível), conforme Valente et al. (2011), e com peneira de malha com crivo de 1 mm para as demais análises. Amostras dos suplementos energéticos foram coletadas e destinadas aos mesmos procedimentos de processamento.

Os procedimentos da AOAC (1990) foram utilizados para as análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), e proteína bruta (PB). O método de Dumas foi utilizado para a determinação do teor de PB por meio da combustão a seco, no equipamento Leco®, modelo FP-528 (Leco Corporation, Michigan, USA).

O equipamento Ankom® 2000 (Ankom Technologies, New York, USA) foi utilizado para as análises de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA). A α -amilase termo-estável (Van Soest et al., 1991) foi utilizada na determinação da FDN dos concentrados.

A determinação de FDA e lignina (H_2SO_4 72%) foram realizadas segundo Robertson e Van Soest (1981), e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) conforme recomendações de Licitra et al. (1996). Para a obtenção das estimativas de FDNi da forragem, dos concentrados e das fezes foi realizado o procedimento de incubação *in situ* por 288 horas de Valente et al. (2011).

O teor de energia bruta (EB) dos alimentos e das fezes foi determinado por bomba calorimétrica adiabática (PARR Instrument Company 6300, Illinois, USA). O teor de EB da urina foi estimado pela equação de Street et al. (1964): $\text{EB urina (kcal/g)} = 0,026 + 0,117 \times (\% \text{ nitrogênio da urina})$.

A energia digestível (ED) foi calculada a partir da digestibilidade aparente da EB, e a energia metabolizável foi estimada a partir da multiplicação da ED pelo fator corrigido encontrado após as perdas de energia bruta por CH_4 (Teobaldo, 2021) e urina, de cada tratamento: SE: 0,8457, SEAF: 0,8509, SM: 0,8246, SMAF: 0,8058.

Tabela 2. Efeito dos meses de avaliação na massa de forragem, composição morfológica e composição químico-bromatológica da forragem (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) durante o período das águas

Item ¹	Meses			
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
MFT (t MS/ha)	5,58	8,16	6,31	6,06
Oferta de forragem (kg MS/kg de PC)	3,84	4,70	3,62	3,29
Oferta de forragem MSpd (kg MSpd/kg de PC)	3,18	3,78	2,95	2,62
Oferta de forragem de folhas (kg MS/kg de PC)	1,18	1,40	1,08	1,01
<i>Composição morfológica (%)</i>				
Folhas verdes	30,98	30,54	30,90	31,20
Colmos verdes	30,02	27,77	19,71	25,09
Material Morto	39,00	41,69	49,39	43,71
Folha:Colmo	1,06	1,12	1,58	1,27

¹MFT: Massa de forragem total;

Foi realizada, ainda, a análise do fracionamento de proteínas dos suplementos energético fornecidos aos animais e da forragem durante o período das águas (Licitra et al., 1996) (Tabela 1).

2.5. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes

As avaliações de consumo e digestibilidade dos nutrientes foram realizadas entre os dias 16 e 18 de cada período experimental.

O indicador externo óxido crômico (Cr_2O_3) foi utilizado na estimativa da excreção fecal, sendo fornecido diretamente no rúmen dos animais, via cânula ruminal, diariamente às 09h00. Foram fornecidos 10 gramas de Cr_2O_3 por animal, acondicionado em cartuchos de papel, durante 10 dias, sendo sete dias de adaptação e os três dias finais de coleta de fezes. A excreção fecal foi determinada através da equação:

$$\text{Excreção fecal (g/dia)} = \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ fornecido (g/dia)} / \text{Concentração Cr}_2\text{O}_3 \text{ (g/kg MS)}$$

As coletas de fezes foram realizadas duas vezes ao dia, conforme programação: 16º dia – 07h00 e 13h00; 17º dia – 09h00 e 15h00; e 18º dia – 11h00 e 17h00. Posteriormente, as amostras foram secas a 55°C por 72 horas, processadas e realizada uma amostra composta dos 3 dias de coleta por animal, por período e armazenadas para posterior análise química.

A estimativa do consumo de forragem foi calculada a partir da estimativa da excreção fecal e da utilização da FDNi como marcador interno da forragem e suplemento. O consumo médio de suplemento na base da MS foi calculado a partir da quantidade média de suplemento fornecida (% do PC) por animal por piquete.

2.6. Parâmetros ruminais e metabolismo

Amostras de líquido ruminal foram coletadas no dia 20 de cada período experimental para avaliar o pH, a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH_3) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC's). As amostras foram coletadas antes da suplementação (0 horas) e 3, 6, 9 e 12 horas após a suplementação.

O conteúdo ruminal foi coletado via cânula e imediatamente filtrado em pano de queijo para a obtenção do líquido ruminal. Logo após, o pH ruminal foi aferido através de peagâmetro digital (Peagâmetro TEC 7, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). e registrado. Uma alíquota de 50 mL foi coletada e fixada com 1 mL

de ácido sulfúrico (1:1), congelada a -20° C para posterior análise da concentração de N-NH₃, mediante o método de Kjeldahl (AOAC, 1990). Uma segunda alíquota foi armazenada para a avaliação das concentrações de AGCC's, segundo as recomendações do método de Famme e Knudsen (1984), em cromatógrafo à gás (Shimadzu 2014 AF).

Amostras de urina foram coletadas conforme programação de coleta de fezes na forma de amostra *spot*, em micção espontânea dos animais, e foram imediatamente filtradas através de três camadas de gaze. Duas alíquotas foram armazenadas, sendo uma para a quantificação das concentrações urinárias de creatinina e ureia, e a segunda alíquota de 40 mL de urina pura foi destinada a análise de nitrogênio total, pelo método de combustão de Dumas, utilizando-se o equipamento Leco®, modelo FP-528 (Leco Corporation, Michigan, USA).

A determinação da concentração de creatinina foi obtida por método colorimétrico, através de *kits* comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) e utilizado para estimar o volume total de urina com base na relação entre a excreção diária de creatinina e o peso corporal, e a sua concentração nas amostras *spot* conforme equação proposta por Costa e Silva (2012).

A excreção diária de compostos nitrogenados (ureia e nitrogênio total) na urina foi estimada como o produto entre a sua concentração nas amostras *spot* e o valor estimado de volume urinário.

Os derivados de purinas foram calculados pela soma das quantidades de alatoína e ácido úrico excretados na urina, expressas em mmol/dia (Chen e Gomes, 1995). A partir da excreção de derivados de purinas, foram calculadas as purinas absorvidas (Y, mmol/dia), pela equação: $Y = (X - (0,30 \cdot PC^{0,75})) / 0,80$, em que: 0,80 = recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina; $0,30 \cdot PC^{0,75}$ = contribuição endógena para a excreção de purina (Barbosa et al., 2011).

Posteriormente, a síntese de nitrogênio microbiano no rúmen (Y, g N/dia) foi calculada a partir das purinas absorvidas (X, mmol, dia) pela equação proposta por Barbosa et al. (2011): $Y = 70X / 0,93 \times 0,137 \times 1000$, em que: 70 = o conteúdo de N de purinas (mg/mmol); 0,137 = a relação N purina:N total nas bactérias; 0,93 = a digestibilidade verdadeira das purinas microbianas;

A matéria orgânica digestível aparentemente fermentada no rúmen (MOADR) foi calculada pelo consumo de MO digestível pelos animais

multiplicado pelo fator 0,65 (ARC, 1984) e, posteriormente, utilizada para calcular a eficiência de síntese de proteína microbiana, expressa em gramas de nitrogênio microbiano por kg de MOADR.

A proteína microbiana foi calculada pela multiplicação do nitrogênio microbiano (g/dia) pelo fator 6,25 e a eficiência de proteína microbiana por kg de matéria orgânica digerida.

Amostras de sangue foram coletadas antes da suplementação (0 horas) e 4 horas após a suplementação no 21º dia experimental, diretamente da veia caudal utilizando tubos com vácuo e gel acelerador de coagulação, e armazenadas a -20°C para posterior determinação do nível sérico de ureia através de *kits* comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). A conversão dos valores de ureia em nitrogênio ureico foi realizada pela multiplicação dos valores obtidos por *kits* comerciais pelo fator 0,466.

2.7. Eficiência de uso de nitrogênio

O consumo de nitrogênio (N) total foi obtido a partir do N consumido a partir do suplemento e do pasto. O balanço de nitrogênio foi obtido com base nos valores de consumo de N total, e N excretado nas fezes e na urina (g/dia).

O nitrogênio absorvido (g/dia) foi obtido pela diferença entre o nitrogênio consumido e o nitrogênio excretado nas fezes. O nitrogênio retido (g/dia) foi obtido pela diferença entre o N consumido, e o N excretado nas fezes e na urina. A partir da razão entre o nitrogênio retido e a média de consumo de nitrogênio foi obtida a eficiência aparente de uso de nitrogênio.

2.8. Comunidade bacteriana ruminal

As análises da comunidade bacteriana ruminal foram realizadas em amostras de conteúdo ruminal coletadas antes da suplementação dos animais (Saro et al., 2012) no 20º dia de cada período experimental. Uma amostra de aproximadamente 50 g de conteúdo foi coletada da região ventral do rúmen, obtendo fração sólida e fração líquida do conteúdo ruminal, e foi imediatamente acomodada em caixas térmicas com gelo e transportada para o laboratório.

Para a formação do *pellet* bacteriano foi adicionado 50 mL de solução de PBS (pH 7,4) a 4°C e agitado manualmente por três minutos. O material preparado foi filtrado em pano estéril com porosidade de 100 micras. Os *pellets* bacterianos foram formados conforme metodologia de Granja-Salcedo et al. (2017).

A extração de DNA foi realizada utilizando 200 mg do *pellet* obtido e o *kit* de extração Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep (Henderson et al., 2013) e para a etapa de lise celular foi utilizado o FastPrep 24 (MP, Biomedical). O rendimento do DNA extraído foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop® ND- 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e fluorometria (Qubit® 3.0, kit Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit, Life Technologies), e a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8%.

A identificação e quantificação da comunidade bacteriana ruminal foi realizada pelo sequenciamento da região V5-V6 do gene 16S rRNA bacteriano, amplificado em reação de PCR utilizando-se o primer forward 515F (5'- GTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') e o reverse 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'). Para tal, foram utilizados 20 ng de DNA total de cada amostra, e 1,25 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para reação de PCR [1x]; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e H₂O para um volume final de 20 µL. As reações de PCR foram realizadas em 95°C por 3 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 53,8°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas em duplicata e reunidas equimolarmente.

A pureza dos produtos da PCR foi verificada em gel de agarose (1%) e o tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcador 1 kb plus DNA ladder (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A purificação dos fragmentos de PCR foi obtida usando o *kit* Zymoclean™ Gel DNA Recovery, conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado no Illumina MiSeq® utilizando o Reagent Kit v2 na *facilty* do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP.

As análises de bioinformática foram realizadas no software QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). As leituras foram demultiplexadas e filtradas em função da

qualidade usando o plugin q2-demux seguido por denoising com o comando DADA2 (Callahan et al., 2016), selecionando leituras com uma qualidade phred > 25. Todas as variantes de sequência de amplicons (ASVs) foram alinhadas com mafft (Kato et al., 2002) e usadas para construir uma filogenia com fasttree (Price et al., 2010). O plugin de diversidade q2 foi usado para estimar métricas de diversidade depois que as amostras foram rarefeitas (Faith, 1992). A taxonomia foi atribuída a ASVs usando o classificador de características q2 (Bokulich et al., 2018) e o banco de dados Silva 128 considerando 97% de similaridade entre as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de referência (Quast et al., 2013).

A predição do perfil funcional das comunidades microbianas ruminais foi obtida com o software PICRUSt (Langille et al., 2013) e o pipeline CowPi (Wilkinson et al., 2018) onde os genes funcionais previstos foram categorizados em Clusters da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEGG) ortologia (KO).

2.9. Análises estatísticas

Os dados de consumo, digestibilidade, eficiência de utilização de nitrogênio e eficiência microbiana foram analisados considerando um delineamento quadrado latino duplo 4 x 4, com arranjo fatorial 2 x 2 (A x B; Fator A: 2 suplementos – suplemento energético e suplemento mineral, e fator B: sem ou com inclusão de aditivos fitogênicos), sendo os efeitos do fator A, fator B e a interação entre os fatores considerados fixos, e efeitos de período, animal, quadrado latino, interação período x animal (quadrado) e o erro do modelo considerados aleatórios. Nas medidas de pH, NH₃ e AGCC na ANOVA foram incluídas medidas repetidas no tempo (horários de coleta), sendo os efeitos do fator A, fator B, sua interação, tempo e sua interação com os fatores considerados efeitos fixos, e período, animal, quadrado latino, a interação período x animal (quadrado), e os resíduos do modelo considerados efeitos aleatórios. As interações não significativas foram omitidas das tabelas. Quando a interação tratamento e tempo foi significativa, os efeitos de tempo dentro do tratamento foram avaliados em efeitos linear, quadrático e cúbico.

Inicialmente os dados foram analisados quanto a normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias. Para a análise, a estrutura da matriz de covariância dos erros que se ajusta aos dados foi escolhida conforme o critério de Akaike corrigido (AICc) e a estrutura que melhor se ajustou foi 'unstructured'. Os dados foram analisados utilizando o procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9.2), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

As análises estatísticas da comunidade bacteriana ruminal foram realizadas no Software R (versão 3.6.3). Os dados de riqueza, diversidade, abundância ruminal de bactérias e Archaeas, e funcionalidade foram comparados entre o tipo de suplemento e a inclusão de aditivos fitogênicos pelo teste de Friedman e quando diferentes expresso como Fold-change. A possível interação entre tipo de suplemento e inclusão de aditivos fitogênicos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis pos-teste de Dunns.

Foi realizada uma PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices) para os dados de taxonomia microbiana e funcionalidade em função dos tipos de suplemento e inclusão de aditivos fitogênicos mediante o Package '*vegan*' baseada no índice de dissimilaridade Bray–Curtis com 999 permutações. Mediante a análise de componentes principais (PCA) no Package '*FactorMineR*' foram selecionadas as vias funcionais, os microrganismos ruminais e as variáveis de fermentação que expliquem a maior variabilidade entre o tipo de suplemento e inclusão de aditivos fitogênicos e visualizados em um PCA biplot.

Em todos os testes, a significância foi declarada a $P \leq 0,05$ e tendência foi considerada quando $0,05 < P < 0,10$.

3. RESULTADOS

3.1. Consumo e digestibilidade de matéria seca e dos nutrientes

Não houve interação suplemento x *blend* de aditivos ($P > 0,05$) sobre o consumo de matéria seca e nutrientes (Tabela 3). O consumo de FDNcp (% PC) não foi influenciado pelos suplementos e aditivos fitogênicos. Entretanto, o consumo de matéria seca total (kg/dia; $P = 0,001$) e % PC ($P = 0,001$), matéria orgânica ($P = 0,003$), proteína bruta ($P = 0,006$), FDNcp (kg/dia; $P = 0,017$) e

consumo de energia bruta ($P = 0,004$), de energia digestível ($P = 0,002$) e de energia metabolizável ($P = 0,001$; MJ/dia) foram maiores nos tourinhos que receberam suplemento energético comparado ao suplemento mineral.

Adicionalmente, verificou-se tendência ($P = 0,07$) de maior consumo de MS de pasto (kg/dia) e % PC ($P = 0,059$) em tourinhos que consumiram suplemento energético (Tabela 3).

A relação entre o teor de proteína e quantidade de matéria orgânica digestível (g PB/kg MOD) não foi influenciada pelos suplementos fornecidos e aditivos fitogênicos ($P > 0,05$).

Não houve efeito de interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos ($P > 0,05$) na digestibilidade dos nutrientes. A digestibilidade da MS, MO, PB, FDNcp e da energia foram maiores ($P < 0,05$) nos tourinhos que receberam suplemento energético em relação aqueles que receberam apenas suplemento mineral. A inclusão dos aditivos fitogênicos proporcionou tendência de redução na digestibilidade da MS ($P = 0,073$; sem aditivos fitogênicos: 64,8%; com aditivos fitogênicos: 62,8%; Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos no consumo voluntário e digestibilidade de nutrientes em tourinhos em pastejo durante o período das águas

durante o período das águas								
Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³	P-valor		
	SESAF	SECAF	SMSAF	SMCAF		Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
<i>Consumo (kg/dia)</i>								
MS total	11,60	10,92	8,65	9,04	0,38	0,001	0,810	0,386
MS Pasto	10,36	9,68	8,65	9,04	0,32	0,070	0,816	0,392
MS Supl.	1,24	1,23	-	-	0,02	-	0,747	-
MO	10,27	9,63	7,88	8,24	0,33	0,003	0,803	0,417
PB	1,79	1,66	1,39	1,39	0,06	0,006	0,551	0,559
FDNcp	6,02	5,66	4,76	5,04	0,19	0,017	0,911	0,381
g PB/kg MOD	247,5	249,5	259,4	262,8	13,87	0,111	0,721	0,927
<i>Consumo (% PC)</i>								
MS Total	2,52	2,42	1,87	1,97	0,08	0,001	0,977	0,623
MS Pasto	2,25	2,15	1,87	1,97	0,07	0,059	0,983	0,474
FDNcp	1,30	1,26	1,16	1,10	0,10	0,121	0,595	0,949
<i>MJ/dia</i>								
EB	201,5	189,0	156,4	162,3	6,35	0,004	0,761	0,411
ED	138,6	125,6	102,8	98,51	5,45	0,002	0,340	0,627
EM	117,6	107,3	85,44	79,43	8,76	0,001	0,321	0,791

Digestibilidade (%)

DMS	67,0	65,1	62,5	60,6	0,70	0,0004	0,073	0,177
DMO	71,0	69,5	64,0	64,1	0,90	<.0001	0,555	0,364
DPB	70,0	67,3	58,9	59,7	1,31	<.0001	0,515	0,235
DFDNcp	72,5	71,9	66,2	67,2	0,91	0,0006	0,877	0,560
DE	68,5	66,3	60,0	60,6	1,02	<.0001	0,536	0,219

¹MS: Matéria Seca; MS Supl.: Matéria Seca de Suplemento; MO: Matéria Orgânica; PB: Proteína Bruta; FDNcp: Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; EB: Energia Bruta; ED: Energia Digestível; EM: Energia Metabolizável; ³Proteína bruta ingerida/matéria orgânica digestível ingerida; DMS: Digestibilidade da Matéria Seca; DMO: Digestibilidade da Matéria Orgânica; DPB: Digestibilidade da Proteína Bruta; DFDNcp: Digestibilidade da Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; DEB: Digestibilidade da Energia Bruta; ²SESAF: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SECAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SMSAF: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMCAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ³EPM: Erro padrão da média.

6.2. Parâmetros ruminais

Não houve interação suplemento x *blend* de aditivos sobre os parâmetros ruminais ($P > 0,05$). O tipo de suplemento fornecido, assim como a inclusão dos aditivos fitogênicos não influenciaram o pH, AGCC total (mmol/L) e proporção de isobutirato (% do total) ruminal ($P > 0,05$) (Tabela 4).

A concentração de N-NH₃ ($P = 0,003$) e propionato (% do total; $P = 0,010$) foram maiores no rúmen dos tourinhos que receberam suplemento energético (Tabela 4). Ainda, houve tendência ($P = 0,074$) de maior proporção de propionato no rúmen de animais suplementados com a inclusão dos aditivos fitogênicos (Tabela 4).

O pH ruminal apresentou efeito cúbico e a concentração de N-NH₃ ruminal efeito quadrático nas horas avaliadas ao longo do dia (Figura 1).

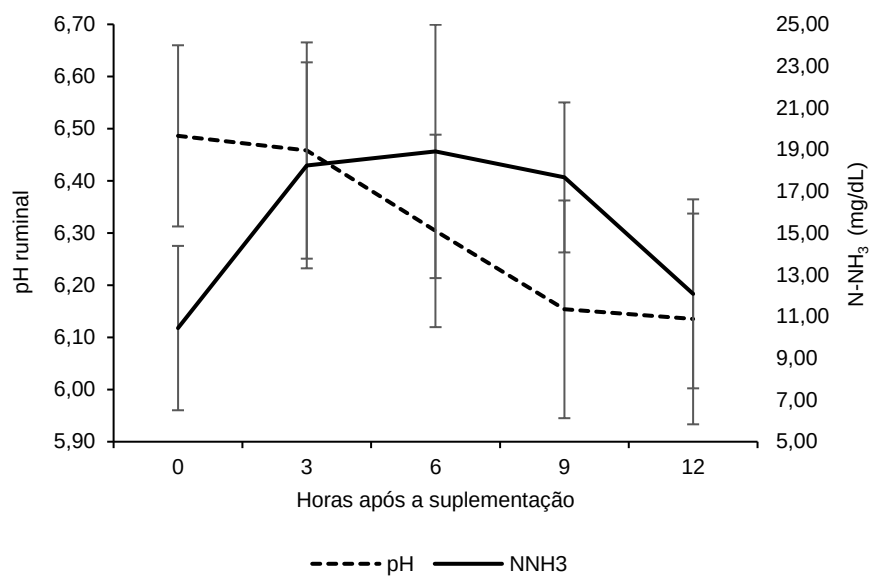


Figura 1. Efeito do tempo de coleta no pH (efeito cúbico) e na concentração de N-NH₃ (efeito quadrático) (mg/dL)

Tabela 4. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos no pH, N-NH₃ (mg/dL) e concentração de AGCC (mmol/L), proporção de acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato (% do total), e relação acetato:propionato em bovinos em pastejo durante o período das águas

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³	P-valor				
	SESAF	SECAF	SMSAF	SMCAF		Supl.	Adit.	Tempo	Supl. x Adit.	Supl. x Tempo
pH	6,25	6,14	6,35	6,34	0,02	0,115	0,691	<.0001 ^C	0,679	0,726
N-NH ₃ (mg/dL)	17,56	15,46	14,24	14,23	0,46	0,003	0,228	<.0001 ^Q	0,233	0,149
AGCC Total (mmol/L)	117,0	112,9	115,8	118,7	1,16	0,723	0,740	<.0001 ^C	0,394	0,671
<i>AGCC (% do total)</i>										
Acetato	68,30	66,74	69,70	68,99	0,15	0,003	0,335	<.0001	0,190	<.0001
Propionato	17,05	16,74	16,34	16,87	0,08	0,010	0,074	<.0001 ^Q	0,235	0,106
Butirato	10,66	10,31	10,06	10,16	0,06	0,198	0,792	<.0001	0,360	0,0001
Isobutirato	0,95	0,93	0,93	1,13	0,01	0,406	0,635	<.0001 ^C	0,978	0,458
Valerato	1,22	1,08	1,08	1,05	0,02	0,001	0,015	<.0001	0,149	<.0001
Isovalerato	1,83	1,76	1,89	1,89	0,02	0,058	0,672	<.0001	0,749	0,008
Acetato:Propionato	4,02	3,91	4,29	4,10	0,03	0,006	0,085	<.0001	0,141	0,009

¹AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta; ²SESAF: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SECAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SMSAF: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMCAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos;

³EPM: Erro padrão da média. Efeito de Tempo: ^Q: Efeito quadrático; ^C: Efeito cúbico;

A concentração de AGCC total (mmol/L) e proporção de isobutirato (% do total) apresentaram efeito cúbico e a proporção de propionato (% do total) efeito quadrático nas horas avaliadas.

Houve interação ($P < 0,05$) entre os diferentes suplementos fornecidos e tempo de coleta na proporção de acetato, butirato, valerato e isovalerato (% do total), e relação acetato:propionato.

A proporção de acetato e de butirato (% do total), dependentes de cada suplemento fornecido e hora de coleta são apresentadas na Figura 2. A proporção de acetato e de butirato (% do total) no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento energético apresentaram efeito cúbico e no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento mineral apresentaram efeito quadrático nas horas avaliadas.

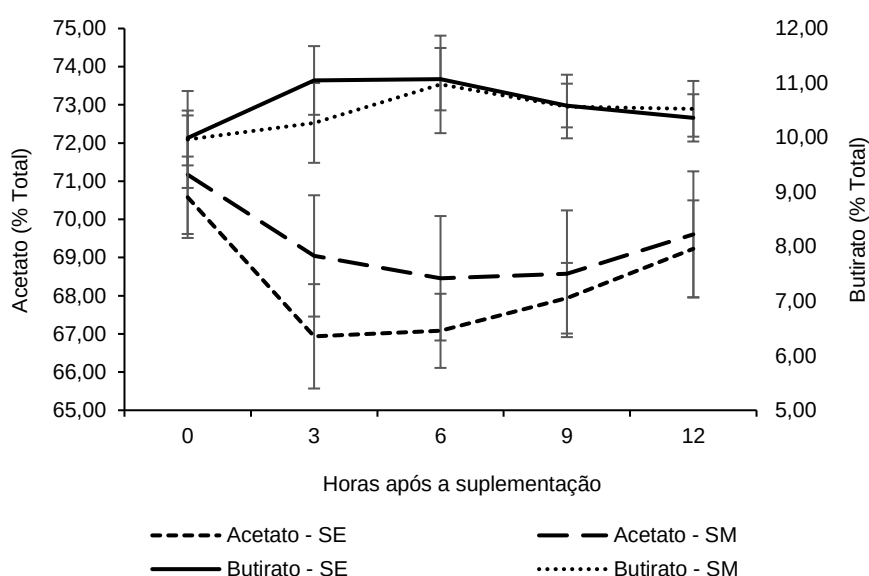


Figura 2. Efeito da interação entre suplemento fornecido e tempo de coleta na proporção de acetato e butirato (Suplemento energético – efeito cúbico; Suplemento mineral – efeito quadrático) (% do total)

A proporção de valerato e de isovalerato (% do total) no rúmen dos tourinhos que receberam suplemento energético e isovalerato (% do total) no rúmen dos tourinhos que receberam suplemento mineral apresentaram efeito cúbico. A proporção de valerato (% do total) no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento mineral apresentou efeito quadrático nas horas avaliadas ao longo do dia (Figura 3).

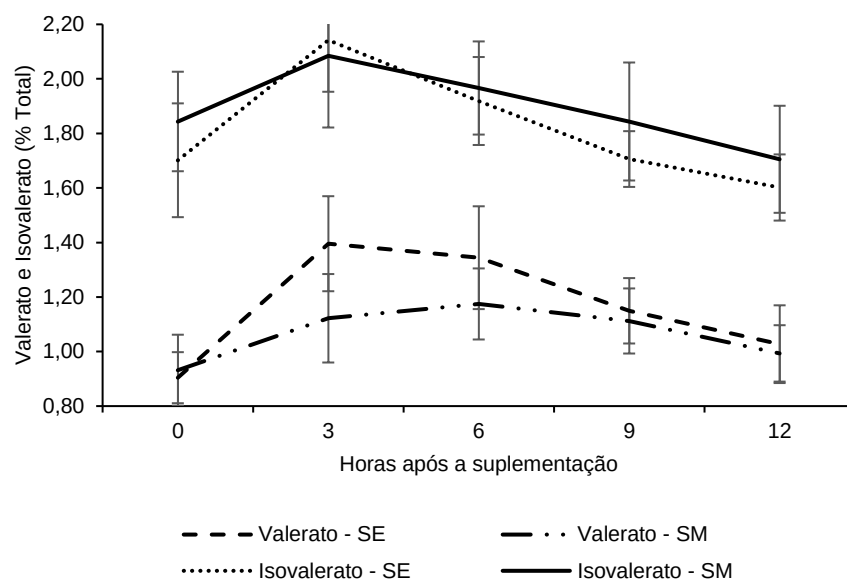


Figura 3. Efeito da interação entre suplemento fornecido e tempo de coleta na proporção de valerato e de isovalerato (Valerato e isovalerato (Suplemento energético) e Isovalerato (Suplemento mineral) – efeito cúbico; Valerato (Suplemento mineral) – efeito quadrático) (% do total)

A relação acetato:propionato apresentou efeito cúbico no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento energético e efeito quadrático no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento mineral nas horas avaliadas (Figura 4).

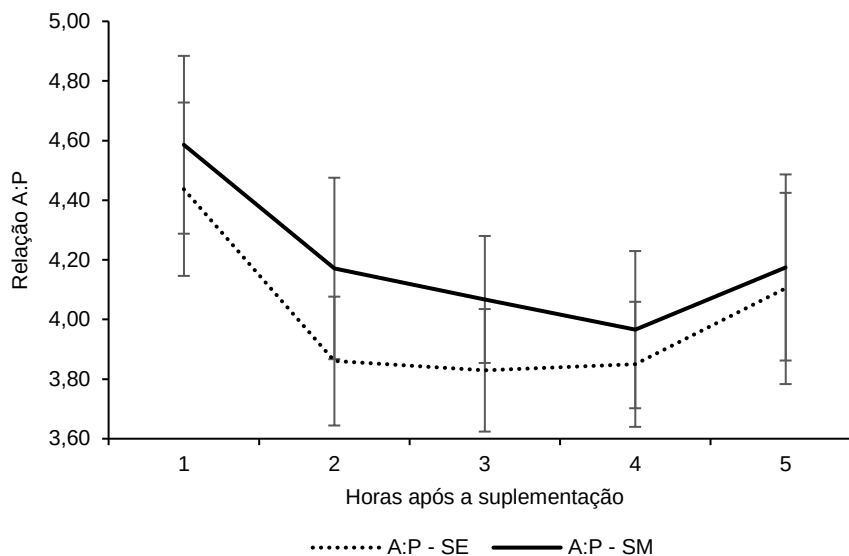


Figura 4. Efeito da interação entre suplemento fornecido e tempo de coleta na relação acetato:propionato (Suplemento energético – efeito cúbico; Suplemento mineral – efeito quadrático) (% do total)

6.3. Eficiência de utilização de nitrogênio e eficiência microbiana

Houve efeito de interação suplemento x *blend* de aditivos fitogênicos ($P = 0,033$) somente para o N excretado na urina. Observou-se maior excreção de N na urina (g/dia) nos tourinhos que receberam SESAF (Figura 5), e não houve efeito da inclusão dos aditivos fitogênicos nos tourinhos que receberam suplemento mineral.

O suplemento energético aumentou ($P < 0,05$) a concentração de N ureico no soro (Tabela 5) e em relação ao tempo de coleta foi maior 4 h (16,43) após a suplementação do que 0 h (14,11).

Os tourinhos que consumiram suplemento energético tiveram maior ingestão de nitrogênio ($P = 0,006$) que os tourinhos que consumiram apenas suplemento mineral. Adicionalmente, o N excretado nas fezes tendeu aumentar nos animais que receberam suplemento energético ($P = 0,081$). O N retido expresso tanto em g/dia ($P = 0,0004$) quanto % do N ingerido ($P = 0,005$) foi maior em animais que consumiram suplemento energético quando comparados ao suplemento mineral.

Não houve interação entre os suplementos fornecidos e aditivos fitogênicos nas variáveis de eficiência microbiana avaliadas ($P > 0,05$). A síntese de proteína microbiana não foi influenciada pelos suplementos fornecidos ($P = 0,848$) e aditivos fitogênicos ($P = 0,636$). A eficiência microbiana, expressa em PBmic/kg MOD e Nmic/kg MOADR ($P = 0,055$) apresentou tendência de aumento no rúmen dos tourinhos que consumiram suplemento mineral (Tabela 5).

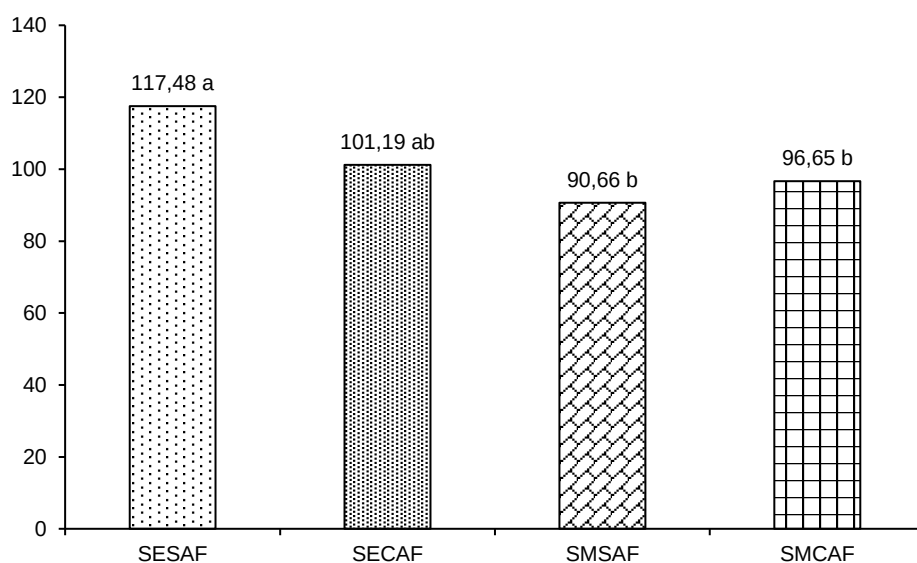


Figura 5. Efeito da interação entre suplementos e aditivo na excreção de N na urina (g/dia)

Tabela 5. Efeitos do fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos no nitrogênio ureico no plasma (mg/dL), balanço de nitrogênio e eficiência microbiana de bovinos em pastejo durante o período das águas

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P-valor			
	SESAF	SECAF	SMSAF	SMCAF		Supl.	Adit.	Tempo	Supl. x Adit.
Utilização do Nitrogênio									
N ureico plasma (mg/dL)	15,95	16,01	14,52	14,61	0,22	<.0001	0,786	<.0001	0,939
N ingerido (g/dia)	286,0	266,1	222,6	222,4	9,69	0,006	0,551	-	0,559
N fezes (g/dia)	89,77	91,59	79,37	84,30	2,94	0,081	0,407	-	0,906
N urina (g/dia)	116,3	96,6	89,7	96,1	3,93	0,006	0,271	-	0,033
N retido (g/dia)	94,51	99,73	54,46	45,82	7,59	0,0004	0,611	-	0,992
N retido (% ingerido)	31,10	33,99	21,97	18,96	2,04	0,050	0,987	-	0,409
Eficiência Microbiana (g/dia)									
N microbiano	60,15	54,43	55,92	56,63	6,48	0,848	0,636	-	0,544
PB microbiana	375,95	340,18	349,51	353,95	40,47	0,848	0,636	-	0,544
Nmic/kg MOADR ³	13,10	13,36	17,39	17,00	2,29	0,055	0,974	-	0,868
PBmic/kg MOD ⁴	53,21	54,28	70,64	69,06	9,29	0,055	0,974	-	0,868

¹SESAF: Suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos; SECAF: Suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos; SMSAF: Suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos; SMCAF: Suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos; ²EPM: Erro padrão da média;

⁴Nitrogênio microbiano/kg de matéria orgânica aparentemente degradada no rúmen ingerida; ⁵Proteína microbiana/kg matéria orgânica digestível ingerida.

6.4. Comunidade bacteriana ruminal

As 31 amostras analisadas geraram um total de 1.100.557 sequências (média de 35.501).

A análise PERMANOVA baseada nas diferenças de distância de Bray-Curtis revelou que as comunidades microbianas do rúmen em função do tipo de suplemento são estatisticamente diferentes (PERMANOVA; $P = 0,015$; Figura 6). A inclusão dos aditivos fitogênicos ($P = 0,301$) ou sua associação com o tipo de suplemento ($P = 0,604$) não influenciaram esta medida de beta-diversidade.

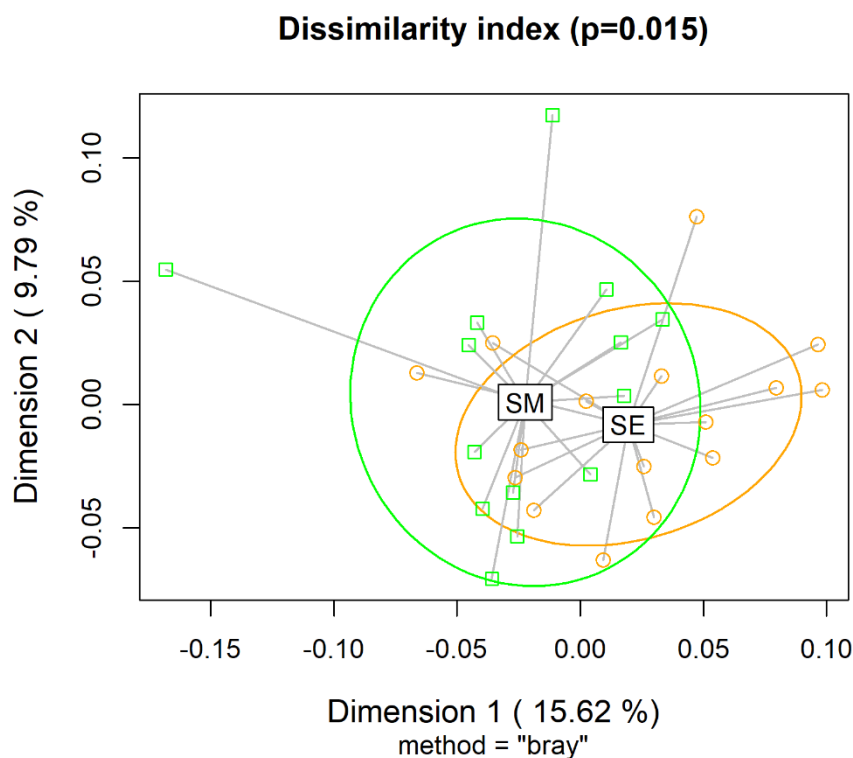


Figura 6. A análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) baseado na dissimilaridade das distâncias de Bray-Curtis entre comunidades microbianas do rúmen de bovinos em pastejo no período das águas suplementados suplemento energético ou suplemento mineral

Os índices de riqueza ACE e Chao1, e os índices de diversidade Shannon, Simpson e Fisher não foram influenciados pelo tipo de suplemento fornecido, inclusão ou não de aditivos fitogênicos ou a associação entre estes fatores (Tabela 6).

Tabela 6. Mediana e rango interquartil nos índices de riqueza e diversidade, e número de bactérias observadas em bovinos em pastejo no período das águas, com fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos

Item	Tratamentos				P-valor		
	SESAF	SECAF	SMSAF	SMCAF	Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
ACE	103,78 ± 45,96	120,11 ± 38,86	89,32 ± 67,53	98,35 ± 39,41	0,363	0,813	0,729
Chao1	100,50 ± 45,75	116,50 ± 39,50	86,50 ± 66,50	95,00 ± 38,00	0,363	0,782	0,723
Fisher	13,35 ± 4,13	15,27 ± 2,92	11,61 ± 6,38	13,27 ± 4,98	0,236	0,937	0,639
Shannon	3,61 ± 0,27	3,59 ± 0,25	3,52 ± 0,40	3,46 ± 0,24	0,144	0,693	0,429
Simpson	0,95 ± 0,012	0,95 ± 0,012	0,95 ± 0,016	0,94 ± 0,011	0,198	0,621	0,498

Supl. x Adit. = Efeito da associação entre tipo de suplemento e inclusão dos aditivos fitogênicos avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis. Supl.= Efeito do tipo de suplemento avaliado pelo teste de Friedman. Adit. = Efeito do uso ou não de aditivos fitogênicos no suplemento avaliado pelo teste de Friedman.

Em média $12,66 \pm 2,05\%$ das OTUs identificadas em cada amostra não conseguiram ser classificadas no nível de filo. Na composição da comunidade microbiana no domínio Archaea foi identificado apenas o filo Euryarchaeota (Figura 7), o qual não foi influenciado pelo tipo de suplemento fornecido, pelo uso de aditivos fitogênicos, ou pela associação entre o tipo de suplemento e o uso de aditivos ($P > 0,10$).

No domínio Bacteria, foram identificados 10 filos, sendo o mais abundante Firmicutes, seguido por Bacteroidetes, representando $> 76\%$ do total da comunidade bacteriana das amostras (Figura 7). Já os filos menos abundantes identificados foram Actinobacteria, Chloroflexi, Fibrobacteres, Proteobacteria, SR1 (Absconditabacteria), Spirochaetae e Tenericutes, e não foram influenciados pela interação entre o tipo de suplemento e o uso de aditivos ($P > 0,05$).

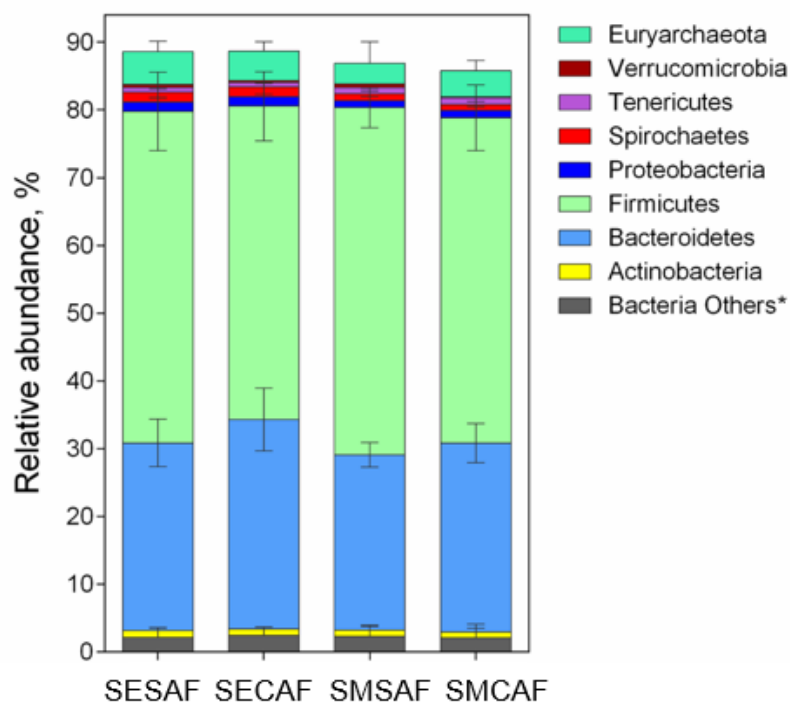


Figura 7. Abundância relativa no nível de filo das comunidades microbianas do rúmen de bovinos em pastejo no período das águas, com fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, sem ou com inclusão de aditivos fitogênicos (Aditivos Fitogênicos – AF) (*= Chloroflexi, Fibrobacteres, SR1 (Absconditabacteria)).

Entretanto, independente da inclusão ou não de aditivos fitogênicos, os filos Proteobacteria ($P = 0,046$) e Spirochaetae ($P = 0,022$) foram mais abundantes no rúmen dos animais que receberam suplemento energético, e os filos Bacteroidetes ($P = 0,089$) e Firmicutes ($P = 0,069$) apresentaram tendência de aumento e redução, respectivamente, no rúmen desses animais (Figura 7). Já a inclusão de aditivos fitogênicos reduziu a abundância relativa do filo Verrucomicrobia ($P = 0,022$) no rúmen dos animais, independentemente do tipo de suplemento fornecido (Figura 7).

No nível de família, 16 famílias bacterianas foram identificadas, sendo as mais abundantes Lachnospiraceae (17,73%), Ruminococcaceae (14,90%) e

Prevotellaceae (13,46%). A interação entre o tipo de suplemento fornecido e uso de aditivos fitogênicos influenciou a abundância relativa ruminal das famílias Bacteroidales BS11 gut group, Bacteroidales S24-7 group e Veillonellaceae (Tabela 7), sendo que, a abundância relativa da família Veillonellaceae foi menor no rúmen dos animais alimentados com SECAF ($P = 0,007$). As famílias Bacteroidales BS11 gut group ($P = 0,091$) e Bacteroidales S24-7 group ($P = 0,084$) apresentaram tendência de menor abundância no rúmen dos animais que receberam SMSAF, quando comparados aos que receberam SECAF (Tabela 7).

No nível de gênero, 11 OTUs foram influenciadas pela interação entre o tipo de suplemento ofertado e uso de aditivos fitogênicos (Tabela 7). Dentro das Archaeas o gênero *Methanosphaera spp.* foi menos abundante no rúmen de animais suplementados com SMSAF ($P = 0,041$), e a abundância da OTU Thermoplasmatales Incertae Sedis Uncultured Archaeon foi menor nesses animais quando comparados aos que receberam SESAF e SECAF no nível de gênero ($P = 0,011$) e espécie gênero ($P = 0,018$).

Nas bactérias, a abundância relativa do gênero *Prevotellaceae UCG-003* ($P = 0,071$) tendeu a ser menor no rúmen dos animais que receberam SMCAF, quando comparado ao SMSAF e SECAF. A OTU Bacteroidales RF16 group Uncultured Bacterium (UCB) ($P = 0,060$) tendeu a ser menos abundante no rúmen dos animais que receberam SESAF, quando comparados aos que receberam SECAF e SMSAF.

O gênero *Succinivibrionaceae UCG-002* foi menos abundante em animais suplementados com SMSAF quando comparado a SESAF e SECAF ($P = 0,045$). Uma tendência similar foi encontrada na OTU Bacteroidales S24-7 group.UCB ($P = 0,056$). Menor abundância do gênero *Prevotellaceae NK3B31.group* ($P = 0,076$) também foi observada no SMSAF quando comparados a animais suplementados com SESAF.

O gênero *Family XIII UCG-002* foi mais abundante ($P = 0,034$) no rúmen dos animais que receberam SMSAF do que naqueles que consumiram SMCAF. A abundância relativa do gênero *Moryella.spp* foi maior com o fornecimento do suplemento energético sem a inclusão dos aditivos fitogênicos ($P = 0,044$).

Maior abundância da OTU SR1 (Absconditabacteria).Ambiguous taxa ($P = 0,017$) foi observada no rúmen dos animais alimentados com SMSAF e SMCAF quando comparados ao SECAF.

A abundância relativa da OTU classe WCHB1-41 pertencente ao filo Verrucomicrobia foi maior no rúmen dos animais que consumiram SESAF quando comparados ao SECAF e SMCAF ($P = 0,041$).

Seis OTUs de bactérias classificadas no nível de espécie foram influenciadas pela interação entre o tipo de suplemento e a inclusão de aditivos fitogênicos. Rikenellaceae.U29-B03 tendeu a ser menos abundante ($P = 0,099$) no rúmen de animais que receberam SMSAF. A OTU Roseburia.UCB foi maior ($P = 0,033$) no rúmen de animais que consumiram suplemento SESAF, quando comparado com animais que foram alimentados com SMCAF.

O fornecimento de SMSAF proporcionou maior abundância relativa ($P = 0,028$) da OTU Ruminiclostridium 6.UCB, quando comparado a SECAF e SMCAF.

A OTU Ruminococcaceae UCG-002.UCB tendeu a ser mais abundante ($P = 0,071$) no rúmen de animais alimentados com SECAF e SMSAF quando comparados ao SESAF.

A OTU Treponema 2.UCB apresentou tendência a ser mais abundante ($P = 0,058$) no rúmen de animais que receberam SESAF quando comparado ao SMSAF, e a OTU Lachnospiraceae ND3007 group.UCB foi maior ($P = 0,011$) no rúmen dos animais que consumiram SECAF, quando comparado a SMSAF e SMCAF.

Tabela 7. Mediana e rango interquartil da abundância de unidades taxonômicas operacionais (OTU's) de bactérias e Archaeas metanogênicas, classificadas em nível de famílias, gêneros e espécies no rúmen de bovinos em pastejo no período das águas, influenciadas pelo fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, sem ou com inclusão de aditivos fitogênicos

Item	Tratamentos				P-valor
	SESAF	SECAF	SMSAF	SMCAF	
Famílias					
Bacteroidales BS11 gut group	4,40 ^{ab} ± 0,62	5,44 ^a ± 1,31	3,97 ^b ± 0,65	5,10 ^{ab} ± 2,71	0,091
Bacteroidales S24-7 group	1,34 ^{ab} ± 0,56	1,85 ^a ± 0,32	1,01 ^b ± 0,93	1,12 ^{ab} ± 1,32	0,084
Veillonellaceae	1,41 ^a ± 0,36	0,93 ^b ± 0,19	1,35 ^a ± 0,67	1,66 ^a ± 0,29	0,007
Gêneros					
<i>Methanosphaera.spp</i> ^{AR}	0,40 ^a ± 0,17	0,39 ^a ± 0,12	0,23 ^b ± 0,17	0,38 ^a ± 0,16	0,041
Thermoplasmatales Incertae Sedis.UCA ^{AR}	0,41 ^a ± 0,19	0,37 ^{ab} ± 0,17	0,24 ^{bc} ± 0,15	0,12 ^c ± 0,25	0,011
<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	0,84 ^{ab} ± 0,23	0,97 ^a ± 0,47	0,97 ^a ± 0,40	0,57 ^b ± 0,41	0,071
Bacteroidales RF16 group.UCB	0,00 ^b ± 0,00	0,32 ^a ± 0,41	0,19 ^a ± 0,35	0,00 ^{ab} ± 0,09	0,060
Bacteroidales S24-7 group.UCB	0,13 ^a ± 0,22	0,05 ^a ± 0,22	0,00 ^b ± 0,00	0,00 ^{ab} ± 0,01	0,056
<i>Prevotellaceae NK3B31.group</i>	0,45 ^a ± 0,30	0,36 ^{ab} ± 0,23	0,18 ^b ± 0,19	0,27 ^{ab} ± 0,25	0,076
<i>Family XIII UCG-002</i>	0,08 ^{ab} ± 0,04	0,11 ^{ab} ± 0,09	0,15 ^a ± 0,11	0,00 ^b ± 0,06	0,034
<i>Moryella.spp</i>	0,32 ^a ± 0,06	0,18 ^b ± 0,28	0,20 ^b ± 0,21	0,25 ^b ± 0,28	0,044
<i>Succinivibrionaceae UCG-002</i>	0,14 ^a ± 0,28	0,04 ^a ± 0,07	0,00 ^b ± 0,02	0,00 ^{ab} ± 0,04	0,045
SR1 (Absconditabacteria). Ambiguous taxa	0,00 ^{bc} ± 0,04	0,00 ^c ± 0,00	0,13 ^a ± 0,09	0,10 ^{ab} ± 0,18	0,017
Verrucomicrobia.WCHB1-41 ^C	0,39 ^a ± 0,07	0,15 ^{bc} ± 0,18	0,39 ^{ab} ± 0,17	0,03 ^c ± 0,34	0,041
Espécies					
Thermoplasmatales Incertae Sedis.UCA ^{AR}	0,04 ^a ± 0,23	0,11 ^{ab} ± 0,20	0,03 ^{bc} ± 0,06	0,00 ^c ± 0,00	0,018
Rikenellaceae.U29-B03	0,15 ^a ± 0,07	0,07 ^{ab} ± 0,16	0,01 ^c ± 0,07	0,12 ^{ab} ± 0,12	0,099
Roseburia.UCB	0,24 ^a ± 0,60	0,14 ^{ab} ± 0,22	0,04 ^{ab} ± 0,28	0,00 ^b ± 0,04	0,033
Ruminiclostridium 6.UCB	0,14 ^{ab} ± 0,28	0,04 ^b ± 0,17	0,21 ^a ± 0,17	0,00 ^b ± 0,06	0,028
Ruminococcaceae UCG-002.UCB	0,00 ^b ± 0,04	0,33 ^a ± 0,39	0,32 ^a ± 0,59	0,00 ^{ab} ± 0,11	0,071
Treponema 2.UCB	0,16 ^a ± 0,23	0,01 ^{ab} ± 0,03	0,00 ^b ± 0,00	0,02 ^{ab} ± 0,14	0,058
Lachnospiraceae ND3007 group.UCB	0,03 ^{ab} ± 0,12	0,13 ^a ± 0,08	0,00 ^{bc} ± 0,04	0,00 ^c ± 0,00	0,011

UCB – Uncultured Bacterium; UCA – Uncultured Archaeon; C – Classe; AR – Archaeas; Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam tendência ($P > 0,05 < 0,10$) ou significância ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns.

Adicionalmente, independente da inclusão ou não de aditivos fitogênicos o tipo de suplemento influenciou a abundância relativa de 25 OTUs bacterianas (Figura 8). As famílias Spirochaetaceae ($P = 0,022$) e Ruminococcaceae ($P = 0,020$), e os gêneros Papillibacter spp. ($P = 0,031$), Erysipelotrichaceae.UGC-004 ($P = 0,047$), Treponema.2 ($P = 0,036$) e Phocaeicola spp. ($P = 0,030$) foram mais abundantes no rúmen dos animais com o fornecimento do suplemento energético. Em contraste, os gêneros Butyrivibrio.2 ($P = 0,033$) e Ruminococcaceae.UGC-014 ($P = 0,040$) apresentaram menor abundância relativa no rúmen desses animais quando comparados aos tourinhos que receberam suplemento mineral.

Observou-se ainda tendência de aumento da abundância da família Erysipelotrichaceae ($P = 0,075$), e dos gêneros Bacteroidales.S24-7 group ($P = 0,056$), Mogibacterium spp. ($P = 0,063$), Defluviitaleaceae.UGC-011 ($P = 0,056$), Eubacterium nodatum group ($P = 0,082$), Coprococcus.1 ($P = 0,056$), Ruminococcus gauvreauii group ($P = 0,090$), Desulfovibrio spp. ($P = 0,097$), Lachnospiraceae.NK3A20 group (Ambiguous taxa; $P = 0,092$) e Prevotella 1 (uncultured rumen bacterium; $P = 0,097$), e tendência ($P < 0,10$) de redução dos gêneros Pseudobutyrvibrio spp. ($P = 0,063$) e Prevotella 1 (Ambiguous taxa; $P = 0,069$), no rúmen de animais suplementados com suplemento energético quando comparados aos suplementados com suplemento mineral.

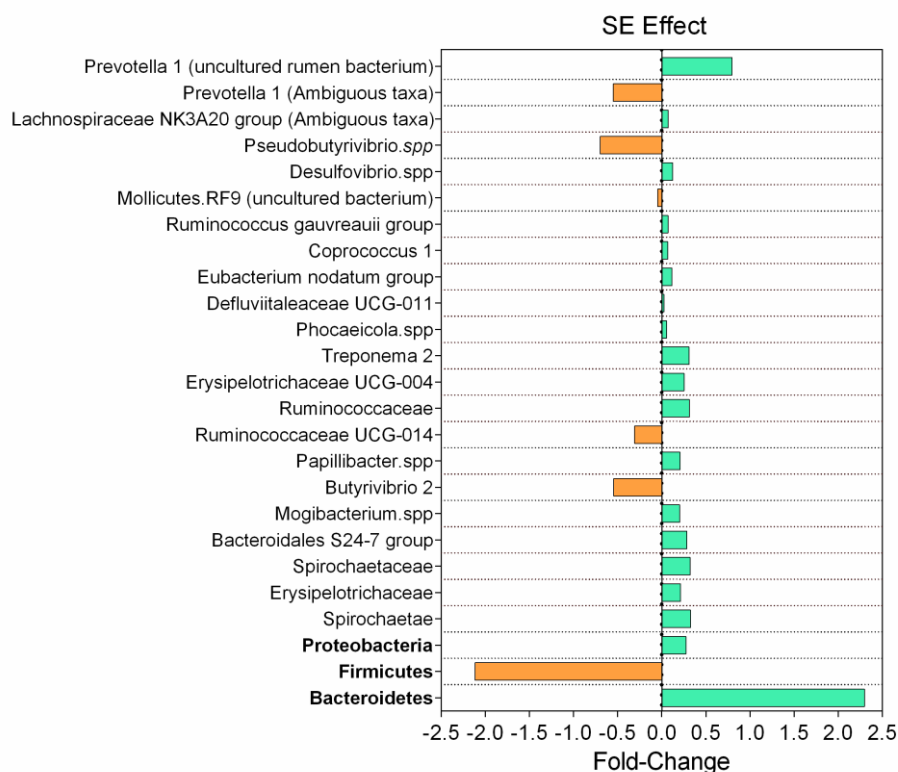


Figura 8. Mudanças na abundância relativa (Fold-Change) ruminal em função da inclusão do suplemento energético em bovinos em pastejo no período das águas

A inclusão dos aditivos fitogênicos, independente do suplemento utilizado, proporcionou maior abundância relativa do gênero *Bacteroidales BS11 gut group* ($P = 0,0240$), e redução na abundância relativa do gênero *Ruminiclostridium 6* ($P = 0,011$) (Figura 9).

Adicionalmente, a inclusão dos aditivos fitogênicos proporcionou tendência em reduzir a abundância dos gêneros *Roseburia spp.* ($P = 0,081$), *Ruminococcaceae.UGC-010* ($P = 0,089$), *Saccharofermentans spp.* ($P = 0,054$) e *Lachnospiraceae NK3A20 group* ($P = 0,089$), da OTU não cultivada da família *Marinilabiaceae* ($P = 0,075$) e de uma OTU não cultivável da família *Lachnospiraceae* ($P = 0,056$).

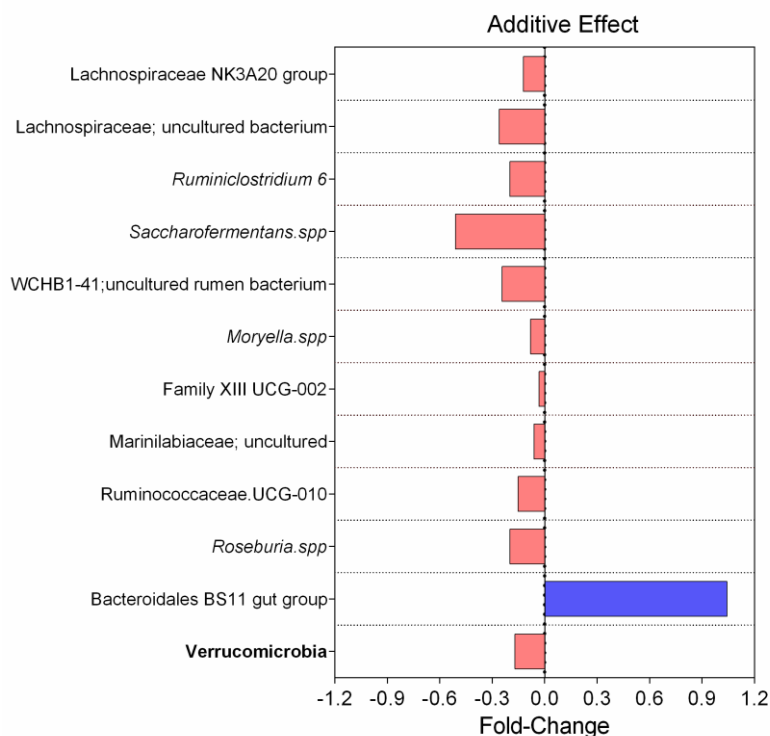


Figura 9. Mudanças na abundância relativa (Fold-Change) ruminal em função da inclusão de aditivos fitogênicos na dieta de bovinos em pastejo no período das águas

A análise de componentes principais revelou uma separação entre as distâncias euclidianas de SECAF e SMSAF, com uma porcentagem de variação cumulativa de 70,1% (Figura 10). Animais suplementados com SECAF estiveram distribuídos principalmente no lado positivo da Dim 1 e Dim 2, sendo associados positivamente a 17 variáveis: vias funcionais KEGG preditas do metabolismo de energia ($r=0,88$), de nitrogênio ($r=0,59$), de ciano aminoácidos ($r=0,84$), de alanina, aspartato e glutamato ($r=0,78$), de glicina, serina e treonina ($r=0,89$), peptidases ($r=0,72$), biossíntese de lipopolissacarídeos ($r=0,84$), de vitamina B5 e CoA ($r=0,75$), de ácido fólico ($r=0,87$), de fenilalanina, tirosina e triptofano ($r=0,67$), degradação de glicosaminoglicano ($r=0,77$) e outros glicanos ($r=0,65$), replicação de DNA ($r=0,64$), concentração ruminal de ácido butírico ($r=0,64$) e abundância ruminal do filo Bacteroidetes ($r=0,82$), da família Prevotellaceae ($r=0,66$), e metabolismo de purinas ($r=0,92$).

No quadrante oposto, o SMSAF apresentou associação positiva com o metabolismo do piruvato ($r=0,71$), do propionato ($r=0,78$), do butirato ($r=0,86$), de glicerofosfolipídeos ($r=0,74$), concentração ruminal de ácido acético ($r=0,61$), transportadores ($r=0,98$), e membros do filo Firmicutes ($r=0,87$) e família Christensenellaceae ($r=0,68$).

Já animais suplementados com SESAF foram associados positivamente as vias funcionais KEGG preditas do metabolismo de pirimidinas ($r=0,93$), de vitamina B2 ($r=0,85$), do CH_4 ($r=0,66$), de cofatores e vitaminas ($r=0,75$), de D-glutamina e D-glutamato ($r=0,63$), de cisteína e metionina ($r=0,70$), da degradação ($r=0,60$) e biossínteses de valina, leucina e isoleucina ($r=0,56$), vias de fixação de carbono em procariontes ($r=0,94$), enzimas relacionadas a aminoácidos ($r=0,95$), Ciclo do ácido tricarboxílico ($r=0,93$) e a abundância ruminal de Archaeas do filo Euryarchaeota ($r=0,71$) e do gênero *Methanobrevibacter.spp* ($r=0,66$).

Ainda, foi verificada associação negativa às vias KEGG preditas do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeos ($r=0,83$), de galactose ($r=0,75$), de sacarose de amido ($r=0,79$), de frutose e manose ($r=0,60$), de glicerolipídeos ($r=0,90$), biossíntese de ácidos graxos ($r=0,70$), vias de pentose fosfato ($r=0,86$), membros da família Lachnospiraceae ($r=0,65$), e dos gêneros *Lachnospiraceae.10* ($r=0,73$) e *Butyrivibrio.2* ($r=0,60$).

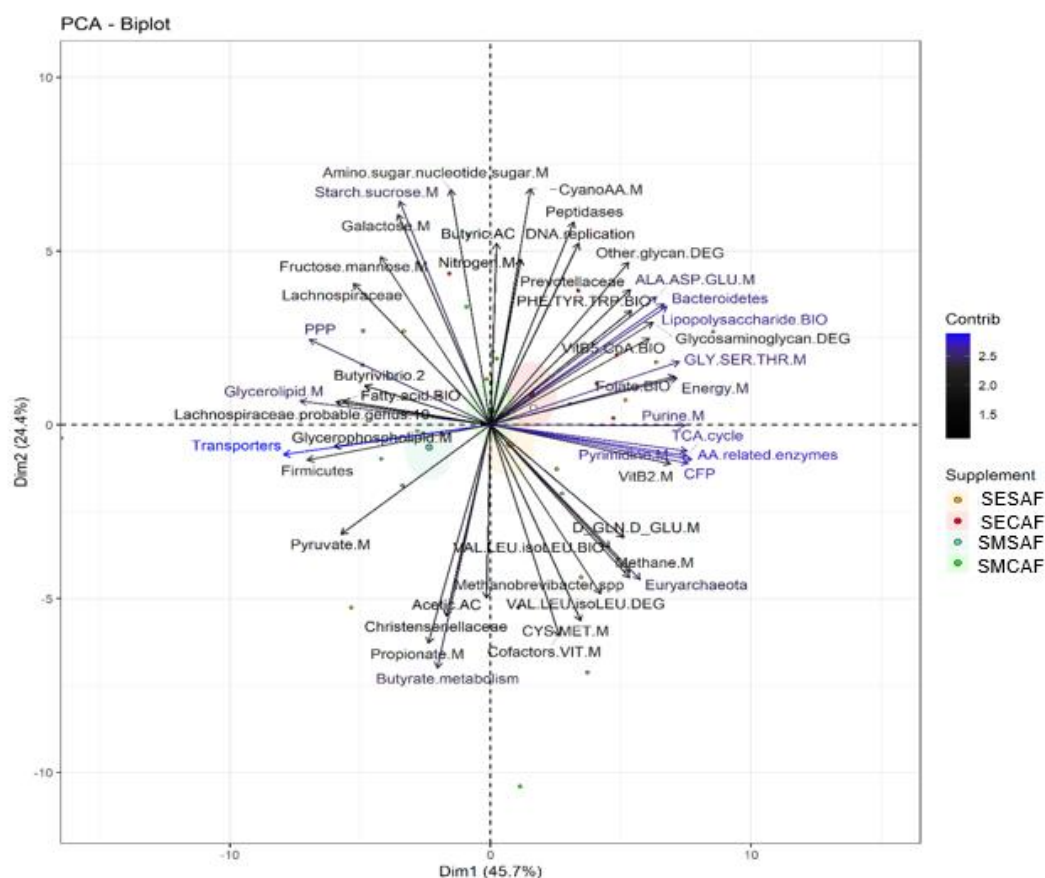


Figura 10. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis mensuradas em bovinos em pastejo no período das águas suplementados com suplemento energético sem inclusão de aditivos fitogênicos (SESAF), suplemento energético com inclusão de aditivos fitogênicos (SECAF), suplemento mineral sem inclusão de aditivos fitogênicos (SMSAF) ou suplemento mineral com inclusão de aditivos fitogênicos (SMCAF). Contrib = contribuições das variáveis. CFP = Vias de fixação de carbono em procariontes, M = metabolismo, DEG = degradação, BIO = biossínteses, AC = ácido, AA = aminoácidos, TCA = ácido tricarboxílico, PPP = Via da pentose fosfato

7. DISCUSSÃO

Os aditivos fitogênicos como os óleos essenciais e taninos hidrolisáveis, incluídos no suplemento energético e no suplemento mineral apresentam potencial para manipular a fermentação ruminal, e consequentemente, as comunidades microbianas (Patra et al., 2011). Além disso, a composição da forragem e dos nutrientes consumidos podem alterar a fermentação ruminal.

Os filos mais abundantes no ambiente ruminal em bovinos Nelore (Granja-Salcedo et al., 2017) são Firmicutes e Bacteroidetes e a associação positiva obtida na análise de componentes principais do suplemento mineral com a concentração ruminal de ácido acético em nosso estudo está relacionada a maior proporção de acetato verificada no rúmen desses animais e associado, ainda, aos membros do filo Firmicutes. Dentre os diversos fatores que podem influenciar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) estão as espécies microbianas presentes no rúmen (Jami et al., 2014).

A influência dos filos Firmicutes (F) e Bacteroidetes (B) foi observada por Min et al. (2019) na produção dos AGCC's, e que constataram que a redução da relação A:P, decorrente do aumento de propionato e redução de acetato, estava associada com a redução da relação F:B, ocasionada por aumento de Bacteroidetes e redução de Firmicutes. Dessa forma, os dados encontrados em nosso estudo corroboram com esses resultados, visto a associação no aumento de acetato e incremento de Firmicutes no rúmen dos animais que consumiram suplemento mineral. Adicionalmente, a inclusão do suplemento energético proporcionou tendência em reduzir a população microbiana do filo Firmicutes.

Animais que receberam suplemento energético apresentaram maior proporção de propionato no rúmen, e menor relação acetato:propionato 3h após a suplementação. Dentre os ingredientes do suplemento energético, o farelo de glúten de milho tem valor energético equivalente a 92-95% do milho (Firkins et al., 1985), o qual é utilizado como substrato para a produção de propionato. A melhor fermentação ruminal proporcionada refletiu em maior desempenho dos animais (Teobaldo et al., 2021; dados não publicados), possivelmente devido ao seu importante papel como substrato glicogênico hepático (Reynolds, 2003).

Com menor proporção ruminal que o propionato, o valerato também é um AGV glicogênico (Bergman, 1990) e a maior concentração de valerato (1,40%) e isovalerato (2,14%) 3h após a suplementação no rúmen dos animais que receberam suplemento energético pode ser justificada pela utilização do farelo de glúten de milho na composição do suplemento energético. O farelo de glúten de milho é um ingrediente com altos teores de isoleucina (0,73%), leucina (2,15%) e valina (1,19%) (Rodrigues et al., 2001).

A desaminação desses aminoácidos é substrato para a formação dos ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada isobutírico, valerato e isovalerato (McDonald et al., 2011). A análise de componentes principais corrobora com esses resultados, pois identificou associação positiva do suplemento energético com a biossíntese de valina, leucina e isoleucina.

Contrariamente ao presente estudo, o fornecimento de ácido tânico nas doses 6,5, 13,0 e 26,0 g/kg MS resultou em aumento na proporção de propionato e redução na proporção de valerato, e os resultados foram acompanhados, ainda, por redução da emissão de CH₄ na fermentação ruminal (Yang et al., 2017), visto que os processos de formação de CH₄ e de propionato no rúmen requerem H₂, dessa forma podem ser consideradas vias competitivas para formação (Moss et al., 2000).

Alterações no pH ruminal não foram observadas entre as dietas, e os valores avaliados são considerados condizentes em bovinos com dieta exclusivamente a pasto, de 6,0 a 7,2 (Kiro, 2017), podendo haver variação em relação a inclusão do suplemento energético. Além disso, a proporção de forragem:concentrado foi próxima a 85:15, não sendo suficiente para reduzir o pH ruminal porque a quantidade de FDN da forragem induz a ruminação e salivação, e conseqüentemente, o tamponamento ruminal, semelhante ao verificado por Teobaldo et al. (2020) com tourinhos recriados em forragem tropical e suplemento proteico energético.

Ainda no metabolismo ruminal, além das alterações na produção de AGCC's, as diferentes dietas fornecidas proporcionaram potencial para modificar a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, visto que os taninos têm habilidade em formar complexos com as proteínas, diminuindo a degradação de proteína solúvel no rúmen, potencialmente melhorando o uso do nitrogênio (Patra e Saxena, 2011).

Os aditivos fitogênicos não alteraram a concentração ruminal de N-NH₃, e verificou-se aumento com o fornecimento de suplemento energético em comparação ao fornecimento de suplemento mineral. A maior concentração de N-NH₃ no rúmen dos animais que consumiram suplemento energético está associada a composição do suplemento, com ingredientes como o farelo de glúten de milho, e características da forragem.

A relação entre o teor de proteína bruta da dieta e a quantidade de matéria orgânica digestível (MOD) interferirá na eficiência de transferência da proteína

ingerida para o intestino. A transferência com maior eficiência ocorre quando esses valores são inferiores a 160 g de PB/kg MOD, e ocorrem perdas e/ou transferência incompleta, quando excedem 210 g de PB/kg MOD (Poppi e McLennan, 1995). Pastos tropicais adubados e manejados intensivamente, com valores de proteína bruta superiores a 14% apresentam valores maiores que 210 g de PB/kg MOD (Santos et al., 2005), como visto em nosso estudo em torno de 254,8 g PB/kg MOD.

A concentração de N-NH₃ próxima a 15 mg/dL é compatível com o valor preconizado como necessário para a maximização na produção de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Detmann et al., 2010). Níveis de 8 mg/dL são suficientes para o fornecimento de compostos nitrogenados aos microrganismos fibrolíticos, no entanto, não são suficientes para o animal hospedeiro (Detmann et al., 2009).

Na tentativa de atender as exigências de proteína metabolizável em situação de deficiência ou para adequação metabólica da relação proteína metabolizável/energia metabolizável, mesmo que tenha máxima extração de energia a partir da fibra, o animal ainda apresenta estímulos no que se refere ao consumo voluntário (Detmann et al., 2010). Esse fato pode ser apoiado pela tendência de aumento no CMS de pasto nos animais que consumiram suplemento energético.

Considerando, ainda, a eficiência microbiana na utilização dos compostos nitrogenados, os níveis de N-ureico no soro podem ser indicativos do status de proteína do animal e de máxima eficiência microbiana quando estão entre 15 e 19 mg/dL e considerados níveis limites para que não ocorra perda de proteína (Vendramini et al., 2015). Dessa forma, a maior concentração ruminal de amônia corrobora com a premissa de maior concentração de N-ureico no soro (Kennedy e Milligan, 1980), entretanto, os níveis foram próximos mesmo nos animais que receberam suplemento energético, em torno de 15,98 mg/dL.

Em virtude do maior aporte de nitrogênio advindo do suplemento energético e a tendência de maior CMS de pasto por esses animais, houve também maior excreção de N urinário e tendência de maior excreção de N nas fezes. Entretanto, esses animais apresentaram, também, maior proporção de N retido/N ingerido. A eficiência de utilização de nitrogênio entre experimentos apresenta variação alta, podendo alterar de 15% a 40% (Calsamiglia et al., 2010). Hoffmann et al. (2021) verificaram eficiência

de utilização de nitrogênio em pastos tropicais intensivamente manejados e com suplementação 0,3% PC em torno de 42,94%, possivelmente devido a maior sincronia entre a degradação de carboidratos e compostos nitrogenados no rúmen.

A capacidade de formação dos complexos com proteínas, que poderiam acarretar em menor concentração de amônia ruminal e maior fluxo de proteína não degradada no rúmen para o intestino delgado é geralmente maior para animais suplementados com taninos hidrolisáveis com maior peso molecular (Kawamoto et al., 1995) e não foi observado efeito em nosso estudo. Ressalta-se ainda que a melhoria no desempenho animal pode ser observada em casos de maior aporte de proteína metabolizável para o intestino delgado e maior absorção de aminoácidos para o sangue (Aboagye et al., 2018). Caso o fluxo de PNDR para o intestino delgado seja aumentado, e a síntese de proteína microbiana prejudicada, haverá também, menor aporte de proteína metabolizável (MacAdam e Villalba, 2015).

A síntese de proteína microbiana e a eficiência microbiana não foram influenciadas pelos tratamentos fornecidos, no entanto, o valor médio da eficiência microbiana (15,21 g Nmic/kg MOADR) foi abaixo do recomendado pelo ARC (1984) de 30 g Nmic/kg MOADR.

Contudo, a modificação no metabolismo ruminal propostos pelas dietas fornecidas podem interferir, ainda, na composição da comunidade bacteriana ruminal. Visto isso, os filos Firmicutes e Bacteroidetes são os principais filos bacterianos encontrados no rúmen de animais consumindo dietas de forragem, podendo variar de 45% a 48% e 34% a 38%, respectivamente (Myer et al., 2015; Nardi et al., 2016; Min et al., 2019). Com isso, as famílias mais abundantes encontradas no rúmen dos animais no presente estudo foram Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, pertencentes ao filo Firmicutes, e Prevotellaceae, pertencente ao filo Bacteroidetes, e estão relacionadas a degradação de fibra (*Butyrivibrio*, *Lachnospiraceae incertae sedis* e *Ruminococcus*) e na degradação de amido (*Pseudobutyrvibrio* e *Roseburia*) (Granja-Salcedo et al., 2017).

Os aditivos fitogênicos não tiveram influência sobre a abundância desses filos, contrariamente à redução observada com os extratos de castanha e quebracho fornecidos a cabras em pastejo, que reduziram a abundância do filo Firmicutes em

23% e aumentaram as populações microbianas do filo Bacteroidetes (geralmente Gram-negativas) em 31% (Min et al., 2014).

A menor abundância de Archaeas do gênero *Methanosphaera* nos animais suplementados com suplemento mineral pode estar associado ao fato da *Methanosphaera* spp. utilizar grupos metil derivados de substitutos metoxil de material vegetal como principal substrato, assim, a produção de CH₄ derivado do grupo metil é limitada pela disponibilidade dos doadores de metil, e a abundância relativa de *Methanosphaera* spp. foi negativamente relacionada com a produção de CH₄ em ovinos (Kittelmann et al., 2014).

Animais suplementados com suplemento energético tiveram associados positivamente com a abundância ruminal de Archaeas do filo Euryarchaeota e do gênero *Methanobrevibacter*. spp. O filo Euryarchaeota está associado em ambiente anaeróbico do solo com participação além da oxidação do metano, com a degradação da matéria orgânica, fixação de nitrogênio e redução do nitrato (Zhang et al., 2019). Esse efeito na degradação da matéria orgânica contribui para a justificativa na maior abundância desse filo de Archaeas em animais que receberam suplemento energético.

Além disso, a associação positiva do suplemento energético com as Archaeas metanogênicas pode ser justificada pelo teor de enxofre do farelo de glúten de milho, em torno de 0,23% (Santos et al., 2004), devido ao processo industrial de obtenção do FGM que utiliza água sulfitada em uma de suas etapas (Kent, 1983). Muitas Archaeas utilizam compostos de enxofre como doadores ou aceptores de elétrons para a produção de energia (Kletzin, 2007).

A ordem Methanobacteriales é a mais representativa no rúmen, responsável por mais de 73% do total de metanogênicos (Saminathan et al., 2016) e *Methanobrevibacter* foi predominante dos produtores de CH₄ no rúmen de bovinos e ovelhas (Whitford et al., 2001; Wright et al., 2008; Saminathan et al., 2016). Ademais, *Methanobrevibacter* foi reduzida com o aumento do peso molecular das frações de taninos condensados (Saminathan et al., 2016), associado a redução na produção de CH₄ (Saminathan et al., 2015).

Ainda, em contraste ao nosso estudo, a inclusão de 1,5 g de taninos hidrolisáveis, provenientes de extratos de castanha *in vitro*, reduziu as proporções de

Methanobrevibacter sp., *M. ruminantium* e *M. stadtmanae* em mais de 70% (Witzig et al., 2018).

A inclusão dos aditivos fitogênicos reduziu a abundância relativa do filo Verrucomicrobia, que são mais abundantes em dietas de forragem (Auffret et al., 2017), possivelmente, devido a complexa estrutura celular dessas bactérias, com uma frágil membrana intracitoplasmática (Hedlund, 2010).

A interação entre o tipo de suplemento e a inclusão dos aditivos fitogênicos em nosso estudo proporcionou tendência de maior abundância de bactérias da família Bacteroidales_BS11_gut_group, as quais utilizam H₂ (Gast et al., 2009), no rúmen dos animais suplementados com SECAF em comparação aos animais suplementados com suplemento mineral. Entretanto, a tendência de maior abundância desses microrganismos não foi suficiente para reduzir a produção de metano entérico.

Animais suplementados com SECAF tiveram associados positivamente na análise de componentes principais com a variável de abundância ruminal do filo Bacteroidetes. Os óleos essenciais de forma geral têm maiores efeitos em bactérias Gram-positivas (Helander et al., 1998), no entanto, alguns compostos específicos, como o carvacrol pode provocar a perda de conteúdo celular e lise das células de bactérias Gram-negativas (Cobellis et al., 2016), atribuído a presença do grupo carbonila, que inativa enzimas na membrana da célula bacteriana (Benchaar e Greathead, 2011).

Bactérias do filo Bacteroidetes são geralmente Gram-negativas, dessa forma, isolando o efeito do óleo essencial carvacrol presente no aditivo fitogênico, poderia ser verificado efeito contrário ao encontrado. No entanto, a concentração do carvacrol pode não ser suficiente para causar esse efeito de forma isolada, visto que os taninos e outros óleos essenciais tem efeito principalmente nas bactérias Gram-positivas principalmente. De acordo com Calsamiglia et al. (2007), compostos como timol e carvacrol não inibem seletivamente bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas.

Independente do suplemento fornecido, os aditivos fitogênicos proporcionaram tendência em reduzir um gênero de bactérias da família *Ruminococcaceae* (*Ruminococcaceae*.UCG-010) e *Roseburia* spp. Juntamente com *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* são as bactérias

fibrolíticas mais predominantes no rúmen, e possuem maior habilidade em degradar celulose do que outras espécies celulolíticas (Hobson et al., 1997).

A tendência de redução na abundância das bactérias Ruminococcaceae. UCG-010, Lachnospiraceae NK3A20 group e a OTU não cultivável da família Lachnospiraceae, possivelmente explicaria a redução verificada na digestibilidade da FDNcp no rúmen dos animais do estudo de desempenho que consumiram os aditivos fitogênicos (Teobaldo et al., 2021; dados não publicados), pois há a necessidade de várias enzimas hidrolíticas para quebrar a fibra composta por resíduos de glicose com ligação β -1,4 para celulose, e xilose com ligação β -1,4 para hemicelulose, (Koike et al., 2009). Semelhante a esses resultados encontrados, Witzig et al. (2018) observaram redução na abundância relativa de *Ruminococcus albus*, mas sem efeito em *Fibrobacter succinogenes*. No entanto, esses resultados não foram encontrados no presente estudo.

Bactérias da família Ruminococcaceae e Lachnospiraceae pertencem a ordem Eubacteriales do filo Firmicutes e são Gram-positivas, enquanto *F. succinogenes* pertence ao grupo das Gram-negativas. Dessa forma, sugere-se que o ácido tânico (taninos hidrolisáveis) penetra a parede das células Gram-positivas em quantidades suficientes para reagir com os componentes estruturais e inibir a síntese celular, pois Ruminococcaceae são mais sensíveis ao ácido tânico do que *F. succinogenes* devido às Gram-negativas possuírem a membrana externa, além da membrana constituída por peptídeosglicanos (Ozkose et al., 2011).

Apesar disso, a inclusão de taninos hidrolisáveis (extratos de taninos de castanha) quando adicionado 78,9 g/kg MS em incubação de feno e concentrado reduziu a proporção de *F. succinogenes* e de *R. flavefaciens* (Jayanegara et al., 2015). Algumas espécies microbianas no rúmen são capazes de degradar os taninos hidrolisáveis (McSweeney et al., 2001), alterando o ácido tânico em níveis de pH mais elevados, e não são hidrolisados apenas no abomaso em condições necessárias para a hidrólise ácida (Nelson et al., 1995). Os microrganismos fibrolíticos parecem ser mais sensíveis a esses produtos gerados. Os produtos resultantes da degradação dos taninos hidrolisáveis acarretam em maior carga de fenóis na corrente sanguínea, à níveis maiores do que o fígado pode desintoxicar (Makkar et al., 2007).

A suplementação com ácido tânico nas doses de 13,0 e 26,0 g/kg de MS reduziu a abundância relativa de metanogênicos e *Ruminococcus albus*. Entretanto, mesmo a maior dose não afetou a abundância relativa de *F. succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens* e a digestibilidade da fibra não foi afetada (Yang et al., 2017). Assim, a fonte de tanino utilizado, a composição da dieta e o nível de suplementação dos extratos de taninos podem ser responsáveis pela discrepância e interferir nos resultados obtidos com os taninos hidrolisáveis.

8. CONCLUSÃO

A inclusão de um *blend* de aditivos fitogênicos, óleos essenciais (cinamaldeído e carvacrol) e taninos hidrolisáveis, na dose 1,5 g/kg MS consumida, em suplemento energético ou suplemento mineral fornecidos a tourinhos Nelore em pastejo em *Urochloa brizantha* cv. Marandu durante o período das águas, tem tendência de reduzir bactérias fibrolíticas, e não apresenta potencial para melhorar a utilização de nutrientes e eficiência de utilização de nitrogênio.

O fornecimento de suplemento energético durante a estação chuvosa em pastos tropicais melhora a utilização dos nutrientes e a eficiência de utilização de nitrogênio.

9. REFERÊNCIAS

Aboagye IA, Oba M, Castillo AR, Koenig KM, Iwaasa AD, Beauchemin KA (2018) Effects of hydrolyzable tannin with or without condensed tannin on methane emissions, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. **Journal of Animal Science** 96:5276-5286.

Ahnert S, Dickhoefer U, Schulz F, Susenbeth A (2015) Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. **Livestock Science** 177:63-70.

ARC, **The nutrient requirements of ruminant livestock**, Technical review by an Agricultural Research Council Working Party, Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, UK, 1984.

Association of Official Agricultural Chemists – AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 771 p. 1990.

Auffret MD, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, Wallace RJ, Freeman TC, Stewart R, Watson M, Roehe R (2017) The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. **Microbiome** 5:159.

Barbosa AM, Valadares RFD, Valadares Filho SC, Pina DS, Detmann, E, Leão MI (2011) Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nelore cattle. **Journal of Animal Science** 89:510-519.

Benchaa C, Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 166:338-55.

Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews** 70:567-590. doi:10.1152/physrev.1990.70.2.567

Biondo PBF, Carbonera F, Zawadzki F, Chiavellia LUR, Pilau EJP, Prado IN, Visentainer JV (2017) Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds by GC-MS of essential oils commercialized in Brazil. **Current Bioactive Compounds** 13:137-143.

Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, et al. (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome** a:6:90.

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology** 37: 852–857.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2006) Plant extracts effect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science** 89:761-771.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** 13:581-583.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A (2007) Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science** 90:2580–2595.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren AM (2010) Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal** 4:1184–1196.

Chen XB, Gomes MJ (1995) **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details**, Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen (Occasional Publication), 1995.

Clark S, Daly R, Jordan E, Lee J, Mathew A, Ebner P (2012) The future of biosecurity and antimicrobial use in livestock production in the United States and the role of extension. **Journal Animal Science** 90:2861–2852.

Cobellis G, Trbalza-Marinucci M, Yu Z (2016) Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. **Science of the Total Environment** 545:556-568.

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** 41:807–810.

Costa M, Alves SP, Cappucci A, Cook SR, Duarte A, Caldeira RM, McAllister TA, Bessa RJB (2018) Effects of condensed and hydrolysable tannins on rumen metabolism with emphasis on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66:3367-3377.

Detmann E, Paulino MF, Mantovani HC, et al. (2009) Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science** 126:136-146.

Detmann E, Paulino MF, Valadares Filho SC (2010) Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: **Anais** do 7º Simpósio de Produção de Gado de Corte, Viçosa. pp.191-240.

Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological Conservation** 61:1-10.

Famme P, Knudsen J (1984) Total heat balance study of anaerobiosis in *Tubiflex* (Muller). **Journal of Comparative Physiology** 154(B):587-591.

Firkins JL, Berger LL, Fahey Jr GC (1985) Evaluation of wet and dry distillers grains and dry corn gluten feeds for ruminants. **Journal of Animal Science** 60(3):847-860.

García V, Catalá-Gregori P, Madrid J, Hernández F, Megías MD, Andrade-Montemayor HM (2007) Potential of carvacrol to modify in vitro rumen fermentation as compared with monensin. **Animal** 1(5):675-680.

Gast RJ, Sanders RW, Caron DA (2009) Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. **Trends Microbiology** 17:563-569.

Geraci JI, Garciarena AD, Gagliostro GA, Beauchemin KA, Colombatto D (2012) Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets Ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. **Animal Feed Science and Technology** 176:123–130.

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):e0176701.

Halls LK (1954) The approximation of cattle diet through herbage sampling. **Rangeland Ecology and Management** 7:269–270.

Hedlund BP (2010) “**Phylum XXIII. Verrucomicrobia phyl. nov.**,” in *Bergey’s Manual R of Systematic Bacteriology*, 2nd Edn, Vol. 4, eds N. R. Krieg, W. Ludwig, W. Whitman, B. P. Hedlund, B. J. Paster, J. T. Staley, et al. (New York, NY: Springer), 795–841. doi: 10.1007/978-0-387-68572-4_12

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright AV (1998) Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry** 46:3590–3595.

Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Heidarian MV, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH (2013) Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE** 8(9):e74787.

Hobson PN, Stewart CS (ed). 1997. **The rumen microbial ecosystem**. Blackie Academic and Professional, London, England.

Hoffmann A, Cardoso AS, Fonseca NVB, Romanzini EP, Siniscalchi D, Berndt A, Ruggieri AC, Reis RA (2021) Effects of supplementation with corn distillers’ dried grains on animal performance, nitrogen balance, and enteric CH₄ emissions of young Nellore bulls fed a high-tropical forage diet. **Animal** 15:100155.

Jami E, White BA, Mizrahi I (2014) Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. **PLoS One** 9:1–6. doi:10.1371/journal.pone.0085423

Jayanegara A, Goel G, Makkar HPS, Becker K (2015) Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. **Animal Feed Science and Technology** 209:60–68.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, et al. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research** 30:3059–3066.

Kawamoto H, Nakatsubo F, Murakami K (1995) Quantitative determination of tannin and protein in the precipitates by high-performance liquid chromatography. **Phytochemistry** 40:1503–1505. doi:10.1016/0031-9422(95)00451-C

Kennedy PM, Milligan LP (1980) The degradation and utilization of endogenous urea the gastrointestinal tract of ruminants: a review. **Canadian Journal Animal Science** 60:205–221. doi:10.4141/cjas80-030.

Kent NL (1983) Technology of cereal: An introduction for students of food science and agriculture. 3, ed, London: Pergamon Press, 1983.221p.

Kiro RP (2017) Assessment of the rumen fluid of a bovine patient. **Dairy Veterinary Science Journal** 2:555588. doi:10.19080/JDVS.2017.02.555588.

Kittelmann S, Pinares-Patino CS, Seedorf H, Kirk MR, Ganesh S, McEwan JC, et al. (2014) Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. **Plos One** 9(7):e103171.

Kletzin A, Urich T, Müller F, Bandejas TM, Gomes CM (2004) Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** 36:77–91.

Koike S, Kobayashi Y (2009) Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. **Asian-Australasian Journal Animal Science** 22(1):131–138.

Krueger WK, Gutierrez-Banuelos H, Carstens GE, Min BR, Pinchak WE, Gomez RR, Anderson RC, Krueger NA, Forbes TDA (2010) Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology** 159, 1–9.

Langille MGI, Zaneveld J, et al. (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology** 31(9):814–821.

Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996) Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Science Feed Technology** 57: 347.

MacAdam JW, Villalba JJ (2015) Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. **Agriculture** 5:475–491. doi:10.3390/agriculture5030475

Makkar HPS, Francis G, Becker K (2007) Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal** 1:1371–1391.

Mcdonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA., Wilkinson RG (2011) **Animal Nutrition** 7:171-185.

McSweeney CS, Palmer B, Mcneill DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science Technology** 91:83–93.

Min BR, Gurung N, Shange R, Solaiman S (2019) Potential role of rumen microbiota in altering average daily gain and feed efficiency in meat goats fed simple and mixed pastures using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. **Journal of Animal Science** 97:3523-3534.

Min BR, Wright C, Ho P, Eun JS, Gurung N, Shange R (2014) The effect of phytochemical tannins-containing diet on rumen fermentation characteristics and microbial diversity dynamics in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. **Agriculture, Food and Analytical Bacteriology** 4:195–211.

Moss AR, Jouany JP, Newbold J, Agabriel J, Givens I (2000) Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales De Zootechnie** 49, 231–253.

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

Myer PR, Smith TP, Wells JE, Kuehn LA, Freetly HC (2015) Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One** 10:e0129174. doi:10.1371/journal.pone.0129174

Nardi RD, Marchesin GM, Li S, Khafipour E, Plaizier KJC, Ganesella M, Ricci R, Andrighetto I, Segato S (2016) Metagenomic analysis of rumen microbial population in dairy heifers fed a high grain diet supplemented with dicarboxylic acids or polyphenols. **CMC Veterinary Research** 12:1-9. doi:10.1186%2Fs12917-016-0653-4

National Research Council, NRC (1996) **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press.

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals** 6:1451–1474.

Nelson KE, Pell AN, Schofield P, Zinder S (1995) Isolation and Characterization of an Anaerobic Ruminal Bacterium Capable of Degrading Hydrolyzable Tannins. **Applied and Environmental Microbiology** 61(9):3293-3298.

Ozkose E, Kuloğlu R, Comlekcioglu U, Kar B, Akyol I, Ekinçi MS (2011) Effects of tannic acid on the fibrolytic enzyme activity and survival of some ruminal bacteria. **International Journal of Agriculture and Biology** 13:386-390.

Patra AK, Saxena J (2011) Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition – Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91:24-37.

Patra AK, Yu Z (2012) Effects of essential oils on methane production and fermentation by and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology** 78:4271–4280.

Poppi DP, McLennan SR (1995) Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science** 73:278- 290.

Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS ONE** 5:e9490.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Opens external link in new window **Nucleic Acids Research** 41 (D1): D590-D596.

Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE (2003) Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science** 86:1201-1217. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7

Robertson JB, Van Soest PJ (1981) The detergent system of analysis. In: JAMES, W. P. T., THEANDER, O. (Eds.). **The Analysis of Dietary Fibre in Food**. Marcel Dekker, NY, Chapter 9, p. 123–158.

Rodrigues PB, Rostagno HS, Albino LFT, Gomes PC, Barboza WA, Nunes RV (2001) Aminoácidos digestíveis verdadeiros do milho, do milho e subprodutos do milho, determinados com galos adultos cectomizados. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30(6S):2046-2058.

Saminathan M, Sieo CC, Abdullah N, Wong CMVL, Ho YW (2015). Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on in vitro methane production and rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 95:2742–2749.

Saminathan M, Sieo CC, Gan HM, Abdullah N, Wong CMVL, Ho YW (2016) Effects of condensed tannin fractions of different molecularweights on population and diversity of bovine rumenmethanogenic archaea in vitro, as determined byhigh-throughput sequencing. **Animal Feed Science and Technology** 216:146-160.

Santos FAP, Pereira EM, Pedroso AM. Suplementação energética de bovinos de corte em confinamento. In: Simpósio De Bovinocultura De Corte, 5., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005.

Santos, FA (2004) Glúten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime** 1(3):79-100.

Saro C, Ranilla MJ, Carro MD (2012) Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Journal of Animal Science** 90:4487–4494.

Stewart EK, Beauchemin KA, Dai X, MacAdam JW, Christensen RG, Villalba JJ (2019) Effect of tannin-containing hays on enteric methane emissions and nitrogen partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 97(8):3286-3299.

Street JC, Butcher JE, Harris LE (1964) Estimating urine energy from urine nitrogen. **Journal of Animal Science** 23:1039-1041.

Tedeschi LO, Callaway TR, Muir JP, Anderson RC (2011) Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:291-309.

Teobaldo RW, De Paula NF, Zervoudakis JT, Fonseca MA, Cabral LS, Martello HF, Rocha JKL, Ribeiro IJ, Mundim AT (2020) Inclusion of a blend of copaiba, cashew nut shell and castor oil in the protein-energy supplement for grazing beef cattle improves rumen fermentation, nutrient intake and fibre digestibility. **Animal Production Science** 60:1039–1050.

Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnel CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57:5987–6000.

Toral PG, Hervas G, Bichi E, Belenguer A, Frutos P (2011) Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: effects on animalperformance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. **Animal Feed Science and Technology** 164,199–206.

Valadares RFD, Gonçalves LC, Rodriguez NM, Valadares Filho SC, Silva JFC (1997) Níveis de proteína em dietas de bovinos. 2. Consumo, digestibilidade e balanço de compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, 26(6):1259-1263.

Valente TNP, Detmann E, Queiroz AC, Valadares Filho SC, Gomes DI, Figueiras JF (2011) Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40:2565-2573.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** 74:3583-3597.

Vendramini JMB, Sanchez JMD, Cooke RF, Aguiar AD, Moriel P, da Silva WL, Cunha OFR, Ferreira PDS, Pereira AC (2015). Stocking rate and monensin supplemental level effects on growth performance of beef cattle consuming warm-season grasses. **Journal of Animal Science** 93:3682–3689.

Whitford MF, Teather RM, Forster RJ (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. **BMC Microbiology** 1:5.

Wilkinson TJ, Huws SA, et al. (2018) **CowPI: A rumen microbiome focussed version of the PICRUSt functional inference software**. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.1095.

Witzig M, Zeder M, Rodehutsord, M (2018) Effect of the ionophore monensin and tannin extracts supplemented to grass silage on populations of ruminal cellulolytics and methanogens in vitro. **Anaerobe** 50:44-54.

Wright AD, Ma X, Obispo NE (2008). Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. **Microbial Ecology** 56:390–394.

Yang K, Wei C, Zhao GY, Xu ZW, Lin SX (2017) Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 101:302-310.

Zhang XM, Medrano RF, et al (2019) Corn oil supplementation enhances hydrogen use for biohydrogenation, inhibits methanogenesis, and alters fermentation pathways and the microbial community in the rumen of goats. **Journal of Animal Science** 97(12):4999–5008.

Tabela Suplementar

Tabela 1. Mediana e rango interquartil das vias funcionais KEGG preditas no nível 3 da comunidade microbiana ruminal de bovinos em pastejo no período das águas, com fornecimento de suplemento energético ou suplemento mineral, com inclusão ou não de aditivos fitogênicos

Funcionalidade	Tratamentos				P-valor		
	Suplemento energético		Suplemento mineral				
	Sem aditivo	Com aditivo	Sem aditivo	Com aditivo	Supl.	Adit.	Supl. x Adit.
Metabolismo de aminoácidos	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,042	0,238	0,140
Metabolismo de energia	0,99 ± 0,02	1,01 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,99 ± 0,01	0,077	0,142	0,152
Metabolismo do fosfato de inositol	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,005	0,045	0,725	0,164
Metabolismo do ácido lipóico	0,02 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,005	0,032	0,017	0,016
Metabolismo de nicotinato e nicotinamida	0,48 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,47 ± 0,005	0,064	0,422	0,249
Metabolismo do propanoato	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,983	0,074	0,345
Metabolismo de purina	2,29 ± 0,04	2,29 ± 0,03	2,27 ± 0,03	2,28 ± 0,01	0,052	0,703	0,267
Metabolismo esfingolipídico	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,447	0,019	0,107
Metabolismo de amido e sacarose	0,99 ± 0,03	0,98 ± 0,02	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,04	0,094	0,858	0,409
Metabolismo da taurina e hipotaurina	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,049	0,042	0,032
Metabolismo do triptofano	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,003	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,054	0,793	0,186
Biossíntese de antibióticos do grupo vancomicina	0,06 ± 0,003	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,005	0,600	0,052	0,249
Biossíntese de folato	0,39 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,067	0,207	0,187
Biossíntese de glicosfingolipídeos - série ganglio	0,05 ± 0,003	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,005	0,05 ± 0,01	0,290	0,029	0,109
Biossíntese de glicosfingolipídeos - globo series	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,005	0,041	0,041	0,040
Proteínas de biossíntese de lipopolissacarídeos	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,123	0,057	0,121
Biossíntese de estreptomicina	0,34 ± 0,005	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,678	0,049	0,230
Biossíntese de terpenóides da coluna vertebral	0,63 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,63 ± 0,003	0,63 ± 0,00	0,065	0,981	0,233
Degradação de geraniol	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,003	0,03 ± 0,003	0,03 ± 0,00	0,006	0,736	0,050
Degradação de glicosaminoglicanos	0,06 ± 0,003	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,01	0,245	0,045	0,146

Outra degradação de glicano	0,26 ± 0,008	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,191	0,034	0,111
Degradação de RNA	0,49 ± 0,003	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,012	0,372	0,071
Sistema de secreção bacteriana	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,56 ± 0,003	0,56 ± 0,005	0,097	0,182	0,126
Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,004	0,604	0,036
Sistema de retransmissão de enxofre	0,23 ± 0,003	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,369	0,038	0,167
Vias de fixação de carbono em procariontes	1,07 ± 0,03	1,09 ± 0,03	1,06 ± 0,04	1,07 ± 0,02	0,066	0,246	0,198
Ciclo citrato	0,65 ± 0,028	0,66 ± 0,03	0,62 ± 0,04	0,63 ± 0,02	0,048	0,472	0,226
Fosforilação oxidativa	1,16 ± 0,02	1,18 ± 0,03	1,15 ± 0,03	1,15 ± 0,02	0,098	0,175	0,213
Peptidases	1,92 ± 0,01	1,93 ± 0,01	1,91 ± 0,008	1,91 ± 0,03	0,061	0,117	0,110
Fatores de tradução	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,60 ± 0,00	0,077	0,607	0,322
Antígenos celulares	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,000	0,04 ± 0,005	0,014	0,497	0,081
Reparo de incompatibilidade	0,88 ± 0,01	0,89 ± 0,00	0,89 ± 0,01	0,89 ± 0,00	0,516	0,063	0,183