

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**METABOLOMA FECAL DE BOVINOS DA RAÇA NELORE: PRÉ E PÓS-
CONFINAMENTO E ASSOCIAÇÃO COM O CONSUMO ALIMENTAR
RESIDUAL**

**Matheus Henrique Vargas de Oliveira
Zootecnista**

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**METABOLOMA FECAL DE BOVINOS DA RAÇA NELORE: PRÉ E PÓS-
CONFINAMENTO E ASSOCIAÇÃO COM O CONSUMO ALIMENTAR
RESIDUAL**

Discente: Matheus Henrique Vargas de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva
Coorientadora: Dra. Jessica Moraes Malheiros

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal.

O48m

Oliveira, Matheus Henrique Vargas de
Metaboloma fecal de bovinos da raça Nelore: pré e
pós-confinamento e associação com o consumo alimentar residual /
Matheus Henrique Vargas de Oliveira. -- Jaboticabal, 2023
95 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Josineudson Augusto II Vasconcelos Silva
Coorientadora: Jéssica Moraes Malheiros

1. Biomarcadores. 2. Bos indicus. 3. Eficiência alimentar. 4.
Metabólitos. 5. Nutrição animal. 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.

Registro de Impacto

O presente estudo identificou metabólitos nas fezes de bovinos da raça Nelore em ambos os períodos, pré e pós-confinamento, bem como em grupos de eficiência alimentar, eficientes e não eficientes. Essas descobertas destacam o potencial do metaboloma fecal, com foco na concentração dos ácidos graxos voláteis, como promissores biomarcadores. Eles podem ser empregados na avaliação de protocolos nutricionais e na condução do processo seletivo de bovinos da raça Nelore.

Impact Statemen

The present study identified metabolites in the feces of Nelore cattle in both pre and post confinement periods, as well as in different groups of feed efficiency, efficient and non-efficient animals. These findings underscore the potential of the fecal metabolome, with a focus on the concentration of volatile fatty acids, as promising biomarkers. They can be used in the evaluation of nutritional protocols and in the selection process of Nelore cattle.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: METABOLOMA FECAL DE BOVINOS DA RAÇA NELORE: PRÉ E PÓS CONFINAMENTO E ASSOCIAÇÃO COM O CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

AUTOR: MATHEUS HENRIQUE VARGAS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA

COORIENTADORA: JÉSSICA MORAES MALHEIROS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA
Data: 02/08/2023 16:25:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente

Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA (Participação Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

gov.br LENIRA EL FARO ZADRA
Data: 01/08/2023 10:18:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA (Participação Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

gov.br NEDENIA BONVINO STAFUZZA
Data: 23/07/2023 14:54:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SARAH FIGUEIREDO MARTINS BONILHA (Participação Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

gov.br SARAH FIGUEIREDO MARTINS BONILHA
Data: 20/07/2023 11:48:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MATHEUS DENIZ (Participação Virtual)
Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br MATHEUS DENIZ
Data: 27/07/2023 10:24:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 19 de julho de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Matheus Henrique Vargas de Oliveira, filho de Enivaldo Gonçalves de Oliveira e Valéria Filomena Vargas de Oliveira. Nascido em 11 de abril de 1995 no município de Oliveira, estado de Minas Gerais, Brasil. Iniciou o curso de Bacharelado em Zootecnia na Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *campus* Tancredo de Almeida Neves em Maio de 2013, obtendo o título de Bacharel em Zootecnia em Dezembro de 2017, sob orientação da Profa. Dra. Leila de Genova Gaya, e no mesmo ano, obteve o Técnico em Agropecuária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (IFMG), *campus* Barbacena. Em março de 2018 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), *campus* Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva, obtendo título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal em julho de 2019. Em agosto de 2019 iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), *campus* Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva. Foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante a realização dos cursos de Mestrado e Doutorado.

EPÍGRAFE

***“Não há conquistas fáceis, são as estradas sinuosas que levam ao
caminho certo”***

(Afonso Opazo)

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

(George Bernard Shaw)

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela presença contínua em minha vida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva**, pela orientação, dedicação, paciência e principalmente pela amizade durante esses anos de convívio. Obrigado pela confiança no meu trabalho!

À minha coorientadora **Dra. Jessica Moraes Malheiros**, pela contribuição, disponibilidade e ensinamentos durante esses anos.

À minha **Família**, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e alcançasse meus objetivos.

Aos **amigos de São Paulo e Minas Gerais**, saibam que nossa relação não se findará, mas será por toda a vida. Enfim, por todas as amizades que fiz durante minha vida, tornando meus dias mais felizes.

Aos **companheiros** do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal (FCAV/UNESP), pelo apoio e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Ao **pesquisador** Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago (Embrapa Instrumentação) e as **doutorandas** Pollyana Ferreira da Silva e Caroline Ceribeli (USP/IQSC) pela ajuda e apoio durante às análises.

Ao **Programa de Melhoramento Nelore Qualitas** pela concessão dos dados utilizados neste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 PANORAMA da BOVINOCULTURA DE CORTE NO BRASIL...	5
3.2 CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL.....	7
3.3 METABOLÔMICA ASSOCIADA à EFICIÊNCIA ALIMENTAR..	10
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DO METABOLOMA FECAL DE BOVINOS NELORE NO PRÉ E PÓS-CONFINAMENTO	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 ANIMAIS E COLETA DE DADOS.....	25
2.2 METABOLÔMICA.....	27
3. RESULTADOS.....	29
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO 3 - METABOLÔMICA FECAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE ASSOCIADA AO CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS	55
2.2 FENÓTIPOS E SELEÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.	57
2.3 METABOLÔMICA.....	58
3. RESULTADOS	60
4. DISCUSSÃO	70
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

METABOLOMA FECAL DE BOVINOS DA RAÇA NELORE: PRÉ E PÓS-CONFINAMENTO E ASSOCIAÇÃO COM O CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

RESUMO – O aproveitamento eficiente dos nutrientes na bovinocultura de corte é essencial para reduzir o consumo de alimentos, diminuir os custos e promover uma produção sustentável. Isso se deve ao fato de que a alimentação desempenha papel fundamental nos sistemas de produção, representando parcela substancial, que pode variar de 60% a 80%, dos custos totais e exerce influência direta sobre a lucratividade do sistema. Nesse contexto, os objetivos do presente estudo foram: (i) avaliar os perfis metabolômicos das fezes de animais da raça Nelore no pré e pós-confinamento; (ii) investigar o perfil metabolômico das fezes de touros da raça Nelore, selecionados para distintos grupos de consumo alimentar residual (CAR, em kg MS/dia). Para isso, foram utilizados 108 bovinos da raça Nelore. Durante a fase de pré-confinamento, os animais foram submetidos a uma dieta rica em carboidratos fibrosos, e amostras de fezes foram coletadas de 21 bovinos durante essa fase. Na fase de confinamento, os animais foram submetidos a dieta rica em carboidratos não-fibrosos. O CAR foi calculado, e dois grupos experimentais foram selecionados: bovinos eficientes (CAR negativo = $-1,19 \pm 0,34$ kg MS/dia; N=15) e bovinos não eficientes (CAR positivo = $+1,09 \pm 0,27$ kg MS/dia; N=15). Amostras de fezes desses bovinos foram coletadas. A análise de metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN) foi realizada em todas as amostras coletadas, tanto na fase pré-confinamento quanto na fase pós-confinamento. Durante a fase de pré-confinamento, foram identificados e quantificados 57 metabólitos, enquanto no pós-confinamento foram identificados 55 metabólitos. Oito metabólitos foram exclusivamente encontrados na fase de pré-confinamento (2-fenilpropionato, caprilato, fumarato, desaminotirosina, gama-glutamil fenilalanina, NADH, timidina, pantotenato), enquanto seis compostos estavam presentes apenas na fase de pós-confinamento (acetamida, 2-oxoglutarato, uracila, xantina, trimetilamina, dimetil sulfonas). As principais vias metabólicas observadas incluíram a síntese e degradação de corpos cetônicos, a biossíntese

da fenilalanina, tirosina e triptofano, o metabolismo da glicina, serina e treonina, e o metabolismo da tirosina e biossíntese da histidina. Nas fezes dos touros eficientes e não eficientes, foram identificados e quantificados 56 metabólitos. Desses, 36 metabólitos foram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais para o CAR ($p < 0,05$). O grupo de touros eficientes exibiu concentrações mais elevadas de butirato, propionato e valerato, em contraste, o grupo de touros não eficientes apresentou uma concentração mais alta de acetato. Os resultados das vias metabólicas revelaram significativo enriquecimento nas vias de síntese e degradação de corpos cetônicos, biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano, metabolismo da glicina, serina e treonina, ciclo do ácido cítrico e metabolismo do piruvato entre os grupos eficientes e não eficientes. É relevante ressaltar que o acetato, butirato e o propionato foram identificados como metabólitos com concentrações mais elevadas nas fezes de bovinos da raça Nelore, tanto no pré quanto no pós-confinamento, independentemente da eficiência alimentar dos animais. Esses resultados enfatizam o potencial do metaboloma fecal, especialmente a concentração dos ácidos graxos voláteis, como promissores biomarcadores para avaliar protocolos nutricionais e conduzir a seleção de animais.

Palavras-chave: biomarcadores, *bos indicus*, eficiência alimentar, metabólitos, nutrição animal.

FECAL METABOLOME OF NELLORE CATTLE: PRE AND POST CONFINEMENT AND ASSOCIATION WITH RESIDUAL FEED INTAKE

ABSTRACT - Efficient nutrient utilization in beef cattle farming is essential for reducing feed consumption, lowering costs, and promoting sustainable production. Feed plays a crucial role in production systems, representing a significant portion of 60% to 80% of total costs and exerting a direct influence on system profitability. In this context, the objectives of this study were: (i) to evaluate the fecal metabolomic profiles of Nellore cattle in the pre and post confinement phases; (ii) to investigate the fecal metabolomic profile of Nellore bulls selected for different residual feed intake (RFI) groups (in kg DMI/day). For this, 108 Nellore cattle were used. During the pre-confinement phase, the animals were subjected to a diet rich in fibrous carbohydrates, and fecal samples were collected from 21 cattle during this phase. In the confinement phase, the animals were fed a high-non-fiber carbohydrate diet. The RFI was calculated, and two experimental groups were selected: efficient cattle (low RFI = -1.19 ± 0.34 kg DMI/day; N=15) and inefficient cattle (high RFI = $+1.09 \pm 0.27$ kg DMI/day; N=15). Fecal samples from these cattle were collected. Metabolomic analysis using Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) was performed on all collected samples, both in the pre-confinement and post-confinement phases. (i) During the pre-confinement phase, a total of 57 metabolites were identified and quantified, while in the post-confinement phase, 55 metabolites were identified. Eight metabolites were exclusively found in the pre-confinement phase (2-phenylpropionate, caprylate, fumarate, desaminotyrosine, gamma-glutamylphenylalanine, NADH, thymidine, pantothenate), while seven compounds were present only in the post-confinement phase (acetamide, 2-oxoglutarate, uracil, xanthine, trimethylamine, dimethyl sulfones). The major observed metabolic pathways included ketone body synthesis and degradation, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, glycine, serine, and threonine metabolism, and tyrosine metabolism and histidine biosynthesis. (ii) In the feces of efficient and inefficient bulls, a total of 56 metabolites were identified and quantified. Among them, 36 metabolites showed differential expression between the experimental groups for RFI

($p < 0.05$). Butyrate, propionate, and valerate had higher concentrations in the efficient bull group, while acetate showed higher concentration in the inefficient bull group. The results of the metabolic pathways revealed significant enrichment in the pathways of ketone body synthesis and degradation, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, glycine, serine, and threonine metabolism, citric acid cycle, and pyruvate metabolism among the groups. It is worth noting that acetate, butyrate, and propionate were identified as metabolites with higher concentrations in the feces of Nellore cattle, both in the pre- and post-confinement phases, regardless of the animals' feed efficiency. These results highlight the potential of the fecal metabolome, especially the concentration of volatile fatty acids, as promising biomarkers for evaluating nutritional protocols and animal selection.

Keywords: biomarkers, *bos indicus*, feed efficiency, metabolites, animal nutrition.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador, segundo maior produtor e terceiro maior consumidor de carne bovina do mundo. O país possui um rebanho comercial estimado em 196,47 milhões de cabeças, sendo que aproximadamente 80% é composto por *Bos taurus indicus* (ABIEC, 2022). A produção de animais zebuínos predomina no país, principalmente devido à sua adaptabilidade ao clima tropical, rusticidade, resistência aos ecto/endoparasitas e baixa exigência nutricional para manutenção (Carvalho et al., 2014; Cônsolo et al., 2015).

Nas últimas quatro décadas, a pecuária bovina do país passou por uma revolução marcada por avanços significativos no âmbito tecnológico dos sistemas de produção (extensivo, semi-intensivo e intensivo), bem como na organização da cadeia produtiva. Esses fatores não apenas impulsionaram a produtividade, mas também aprimoraram a qualidade do produto brasileiro, ampliando, assim, sua competitividade e alcance no mercado internacional. No entanto, é importante destacar que ainda há muito a ser feito para aumentar a produtividade do rebanho nacional, com ênfase na adoção de tecnologias que visem à redução dos custos nas propriedades.

Um dos grandes entraves é o sistema de produção ser em sua maior parte extensivo (84,4%), o qual está relacionado ao baixo investimento dos produtores (ABIEC, 2021). Esse cenário tem como consequência ganhos reduzidos, o que posiciona a viabilidade financeira da atividade em risco. Uyeh et al. (2018) afirmaram que os custos relacionados à alimentação, independentemente do nível tecnológico, constituem de 60 a 80% dos custos totais de produção. Além disso, a intensa demanda por terras para produção de pastagens e de grãos compete com áreas que poderiam ser destinadas à produção de alimentos para consumo humano. Portanto, novas ferramentas que busquem mitigar o custo da alimentação e aumentar a eficiência na utilização do alimento, componente mais dispendioso e relevante no processo de produção de bovinos de corte, devem ser elucidados (Lowe et al., 2009; Arthur et al., 2014; Wei et al., 2022).

Associada aos sistemas de produção nacional, pecuaristas da bovinocultura de corte buscam inovações tecnológicas para estar à frente no mercado agropecuário. Desta forma, a eficiência alimentar de bovinos deve ser explorada na identificação e seleção de animais geneticamente superiores em relação ao uso de alimentos para a produção de carne. Esta característica pode ser estimada com base no consumo alimentar residual (CAR, kg MS/dia), o qual é definido como resíduo obtido da diferença do consumo alimentar observado e o predito de cada animal, e está diretamente relacionado com aumento da produção de carne por quantidade de alimento oferecido (Koch et al., 1963).

No Brasil, até o ano de 2023, somente um programa de melhoramento genético da raça Nelore utiliza o CAR como critério de seleção. Esse fato se deve ao alto custo da tecnologia e à necessidade de mão de obra especializada (Williams, 2010; Damiran et al., 2018). Além disso, essa característica é controlada por inúmeros processos biológicos, regulada por grande número de genes e fatores ambientais (Widmann et al., 2015; Tizioto et al., 2016; Wallace et al., 2017). Estudos que investigaram o CAR em bovinos da raça Nelore, oriundos de programas de melhoramento, destacaram a presença de variabilidade genética nos fenótipos de CAR, que se manifesta em diferentes ambientes e faixas etárias. Estimativas de herdabilidade moderadas, variando de 0,24 a 0,33, foram obtidas em tais estudos (Polizel et al., 2018; Moraes et al., 2019; Oliveira et al., 2022). Essas pesquisas sugerem a viabilidade de adotar o CAR como critério de seleção, visando aprimorar a eficiência alimentar e reduzir os custos de produção. A variação nas estimativas de herdabilidade pode ser atribuída a várias fontes, incluindo a relação do fenótipo CAR com alterações no metabolismo animal, diferenças nas estruturas populacionais e diferentes métodos de mensuração da característica.

Apesar das dificuldades de mensuração do CAR, ciências biotecnológicas chamadas “ômicas” estão sendo rotineiramente utilizadas em pesquisa de diversas áreas da produção animal. Estudos recentes em bovinos por meio de amostras de músculo, sangue, fígado, fluído ruminal e fezes investigaram o CAR por meio da genômica (Olivieri et al., 2016; Pszczola et al., 2018), transcriptômica (Zarek et al., 2017; Benedeti et al., 2018), proteômica (Montanholi et al., 2016;

Jung et al., 2017) e metabolômica (Novais et al., 2019; Malheiros et al., 2021) com resultados em relação às funções biológicas relacionadas aos processos metabólicos, metabolismo de lipídios/proteínas e carboidratos, utilização de energia, crescimento muscular e adiposo, transporte de íons, sistema olfativo e imunológico, secreção e atividades celulares.

Atualmente a metabolômica tem se mostrado uma importante ferramenta para esclarecer os mecanismos subjacentes dos sistemas bioquímicos e fisiológicos dos organismos, principalmente, no rúmen e nas fezes, quando levado em consideração a alimentação, seja no regime de pastagens e/ou grãos (Novais et al., 2019; Malheiros et al., 2021; Sidney et al., 2023). Os metabólitos são efetivamente os produtos de reações bioquímicas complexas no organismo (Fontanesi et al., 2016), e quando avaliados em conjunto com resultados de outras ômicas, aumentam a acurácia da predição de características de interesse econômico (Karisa et al., 2014; Fontanesi et al., 2016).

A combinação de informações referentes a metabolômica em bovinos de corte da raça Nelore necessita ser esclarecida, com intuito de desenvolver análises entre os metabólitos presentes no pré e pós confinamento, bem como os metabólitos associados com o fenótipo CAR. Uma dificuldade de avaliar esta associação, em sua maior parte, se deve aos procedimentos invasivos necessários na coleta das amostras dos bovinos. Dentro desse cenário, a integração da metabolômica fecal com as informações provenientes do melhoramento genético tradicional emerge como uma ferramenta de relevância crucial. Essa abordagem oferece a capacidade de caracterizar metabólitos, identificar potenciais biomarcadores e elucidar as vias metabólicas que desempenham papéis significativos tanto no pré quanto no pós-confinamento, assim como aquelas relacionadas ao CAR.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os perfis metabolômicos das fezes de animais da raça Nelore no pré e pós confinamento, além de comparar dois grupos (eficientes e não eficientes) para consumo alimentar residual, com o intuito de identificar biomarcadores das fezes que possam ser utilizados na seleção de animais eficientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Predizer o consumo alimentar residual (CAR, kg MS/dia) de touros Nelore participantes de teste de eficiência alimentar no sistema confinado;
- Identificar e quantificar os metabólitos dos animais submetidos ao pré e pós confinamento;
- Identificar e quantificar os metabólitos de grupos experimentais classificados pelo consumo alimentar residual: (i) animais eficientes (CAR negativo); (ii) animais não eficientes (CAR positivo).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE CORTE NO BRASIL

No ano de 2021, os sistemas de produção nacional englobaram 196,47 milhões de bovinos, distribuídas nos ambientes extensivos, semi-intensivos e intensivos (ABIEC, 2022). Esse fato permitiu que o Brasil se tornasse o maior exportador, segundo maior produtor e terceiro maior consumidor de carne bovina do mundo (USDA, 2022). A raça Nelore é a mais representativa dentro do rebanho brasileiro (Millen et al. 2009; ABCZ, 2022), sendo base para cruzamentos com raças taurinas (*Bos taurus taurus*), a fim de produzir animais adaptados ao clima tropical sob pastejo, rústicos e resistentes aos ecto/endoparasitas, quando comparados com a subespécie *Bos taurus taurus* (Silva et al., 2012; Carvalho et al., 2014; Cônsolo et al., 2015).

Deste modo, a bovinocultura de corte é atividade de grande impacto econômico nacional e internacional, responsável pela geração de inúmeros empregos diretos e indiretos, devido à alta produção e comércio de carne bovina. O que tudo indica, a bovinocultura nacional continuará nessa posição nos próximos anos, consolidando-se tanto como produtora de alimento nobre para o mercado interno e como elemento importante para o país, por sua inserção no mercado mundial de carne bovina (ABIEC, 2022). No entanto, os índices zootécnicos e econômicos relacionados às características de produção e reprodução que caracterizam essa atividade estão muito distantes daqueles que poderiam garantir sua competitividade e consequente permanência como empreendimento economicamente atraente.

O presente cenário da pecuária de corte é impulsionado principalmente pelo aumento substancial do consumo humano de proteína de origem animal, por essa razão, o Brasil devido a sua grande extensão territorial associada à diversidade climática pode suprir essa demanda aumentando a produtividade das áreas já estabelecidas com investimentos na genética e ambiente dos rebanhos (Forbes, 2007; Cabral et al., 2011). Entretanto, devido à grande variabilidade nacional, é possível o desenvolvimento de diversos sistemas de produção e dificilmente existirá um único na bovinocultura de corte, que varia entre os extensivos, semi-intensivos e/ou intensivos (Sartorello et al., 2018).

O sistema extensivo leva em consideração a criação dos animais exclusivamente em regime de pastagens naturais sem suplementação, em sua maior parte, formadas por pastagens nativas, as quais demandam de pouca mão de obra e instalações para o manejo dos animais (Waterhouse, 1996). O sistema semi-intensivo necessita de alguma especialização com equipamentos e mão de obra, instalações mínimas, baixa utilização de pastagem e suplementos ao longo do ano (Metawi et al., 1999). O sistema intensivo, exige desenvolvimento tecnológico e mão de obra especializada, os animais são criados em pastagens devidamente adubadas e irrigadas. Além disso, ocorre a suplementação mineral e/ou proteica, e os bovinos podem ser mantidos em confinamentos com acesso à água e alimento *ad libitum* (Araújo et al., 2014). O presente sistema diferencia-se dos demais por gerar resultados zootécnicos adequados, tornando a pecuária mais produtiva e de ciclo curto.

Neste contexto, a adoção de tecnologias nos diferentes sistemas de produção nacional, pode reduzir os custos e proporcionar maior incremento produtivo de animais da raça Nelore. Atrelada a este fato, a utilização do melhoramento genético de características de importância econômica, também pode contribuir na mitigação dos custos com a alimentação, pois esta representa o componente mais dispendioso e relevante no processo de produção de bovinos de corte (Lowe et al., 2009; Arthur et al., 2014; Wei et al., 2022).

3.2 CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

O consumo alimentar de bovinos envolve complexo processo biológico, genético e de interações com o meio ambiente (Arthur e Herd, 2008). O termo eficiência pode ser compreendido como a razão da produção e o que foi necessário para produzir (Hall et al., 1995). De acordo com a afirmação, a alimentação representa fator de grande importância no sistema produtivo de bovinos de corte nacional, principalmente na terminação, fase em que os custos com alimentos têm grande impacto sobre o montante total da produção (Lopes, et al., 2011). Assim, a lucratividade é altamente dependente da quantidade de produto produzido para cada unidade de ração consumida (Nielsen et al., 2013).

Deste modo, para que animais eficientes sejam introduzidos no rebanho torna-se necessário a identificação destes por meio das medidas de eficiência alimentar. Posteriormente, a seleção genética associada às condições ambientais favorecerá os índices de eficiência alimentar (Herd et al., 2003). Essa característica é constituída de várias medidas, mas a identificação e seleção de animais eficientes continua sendo um desafio. Em bovinos de corte sabe-se que há variação individual na eficiência alimentar entre animais do mesmo sexo, raça, idade e submetidos a mesma intervenção nutricional, porém as causas dessa variação ainda não são bem compreendidas (Maddock et al., 2015; Oliveira et al., 2022; Brunes et al., 2022).

Neste contexto, a seleção para características de eficiência alimentar é de suma importância, uma vez que cerca de 65% a 70% da energia metabolizável necessária para a produção de carne é destinada para atender as exigências de manutenção de bovinos de corte (Ferrell e Jenkins, 1985; Magnabosco et al., 2020). Assim, a eficiência alimentar está diretamente relacionada com aumento da produção de carne por quantidade de alimento oferecido (Capper e Hayes, 2012; Gerber et al., 2013; Robinson et al., 2016). O aumento do consumo de matéria seca (CMS), acarreta maior emissão de metano entérico (CH₄), uma vez que o substrato estará disponível para fermentação no rúmen e consequentemente mais hidrogênio encontra-se livre para a metanogênese (Beauchemin et al., 2005; Grainger et al., 2007). A seleção de reprodutores eficientes, nesta perspectiva, reduz a demanda de alimento por indivíduo e pode reduzir a

produção/intensidade de emissão de gases do efeito estufa, como o CH₄ e demais resíduos oriundos do metabolismo das fezes (Basarab et al., 2003; Nkrumah et al., 2006; Herrero et al., 2013). A seleção para animais eficientes pode resultar em benefícios econômicos, produtivos e sustentáveis (Waghorn e Hegarty, 2011; Freetly e Brown-Brandl, 2013; Salleh et al., 2017). No entanto, não está claro na literatura, se as diferenças nas concentrações de CH₄ são devidas à variação na eficiência digestiva entre animais eficientes e não eficientes, ou, ao resultado do menor CMS associado a animais mais eficientes (Kelly et al., 2010; Lawrence et al., 2011; Sakamoto et al., 2021).

Alternativas para a seleção de animais eficientes, desse modo, são estudadas por meio de inúmeros índices, como a conversão alimentar (CA), eficiência alimentar bruta (EAB), ganho médio diário residual (GMDR), consumo ganho residual (CGR) e CAR (Gunsett, 1984; Koch et al., 1963; Berry, 2008; Berry e Crowley, 2012). Entretanto, o CAR tornou-se um dos fenótipos de eficiência alimentar mais estudado na raça Nelore (Cônsolo et al., 2021; Paz et al., 2022; Oliveira et al., 2022; Brunes et al., 2022). Esse fato se deve, principalmente, pela característica não estar diretamente correlacionada com a taxa de ganho e o peso vivo do animal, o que permite identificar animais com menores exigências de manutenção sem interferir no peso à idade adulta ou ganho de peso (Grion et al., 2014; Berry e Pryce, 2014).

O CAR (kg MS/dia) é definido como resíduo obtido da diferença do consumo alimentar observado e o predito, e pode ser calculado pela equação de regressão linear do consumo de matéria seca (CMS, kg/dia) em função do peso vivo metabólico (PVM, kg) e do ganho médio diário (GMD, kg/dia) (Koch et al., 1963). Em vista disso, o CAR torna-se independente (em termos fenotípicos) das variáveis ou características de regressão parcial incluídas no modelo de estimação. Além disso, os animais podem ser classificados como mais e menos eficientes, sendo que os mais eficientes apresentam consumo observado menor que o predito e são classificados com CAR negativo e o inverso ocorre com animais menos eficientes com CAR positivo (Basarab et al., 2003).

O CAR de touros jovens Nelore criados no Brasil ($\pm$ 540 dias de idade) possui herdabilidade moderada, com valores entre $0,21 \pm 0,06$ e $0,30 \pm 0,02$, o

que demonstra variabilidade genética na raça, porém, com maior influência da ação não aditiva e do ambiente na sua expressão (Ceacero et al., 2016; Polizel et al., 2018, Oliveira et al., 2022). Esses valores sugerem que diferentes modelos de análise para o CAR (Rolfe et al., 2011), bem como diferenças entre estruturas populacionais e padrões de mensuração dessa característica, contribuem para a obtenção de diferentes estimativas de herdabilidade.

Ademais, o CAR permite identificar animais que apresentam diferenças entre a exigência nutricional estimada e observada (Koch et al., 1963). Deste modo, a seleção de bovinos eficientes em sistemas intensivos resultará na diminuição do CMS sem comprometer o desempenho dos animais (Arthur et al., 2014; Oliveira et al., 2022). Além disso, no sistema extensivo foram obtidas melhoras na taxa de crescimento e conversão alimentar dos animais (Arthur et al., 2014). Portanto, o CAR se apresenta como critério de seleção, no intuito de melhorar a eficiência alimentar, reduzir em até 30% das emissões de CH₄ (Nkrumah et al., 2006) e até 20% da produção de resíduos oriundos do metabolismo fecal (Hegarty et al., 2007).

Os dados fenotípicos do CAR, entretanto são poucos, devido à dificuldade do registro do consumo individual, em razão dos custos com equipamentos e mão de obra especializada (Williams, 2010). Além disso, esta característica pode ser classificada como complexa, uma vez que é controlada por inúmeros processos biológicos, regulada por inúmeros genes e diferentes fatores ambientais (Capper e Hayes, 2012; Oliveira et al., 2014; Widmann et al., 2015; Tizioto et al., 2016; Wallace et al., 2017). Estes fatores dificultam a implementação do CAR como critério de seleção nos programas de melhoramento genético.

3.3 METABOLÔMICA ASSOCIADA À EFICIÊNCIA ALIMENTAR

As ciências ômicas fazem parte da biologia molecular, e compreende a genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e outras. Além disso, oferece uma visão holística dos processos que ocorrem em um sistema dinâmico (Smirnova et al., 2016). A metabolômica surgiu como estratégia analítica para o estudo do metaboloma de um dado sistema biológico (Fiehn et al., 2000).

A metabolômica pode ser estudada por técnicas avançadas de química analítica e possui capacidade de detectar e quantificar rapidamente dezenas, centenas ou milhares de metabólitos, moléculas de baixo peso molecular (até 1.500 daltons), envolvidos em distintas vias metabólicas em células, tecidos e biofluidos (Gondansaz et al., 2017; Kim et al., 2021). Além disso, vale ressaltar que os metabólitos são efetivamente os produtos finais de interações entre o genoma e o meio ambiente, o que possibilita descrever com maior precisão o fenótipo (Fontanesi, 2016). Os metabólitos são divididos em dois grupos, primários e secundários. Os que pertencem ao grupo primário são os metabólitos diretamente envolvidos nas rotas de síntese e degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (Dixon, 2001), e os secundários são mais comuns em plantas e fungos (Challis e Hopwood, 2003; Hall, 2006).

A metabolômica pode ser analisada por tecnologias de ressonância magnética nuclear (RMN) (Nicholson et al., 1983), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Tanaka, 1982) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (Vandergreef, 1986). A RMN é ferramenta eficaz na análise de composição molecular de uma amostra. Além disso, possui a capacidade de não destruir as amostras e não há necessidade de etapas de derivatização, o que caracteriza alta reprodutibilidade e resolução (Fontanesi, 2016; Serkova et al., 2019; Crook e Powers, 2020).

Como mencionado anteriormente, o consumo alimentar residual (CAR) é característica poligênica e pode ser influenciada por componentes metabólicos, fisiológicos, genéticos, moleculares e ambientais (Herd e Arthur, 2009). Desse modo, estudos em bovinos por meio de amostras de músculo, sangue, fígado, fluido ruminal e fezes investigaram o CAR por meio das diferentes ômicas, como: genômica (Oliveira et al., 2014; Widmann et al., 2015; Olivieri et al., 2016; Bingjie

et al., 2019; Duarte et al., 2019), transcriptômica (Paradis et al., 2015; Alexandre et al., 2015; Tizioto et al., 2015; Tizioto et al., 2016; Weber et al., 2016; Khansefid et al., 2017; Salleh et al., 2017; Zarek et al., 2017; Benedeti et al., 2018), proteômica (Montanholi et al., 2016; Jung et al., 2017) e metabolômica (Karisa et al., 2014; Shabat et al., 2016; Clemmons et al., 2017; Novais et al., 2019).

Na área da genômica, estudos de associação genômica ampla (GWAS) de animais da raça Nelore, relatam genes candidatos associados ao CAR, como por exemplo, os genes HRH4, ALDH7A1, APOA2, LIN7C, CXADR, ADAM12, MAP7, GOLIM4, RFX6, CACNG7, CACNG6, CAPN8, CAPN2, AKT2, GPRC6A e GPR45 (Oliveira et al., 2014; Olivieri et al., 2016). Os autores puderam observar genes associados ao CAR com funções biológicas relacionadas a processos metabólicos, metabolismo de lipídios/proteínas, utilização de energia, crescimento, transporte de íons, sistema olfativo/imunológico, secreção e atividades celulares.

A análise da expressão gênica pela transcriptômica também tem sido amplamente difundida, com diversos tipos de amostras, relacionando diferenças na expressão e redes de interação gênica a este fenótipo (Alexandre et al., 2015; Benedeti et al., 2018; Khansefid et al., 2017; Paradis et al., 2015; Salleh et al., 2017; Tizioto et al., 2015, 2016; Weber et al., 2016; Zarek et al., 2017). Estes estudos confirmaram a relação entre o CAR e processos relacionados ao metabolismo proteico e lipídico, com ênfase no metabolismo do colesterol e na resposta do sistema imunológico, confirmando a complementaridade entre dados genômicos e transcriptômicos. Por outro lado, a proteômica tem sido aplicada a passos lentos no estudo da eficiência alimentar em bovinos (Montanholi et al., 2016; Jung et al., 2017).

A metabolômica na produção animal também pode ser utilizada para investigar o metaboloma e suas relações com distintos fenótipos de importância para o melhoramento genético (Aliakbari et al., 2019). Em um experimento com bovinos da raça Angus, Clemmons et al. (2017) relataram quatro metabólitos sanguíneos (homocisteína, pantotenato, carnitina e glutamato) divergentes entre animais eficientes e não eficientes com funções importantes na utilização de nutrientes. Em experimentos com bovinos cruzados divergentes para CAR,

Karisa et al. (2014), descreveram dozes metabólitos sanguíneos (creatina, hipurato, carnitina, histidina, succinato, oxobutirato, 4-hidroxibutirato, prolina, alantoína, glutamina, uridina, trans-4-hidroxi-L-prolina) responsáveis por 98,5% da variação fenotípica do CAR. Portanto, estes metabólitos podem ser utilizados para desenvolver ferramenta de seleção baseada em biomarcadores. Shabat et al. (2016), analisaram o metaboloma ruminal em vacas da raça Holandesa distintas para eficiência alimentar e emissão de metano, e propuseram que, animais com menor riqueza e diversidade no microbioma, são menos complexos e resultam na produção de metabólitos relevantes para as necessidades energéticas do animal. Novais et al. (2019) encontraram assinatura molecular para o CAR com base na metabolômica não-direcionada, sendo que essa assinatura indicou a via do metabolismo da vitamina A como uma via importante para a eficiência alimentar.

Além disso, o metaboloma fecal também tem sido utilizado na associação com o metaboloma ruminal de bovinos da raça Nelore (Malheiros et al., 2021). No entanto, dentre as bioamostras utilizadas, são poucos os estudos sobre metabólitos fecais em bovinos, mesmo sendo evidente que é mais fácil acessar amostras fecais durante as rotinas de produção animal (Zhu et al., 2019; Valerio et al., 2020; Malheiros et al., 2021). Neste contexto, informações referentes à metabolômica não são totalmente elucidados e necessitam ser esclarecidas na raça Nelore, com o intuito de fornecer informações biológicas cruciais sobre as complexas interações dos fenótipos CAR e o perfil metabolômico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCZ. Associação brasileira dos criadores de zebuínos (2022) **ABCZ: História**. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/>>

ABIEC. Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne (2021) **Beef Report**. Disponível em: <<http://Abiec.Com.Br/Publicacoes/Beef-Report-2021/>>

Alexandre PA, Kogelman LJA, Santana MHA, Passarelli D, Pulz LH, Fantinato-Neto P, Silva SL, Leme PR, Strefezzi RF, Coutinho LL, Ferraz JBS, Eler JP, Kadarmideen, HN, Fukumasu H (2015) Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics** 16:1073.

Aliakbari A, Ehsani A, Vaez Torshizi R, Lovendahl P, Esfandyari H, Jensen J, Sarup P (2019) Genetic variance of metabolomic features and their relationship with body weight and body weight gain in Holstein cattle. **Journal of Animal Science** 97:3832–3844.

Araújo JP, Cerqueira J, Vaz OS, Andrade LP, Rodrigues JPV, Rodrigues AM (2014) Extensive beef cattle production in Portugal. In: **Proceedings of International Worskshop “New Updates in Animal Nutrition, Natural Feeding Sources and Environmental Sustainability”** 14:31-34.

Arthur JPF, Herd RM (2008) Residual feed intake in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37:269-279.

Arthur PF, Pryce JE, Herd RM (2014) Lessons learnt from 25 years of feed efficiency research in Australia. In: **Proceedings of World Congress on Genetics Applied to Livestock Production Proceeding** 14:18-22.

Basarab JA, Price MA, Aalhus JL, Okine EK, Snelling WM, Lyle KL (2003) Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science** 83:189-204.

Beauchemin KA, Mcginn SM (2005) Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science** 83:653-661.

Benedeti PDB, Detmann E, Mantovani HC, Bonilha SFM, Serao NVL, Lopes DRG, Silva W, Newbold CJ, Duarte MS (2018) Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) with high residual feed intake have increased the expression of genes involved in oxidative phosphorylation in rumen epithelium. **Animal Feed Science and Technology** 235:77-86.

Berry DP (2008) Improving feed efficiency in cattle with residual feed intake. **Recent Advances in Animal Nutrition** 67–99.

Berry DP, Crowley JJ (2012) Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science** 90:109-115.

Berry DP, Pryce JE (2014) Feed efficiency in growing and mature animals. In: **Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production** 14:1-6.

Brunes LC, Faria CU, Magnabosco CU, Lobo RB, Peripolli E, Aguilar I, Baldi F (2023) Genomic prediction ability and genetic parameters for residual feed intake calculated using different approaches and their associations with growth, reproductive, and carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Applied Genetics** 64:159-167.

Cabral LS, Toledo CLB, Rodrigues DN, Lima LR, Cabral WB, Neto IMS, Galati RL, Andrade KM., Ceni I, Carvalho LB, Alves AO (2011). Oportunidades e entraves para a pecuária de corte brasileira. In: **Simpósio de Bovinos** 11:1-57.

Capper JL, Hayes DJ (2012) The environmental and economic impact of removing growth-enhancing technologies from U.S. beef production. **Journal of Animal Science** 90:3527–3537.

Carvalho ME, Gasparin G, Poleti MD, Rosa AF, Balieiro JC, Labate CA, Nassu RT, Tullio RR, Regitano LC, Mourão GB, Coutinho L (2014) Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science** 96:1318–1324.

Ceacero TM, Mercadante MEZ, Cyrillo JN, Canesin RC, Bonilha SF, Albuquerque LG (2016). Phenotypic and genetic correlations of feed efficiency traits with growth and carcass traits in Nellore cattle selected for postweaning weight. **Plos One** 11: e0161366.

Challis GL, Hopwood DA (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100:14555-14561.

Clemmons BA, Mihelic RI, Beckford RC, Powers JB, Melchior EA, Mcfarlane ZD, Cope ER, Embree MM, Mulliniks JT, Campagna SR, Voy BH, Myer PR (2017) Serum metabolites associated with feed efficiency in black angus steers. **Metabolomics** 13:1-8.

Cônsolo NR, Buarque VL, Silva JM, Poleti MD, Barbosa LC, Higuera-Padilla AR, Gómez J, Colnago LA, Gerrard DE, Saran NA, Silva SL (2021) Muscle and liver metabolomic signatures associated with residual feed intake in Nellore cattle. **Animal Feed Science and Technology** 271:114757.

Cônsolo NR, Gardinal R, Gandra JR, Freitas Junior JE, Rennó FP, Santana, MH, Pflanzner Junior SB, Pereira AS (2015) High levels of whole raw soybean in diets for Nellore bulls in feedlot: effect on growth performance, carcass traits and meat quality. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 99:201-209.

Crook AA, Powers R (2020) Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. **Molecules** 25:5128.

Damiran D, Penner GB, Larson K, Lardner HA (2018) Use of residual feed intake as a selection criterion on the performance and relative development costs of replacement beef heifers. **The Professional Animal Scientist** 34:156-166.

Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. **Nature** 411:843-847.

Duarte DAS, Newbold CJ, Detmann E, Silva FF Freitas PHF, Veroneze R, Duarte MS (2019) Genome-wide association studies pathway-based meta-analysis for residual feed intake in beef cattle. **Animal Genetics** 50:150-153.

Ferraz JB, Felício PE (2010) Production systems: an example from Brazil. **Meat Science** 84:238–243.

Ferrel CL, Jenkins TG (1984) Energy utilization by mature, nonpregnant, nonlactating cows of different types. **Journal of Animal Science** 58:234-243.

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology** 18:1157-1161.

Fontanesi L (2016) Metabolomics and livestock genomics: Insights into a phenotyping frontier and its applications in animal breeding. **Animal Frontiers** 6:73-79.

Forbes JM (2007) A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. **Nutrition Research Reviews** 20:132–146.

Freetly HC, Brown- Brandl TM (2013) Enteric methane production from beef cattle that vary in feed efficiency. **Journal of Animal Science** 91:4826-4831.

Gerber PJ, Hristov AN, Henderson B, Makkar H, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, Firkins J, Rotz A, Dell C, Adesogan AT, Yang WZ, Tricarico JM, Kebreab E, Waghorn G, Dijkstra J, Oostin S (2013) Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. **Animal** 7:220–234.

Goldansaz AS, Guo AC, Sajed T, Steele MA, Plastow GS, Wishart DS (2017) Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. **Plos One** 12:e0177675.

Grainger C, Clarke T, McGinn SM, Auldish MJ, Beauchemin KA, Hannah MC, Waghorn GC, Clark H, Eckard RJ (2007) Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer and chamber techniques. **Journal of Dairy Science** 90:2755-2766.

Grion AL, Mercadante MEZ, Cyrillo JNSG, Bonilha SMF, Magnani E, Branco RH (2014) Selection for feed efficiency traits and correlated genetic responses in feed intake and weight gain of Nellore cattle. **Journal of Animal Science** 32:955-965.

Gunsett FC (1984) Linear index selection to improve traits defined as ratios. **Journal of Animal Science** 59:1185-1193.

Hall JB, Staigmiller RB, Bellows RA, Short RE, Moseley WM, Bellows SE (1995) Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science** 73:3409-3420.

Hall RD (2006) Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist** 169:453-468.

Hegarty RS, Goopy JP, Herd RM, McCorkell B (2007) Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science** 85:1479-1486.

Herd RM, Archer JA, Arthur PF (2003). Reducing the cost of beef production through genetic improvement in residual feed intake: opportunity and challenges to application. **Journal of Animal Science** 81:9-17.

Herd RM, Arthur PF (2009) Physiological basis for residual feed intake. **Journal of Animal Science** 87:64-71.

Herrero M, Havlík P, Valin H, Notenbaert A, Rufino MC, Thornton PK, Blümmel M, Weiss F, Grace D, Obersteiner M (2013). Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110: 20888-20893.

Jung US, Kim MJ, Wang T, Lee JS, Jeon SW, Jo NC, Kim WS, Baik M, Lee HG (2017) Upregulated heat shock protein beta-1 associated with caloric restriction and high feed efficiency in longissimus dorsi muscle of steer. **Livestock Science** 202:109:114.

Karisa BK, Thomson J, Wang Z, Li C, Montanholi YR, Miller SP, Moore SS, Plastow GS (2014) Plasma metabolites associated with residual feed intake and other productivity performance traits in beef cattle. **Livestock Science** 165:200-211.

Kelly AK, Mcgee M, Crews DHJR, Fahey AG, Wylie AR, Kenny DA (2010). Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. **Journal of Animal Science** 88:109-123.

Khansefid M, Millen CA, Chen Y, Pryce JE, Chamberlain AJ, Jagt CJV, Gondro C, Goddard ME (2017) Gene expression analysis of blood, liver, and muscle in cattle divergently selected for high and low residual feed intake. **Journal of Animal Science** 95:4764-4775.

Kim HS, Kim ET, Eom JS, Choi YY, Lee SJ, Lee SS, Chung CD, Lee SS (2021) Exploration of metabolite profiles in the biofluids of dairy cows by proton nuclear magnetic resonance analysis. **Plos One** 16:e0246290.

Koch RM, Swiger LA, Chambers D, Gregory KE (1963) Efficiency of feed use in beef cattle, **Journal of Animal Science** 22:486-494.

Lawrence P, Kenny DA, Earley B, Crews DHJR, Mcgee M (2011) Grass silage intake, rumen and blood variables, ultrasonic and body measurements, feeding behavior, and activity in pregnant beef heifers differing in phenotypic residual feed intake. **Journal of Animal Science** 89:3248-3261.

Li B, Fang L, Null DJ, Hutchison JL, Connor EE, VanRaden PM, VandeHaar MJ, Tempelman RJ, Weigel KA, Cole JB (2019) High-density genome-wide association study for residual feed intake in Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 102:11067-11080.

Lopes DRG, La Reau AJ, Duarte MS, Detmann E, Bento CBP, Mercadante, MEZ, Bonilha SFM, Suen G, Mantovani HC (2019) The bacterial and fungal microbiota of nelore steers is dynamic across the gastrointestinal tract and its fecal-associated microbiota is correlated to feed efficiency. **Frontiers in Microbiology** 10:1263.

Lopes DRG, Souza DM, La Reau AJ, Chaves IZ, Oliveira MTA, Detmann E, Bento CBP, Mercadante MEZ, Bonilha SFM, Suen G, Mantovani HC (2021). Assessing the relationship between the rumen microbiota and feed efficiency in Nelore steers. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 12:1-17.

Lopes LS, Ladeira MM, Machado Neto OR, Silveira ARMC, Reis RP, Campos, FR (2011) Viabilidade econômica da terminação de novilhos Nelore e Red Norte em confinamento na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia** 35:774-780.

Lowe M, Gereffi G, Ayee G, Denniston R, Fernandez-Stark K, Kim J, Sang N (2009) Value chain analysis of the US beef and dairy industries. **Center on Globalization, Governance e Competitiveness** 9:1-55.

Maddock TD, Henry DD, Lamb GC (2015) The economic impact of feed efficiency in beef cattle. **University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences** 8:1.

Magnabosco CU, Rey FSB, Lopes FB, Soares BB, Pereira LS, Carvalho RA, Costa MFO, Eifert EC, Brunes LC (2020) Ferramentas genéticas e genômicas na avaliação da eficiência alimentar de bovinos de corte. **Embrapa Cerrados** 1:60.

Malheiros JM, Correia BSB, Ceribeli C, Cardoso DR, Colnago LA, AJunior SB, Reecy JM, Mourão GB, Coutinho LL, Palhares JC P, Berndt A, Regitano LC

(2021) Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (*Bos indicus*). **Scientific Reports** 11:12752.

Metawi H, Kandil H, Shaer HE (1999) Sheep productivity under extensive and semi-intensive production systems in Egypt. In: **Proceedings International Symposium on Systems of Sheep and Goat Production** 38:239-243.

Millen DD, Pacheco RDL, Arrigoni MDB, Galyean ML, Vasconcelos JT (2009) A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science** 87:3427-3439.

Montanholi YR, Fontoura AB, Amorim MD, Foster RA, Chenier T, Miller SP (2016) Seminal plasma protein concentrations vary with feed efficiency and fertility-related measures in young beef bulls. **Reproductive Biology** 16: 147-156.

Moraes GF, Abreu LRA, Toral FLB, Ferreira IC, Ventura HT, Bergmann JAG, Pereira IG (2019) Selection for feed efficiency does not change the selection for growth and carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 136:464-473.

Nicholson JK, Buckingham MJ, Sadler PJ (1983) High resolution ¹H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. **The Biochemical Journal** 211:605-615.

Nielsen MK, MacNeil MD, Dekkers JCM, Crews JHD Rathje TA, Enns RM, Weaber RL (2013) Review: life-cycle, total industry genetic improvement of feed efficiency in beef cattle: blueprint for beef improvement federation. **The Professional Animal Scientist** 29:559-565.

Nkrumah JD, Okine EK, Mathison GW, Schmid K, Li C, Basarab JA, Price MA, Wang Z, Moore SS (2006) Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 84:145-153.

Novais FJ, Pires PRL, Alexandre PA, Dromms RA, Iglesias AH, Ferraz JBS, Styczynski MP, Fukumasu H (2019) Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics** 20:8.

Oliveira MHV, Malheiros JM, Ospina AMT, Dominguez-Castaño P, Benfica LF, Correia LECS, Gaya LG, Mercadante MEZ, Castilhos AM, Cyrillo JNSG, Sartori JB, Albuquerque LG, Silva JAIIV (2022) Analysis of residual feed intake in Nellore bulls of different ages, rib eye area, and backfat thickness. **Tropical Animal Health and Production** 54:295.

Oliveira PSN, Cesar ASM, Nascimento ML, Chaves AS, Tizioto PC, Tullio RR; Lanna DPD, Rosa AN, Sonstegard TS, Mourao GB, Reecy JM, Garrick DJ, Mudadu MA, Coutinho LL, Regitano LCA (2014) Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. **BMC Genetics** 15:100.

Olivieri BF, Mercadante ME, Cyrillo JN, Branco RH, Bonilha SF, Albuquerque LG, Silva RM, Baldi F (2016) Genomic regions associated with feed efficiency indicator traits in an experimental nellore cattle population. **Plos One** 11:e0164390.

Paradis F, Yue S, Grant JR, Stothard P, Basarab JA, Fitzsimmons C (2015) Transcriptomic analysis by RNA sequencing reveals that hepatic interferon-induced genes may be associated with feed efficiency in beef heifers. **Journal of Animal Science** 93:3331-3341.

Paz ACAR, Ladeira MM, Teixeira PD, Canesin RC, Batalha CDA, Mercadante MEZ, Bonilha SFM (2022) Performance and muscle lipogenesis of calves born to Nellore cows with different residual feed intake classification. **Plos One** 17:e0272236.

Polizel GHG, Grigoletto L, Carvalho ME, Junior PR Ferraz JBS, MHA Santana. (2018) Genetic correlations and heritability estimates for dry matter intake, weight gain and feed efficiency of nellore cattle in feedlot. **Livestock Science** 214:209-210.

Pszczola M, Strabel T, Mucha S, Sell-Kubiak E (2018) Genome-wide association identifies methane production level relation to genetic control of digestive tract development in dairy cows. **Scientific Reports** 8: 15164.

Restle J, Vaz FN (1999) Confinamento de bovinos definidos e cruzados. **Editora Universitária da PUCRS** 141-168.

Robinson DL, Cameron M, Donaldson AJ, Dominik S, Oddy VH (2016) One-hour portable chamber methane measurements are repeatable and provide useful information on feed intake and efficiency. **Journal of Animal Science** 94 4376-4387.

Rolfe KM, Snelling WM, Nielsen MK, Freetly HC, Ferrell CL, Jenkins TG (2011) Genetic and phenotypic parameter estimates for feed intake and other traits in growing beef cattle, and opportunities for selection. **Journal of Animal Science** 89:3452-3459.

Sakamoto LS, Souza LL, Gianvecchio SB, Oliveira MHV, Silva JAIIV, Canesin RC, Branco RH, Baccan M, Berndt A, Albuquerque LG, Mercadante MEZ (2021) Phenotypic association among performance, feed efficiency and methane emission traits in Nellore cattle. **Plos One** 16: e0257964.

Salleh MS, Mazzoni G, Höglund JK, Olijhoek DW, Lund P, Lovendahl P, Kadarmideen HN (2017) Rna-seq transcriptomics and pathway analyses reveal potential regulatory genes and molecular mechanisms in high- and low-residual feed intake in nordic dairy cattle. **BMC Genomics** 18: 258-275.

Sartorello GL, Bastos JPST, Gameiro AH (2018) Development of a calculation model and production cost index for feedlot beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia** 47:e20170215.

Serkova NJ, Davis DM, Steiner J, Agarwal R (2019) Quantitative nmr-based metabolomics on tissue biomarkers and its translation into in vivo magnetic resonance spectroscopy. **High-Throughput Metabolomics: Methods and Protocols** 369-387.

Shabat SK, Sasson G, Doron-Faigenboim A, Durman T, Yaacoby S, Miller MEB, White BA, Shterzer N, Mizrahi I (2016) Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal** 10:2958-2972.

Sidney T, Taiwo G, Idowu M, Amusan I, Pech Cervantes A, Ogunade I (2023) Rumen fluid amine/phenol-metabolome of beef steers with divergent residual feed intake phenotype. **Ruminants** 3:1-8.

Silva JAIIV, Marcelo ET, Ribeiro CB, Maiorano AM, Curi RA, Oliveira HN, Mota MDS (2012) Análise genética de características de crescimento e perímetro escrotal em bovinos da raça Brangus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47:1166-1173.

Smirnov KS, Maier TV, Walker A, Heinzmann, SS, Forcisi S, Martinez I, Walter J, Schmitt-Kopplin P (2016) Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. **International Journal of Medical Microbiology** 306: 266-279.

Tanaka K, Hine DG (1982) Compilation of gas chromatographic retention indices of 163 metabolically important organic acids, and their use in detection of patients with organic acidurias. **Journal of Chromatography** 239:301-322.

Tizioto PC, Coutinho LL, Decker JE, Schnabel RD, Rosa KO, Oliveira PSN, Souza MM, Mourão GB, Tullio RR, Chaves AS, Lanna DPD, Zerlotini-Neto A, Mudadu MA, Taylor JF, Regitano LCA (2015) Global liver gene expression differences in nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. **BMC Genomics** 16:1-14.

Tizioto PC, Coutinho LL, Oliveira OS, Cesar AS, Diniz WJ, Lima AO, Rocha, MI, Decker JE, Schnabel RD, Mourão GB, Tullio RR, Zerlotini A, Taylor JF, Regitano LC (2016) Gene expression differences in Longissimus muscle of Nelore steers genetically divergent for residual feed intake. **Scientific Reports** 6:39493.

Uyeh DD, Mallipeddi R, Pamulapati T, Park T, Kim J, Woo S, Ha Y (2018) Interactive livestock feed ration optimization using evolutionary algorithms. **Computers and Electronics in Agriculture** 155:1-11.

USDA (2022) Livestock and Poultry: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service 1:16.

Valerio A, Casadei L, Giuliani A, Valerio M (2020) Fecal metabolomics as a novel noninvasive method for short-term stress monitoring in beef cattle. **Journal of Proteome Research** 19:845-853.

Vandergreef J (1986) Field desorption mass spectrometry in bioanalysis. **Trends in Analytical Chemistry** 5:241-246.

Vargas G, Schenkel FS, Brito LF, Neves HHR, Munari DP, Boligon AA, Carneiro R (2018) Unravelling biological biotypes for growth, visual score and reproductive traits in nelore cattle via principal component analysis. **Livestock Science** 217:37-43.

Waghorn GC, Hegarty RS (2011) Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. **Animal Feed Science and Technology** 166:291-301.

Wallace RJ, Snelling TJ, McCartney CA, Tapio I, Strozzi F (2017) Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. **Genetics Selection Evolution** 49:1-11.

Waterhouse A (1996) Animal welfare and sustainability of production under extensive conditions - a european perspective. **Applied Animal Behaviour Science** 49: 29-40.

Weber KL, Well BT, Van Eenennaam AL, Young AE, Porto-Neto LR, Reverter A, Rincon, G (2016) Identification of gene networks for residual feed intake in angus cattle using genomic prediction and rna-seq. **Plos One** 11: e0152274.

Widmann P, Reverter A, Weikard R, Suhre K, Hammon HM, Albrecht E, Kuehn C (2015) Systems biology analysis merging phenotype, metabolomic and genomic data identifies Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (NCAPG) and cellular maintenance processes as major contributors to genetic variability in bovine feed efficiency. **Plos One** 10: e0124574.

Williams CB (2010) Application of biological simulation models in estimating feed efficiency of finishing steers. **Journal of Animal Science** 8:2523–2529.

Wei M, Hui Z, Ma J, Khan N, Cao J, Hu X (2022) Research on technical efficiency of feed use for sustainable beef cattle breeding in China: evidence from 169 beef cattle farmers. **Sustainability** 14:16430.

Zarek CM, Lindholm-Perry AK, Kuehn LA, Freetly HC (2017) Differential expression of genes related to gain and intake in the liver of beef cattle. **BMC Research Notes** 10:1.

Zhu C, Li C, Wang Y, Laghi L (2019) Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolites** 9:41.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DO METABOLOMA FECAL DE BOVINOS NELORE NO PRÉ E PÓS-CONFINAMENTO

Resumo - A alimentação tem um papel fundamental nos sistemas de produção, representando uma parcela significativa de 60% a 80% dos custos totais, o que exerce influência direta sobre a lucratividade do sistema. O objetivo deste estudo foi identificar e quantificar os metabólitos fecais de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) que apresentaram diferenças no pré e pós-confinamento. Durante a fase de pré-confinamento, um grupo de 21 bovinos Nelore foi submetido a uma dieta rica em carboidratos fibrosos por 15 dias. Posteriormente, esses animais foram alimentados com uma dieta rica em carboidratos não-fibrosos durante 77 dias, até o término do período de confinamento. Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada bovino ao final das fases pré e pós-confinamento. Os metabólitos fecais foram extraídos e seus espectros foram obtidos por meio da análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN). Durante o pré e pós-confinamento, foram identificados 57 e 55 metabólitos, respectivamente. Oito metabólitos foram encontrados exclusivamente na fase de pré-confinamento (2-fenilpropionato, caprilato, fumarato, desaminotirosina, gama-glutamil fenilalanina, NADH, timidina, pantotenato), enquanto sete metabólitos estavam presentes apenas na fase de pós-confinamento (acetamida, 2-oxoglutarato, uracila, xantina, trimetilamina, dimetil sulfonas). Os metabólitos identificados forneceram informações sobre as principais vias metabólicas, incluindo a síntese e a degradação de corpos cetônicos, biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, metabolismo de glicina, serina e treonina, metabolismo do piruvato e metabolismo da histidina. Esses resultados sugerem que o aumento da densidade energética e proteica da dieta teve um impacto significativo nas concentrações de metabólitos fecais em bovinos Nelore. As alterações observadas indicam que a composição da dieta desempenha um papel crucial na composição e concentração do metaboloma fecal.

Palavras-chave: biomarcadores, *Bos taurus indicus*, carboidratos fibrosos, carboidratos não-fibrosos, metabólitos

CHAPTER 2 - ANALYSIS OF THE PRE AND POST CONFINEMENT FECAL METABOLOME OF NELORE CATTLE

Abstract - Feeding plays a crucial role in production systems, representing a considerable portion of 60% to 80% of total costs and exerting a direct influence on system profitability. The objective of this study was to identify and quantify fecal metabolites of Nelore cattle (*Bos taurus indicus*) that showed differences in the pre- and post-confinement phases. During the pre-confinement phase, a group of 21 Nelore cattle was subjected to a high-fiber carbohydrate diet for 15 days. Subsequently, these animals were fed a high-non-fiber carbohydrate diet for 77 days until the end of the confinement period. Fecal samples were collected directly from the rectal ampulla of each bovine at the end of the pre- and post-confinement phases. Fecal metabolites were extracted, and their spectra were obtained through Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) analysis. A total of 57 and 55 metabolites were identified during the pre- and post-confinement phases, respectively. Eight metabolites were found exclusively in the pre-confinement phase (2-phenylpropionate, caprylate, fumarate, desaminotyrosine, gamma-glutamylphenylalanine, NADH, thymidine, pantothenate), while seven compounds were present only in the post-confinement phase (acetamide, 2-oxoglutarate, uracil, xanthine, trimethylamine, dimethyl sulfones). The identified metabolites provided information about key metabolic pathways, including synthesis and degradation of ketone bodies, biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, glycine, serine, and threonine metabolism, pyruvate metabolism, and histidine metabolism. These results suggest that the increase in energy and protein density of the diet had a significant impact on fecal metabolite concentrations in Nelore cattle. The observed changes indicate that diet composition plays a crucial role in the composition and concentration of the fecal metabolome.

Keywords: biomarkers, *Bos taurus indicus*, fibrous carbohydrates, metabolites, non-fibrous carbohydrates.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do confinamento no Brasil tem aumentado nos últimos anos, visto que o número de animais confinados em 2017 foi de 5,25 milhões de cabeças, e em 2021 ocorreu um acréscimo para 6,70 milhões de cabeças (ABIEC, 2022). A intensificação dos confinamentos tem sido considerada uma alternativa promissora, pois pode ocasionar um melhor desempenho dos animais, possibilitar o abate dos animais mais jovens e suprir tanto a demanda interna quanto à externa do mercado de carne (Millen et al., 2009).

No confinamento, a alimentação pode representar 60-80% dos custos totais de produção e impactar diretamente na lucratividade do sistema (Uyeh et al., 2018). Portanto, compreender a relação entre o alimento ofertado e o trato gastrointestinal, em destaque para o rúmen, e implementar manejo nutricional adequado são fatores decisivos para aumentar a eficiência dos sistemas de terminação de bovinos de corte (Saviotto et al., 2014). Isso permite a construção de estratégias nutricionais que contribuem para intensificar a produção da carne bovina.

O rúmen possui ecossistema microbiano dinâmico, e a relação simbiótica entre o hospedeiro e a microbiota desempenha papel importante na digestão e absorção dos nutrientes (Hobson et al., 2012; Artegoitia et al., 2017). A fermentação ruminal realizada pela biodiversidade microbiana resulta na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), gases (dióxido de carbono e metano), amônia e proteínas microbianas (Janssen, 2010). De acordo com a intervenção nutricional, os AGVs podem constituir a maior fonte de energia (65-70%) necessária para o hospedeiro (Bannink et al., 2008). No entanto, a produção de dióxido de carbono e metano acarreta perdas de energia dos alimentos. Portanto, a adoção de estratégias de alimentação baseadas em princípios tecnológicos pode possibilitar o aumento da eficiência de utilização do alimento por unidade de produto produzida, além de contribuir para a sustentabilidade.

No Brasil, durante o pré-confinamento, geralmente os bovinos são alimentados com dietas ricas em volumosos, as quais são compostas por carboidratos fibrosos, como celulose e hemicelulose (Kozloski, 2011). Essa

alimentação promove aumento na proporção de acetato em relação ao propionato e butirato no rúmen (Van Soest,1994). No entanto, no confinamento ocorre a substituição de carboidratos fibrosos por carboidratos não-fibrosos, como amido e açúcares. Essa mudança na dieta altera a produção de AGVs e promove aumento na proporção de propionato em relação ao acetato e butirato (Van Soest,1994). Desse modo, dietas com diferentes proporções de carboidratos fibrosos e não fibrosos podem alterar o ambiente ruminal.

Estudos recentes indicaram que a microbiota e os metabólitos ruminais estão parcialmente representados na microbiota e metaboloma fecal (Andrade et al., 2020; Malheiros et al., 2021). Dessa forma, a metabolômica fecal pode auxiliar na compreensão dos mecanismos subjacentes ao rúmen, e contribuir no entendimento dos compostos oriundos da fermentação ruminal em diferentes regimes alimentares (Wallace et al., 2017). Além disto, torna-se mais viável a obtenção de amostras fecais em comparação com as ruminais nos procedimentos de rotina na produção animal. Portanto, a identificação de possíveis vias metabólicas e biomarcadores potenciais nas fezes bovinas apresentariam significativos potenciais para aplicações práticas. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo identificar e quantificar os metabólitos fecais de bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) que diferiram entre o pré e pós-confinamento, a fim de compreender como a alimentação afeta o metaboloma fecal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes de bem-estar animal e abate humanitário, conforme a Lei Estadual nº 11.977 do Estado de São Paulo, Brasil.

2.1 ANIMAIS E COLETA DE DADOS

Foram utilizados 21 animais da raça Nelore oriundos de 6 propriedades com níveis tecnológicos equivalentes e situadas nos Estados do Mato Grosso (4 propriedades e 14 animais) e Goiás (2 propriedades e 7 animais). As fazendas são participantes do Programa de Melhoramento Genético Nelore Qualitas®, que

utiliza índice de seleção empírico, com as seguintes ponderações: 20% da diferença esperada na progênie (DEP) para peso à desmama direto, 40% da DEP para ganho de peso pós-desmama, 20% da DEP para perímetro escrotal e 20% da DEP para musculosidade.

Os animais foram alojados no Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA), localizado na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu - SP, em sistema de baia coletivas. Durante o período de pré-confinamento, os animais passaram 15 dias se adaptando às instalações, aos outros animais e ao início do confinamento. Nesse momento, apresentavam um peso vivo médio inicial de $534,47 \pm 34,23$ kg e uma idade média de $666,09 \pm 68,35$ dias. Já no período de confinamento, os animais foram mantidos por 77 dias, também em sistema de baias coletivas, com um peso vivo médio inicial de $546,05 \pm 41,23$ kg e uma idade média de $681,09 \pm 48,37$ dias.

As dietas no pré-confinamento e no confinamento foram formuladas no programa *Large Ruminant Nutrition System v.1.0.3.3* (LRNS) e fornecidas de acordo com o protocolo “step by step” na forma de ração total misturada (Tabela 1). A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia, às 08:00 e às 16:00h, com ganho médio diário estimado em 0,60 kg/dia, no pré-confinamento e, em 1,70 kg/dia durante o confinamento. Além disso, o acesso à dieta e água foram *ad libitum*. No final do período pré-confinamento quanto após o confinamento, foram coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de cada bovino. Estas amostras foram imersas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em um freezer a -80 °C, para serem utilizadas nos ensaios de metabolômica.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes e nutrientes da dieta utilizada no pré e pós-confinamento.

Ingredientes	Pré		Pós	
	%MS	%MO	%MS	%MO
Silagem de milho	79,22	82,09	32,30	49,49
Bagaço de cana	20,78	17,91	4,90	4,95
Milho grão úmido	-	-	51,21	38,67
Farelo de amendoim	-	-	8,92	5,43
Ureia	-	-	0,89	0,49
Premix ¹	-	-	1,78	0,98
Nutrientes ²	Pré		Pós	
Matéria seca, %	49,40		60,00	
Proteína bruta, %	8,74		15,60	
Nutrientes digestíveis totais, %	76,00		77,00	
Energia metabolizável, Mcal/kg MS	1,56		2,77	
Energia líquida de manutenção, Mcal/kg MS	1,52		1,84	
Energia líquida de ganho, Mcal/kg MS	0,92		1,20	
Fibra detergente neutro, %	45,80		26,90	
Carboidratos não fibrosos, %	42,00		54,00	
Extrato etéreo, %	2,19		3,20	
Cálcio, %	0,50		0,60	
Fósforo, %	0,18		0,38	

%MS, porcentagem de matéria seca; %MO, porcentagem de matéria orgânica

¹Composição do premix (kg do produto) 170g Ca, 20g P, 26g Mg, 120g Na, 30g S, 16mg Co, 834mg Cu, 40mg I, 1530mg Mn, 8mg Se, 2276mg Zn, 83333UI Vitamina A, 10.333UI Vitamina D, 266UI Vitamina E, 1.000mg Monensina.

²Valores calculados pelo BCNRM (*Nutrient Requirements of Beef Cattle*) 2016.

2.2 METABOLÔMICA

2.2.1 Extração dos metabólitos

Para extração dos metabólitos, aproximadamente 300 mg de cada uma das amostras de fezes colhidas após o pré e pós-confinamento, foram homogeneizadas com tampão de fosfato de sódio em óxido de deutério (0,10 M, pH 7,4) contendo 0,050% de 3-trimetilsilil-2,2,3,3-d₄-propionato de sódio de padrão químico de deslocamento interno (TMSP-d₄, SigmaAldrich). As amostras homogeneizadas foram agitadas por 60 segundos, centrifugadas a 13.000 × g (10 min a 4 °C). O volume de 450 µL de sobrenadante foi adicionado em tubo de RMN de 5 mm juntamente com 150 µL de óxido de deutério (Malheiros et al., 2021).

2.2.2 Aquisição dos espectros por ^1H RMN

Os espectros por ^1H RMN foram obtidos a 298 K em espectrômetro de 14 T Bruker Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha) equipado com sonda PABBO de 5 mm. Primeiramente, o protocolo foi estabelecido para as amostras de controle de qualidade (CQ) constituída por um *pool* de alíquotas dos extratos metabólicos de fezes (pulso de 90° calibrado e irradiação na frequência da água), e então este protocolo foi realizado em modo automático usando a rotina Bruker por interface ICON-NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

Os espectros foram adquiridos para próton RMN utilizando pulso de 90° (sequência zg), 64 K data points, com largura espectral de 20,0276 ppm e tempo de aquisição d1 de 2,726 s. Foram adquiridos ganho de 225, atraso de reciclagem de 1 seg (*delay*), varredura de 0 (*scans*) e acúmulo de ns = 16 *transients*. A supressão da água foi obtida pela sequência de pulsos denominada 1D NOESY (Bruker 1D noesygppr1d), utilizando os mesmos dados. Os FIDs foram multiplicados por função de multiplicação exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de Fourier, somente uma correção de fase de ordem zero foi permitida, e o sinal de TMSP-d4 foi calibrado em $\delta = 0,00$ ppm por meio do software Topspin Versão 3.6 para análise de RMN (Bruker Inc., Karlsruhe, Alemanha). Os experimentos de RMN bidimensional com as aquisições J-resolved (JRES) RMN, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^1H COSY foram realizados em quatro amostras aleatórias, sendo duas de cada grupo.

2.2.3 Identificação e quantificação dos metabólitos

Os espectros obtidos por meio do ^1H RMN de cada animal no pré e pós-confinamento foram analisados. Os metabólitos foram identificados e quantificados por meio do *software* Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx, Edmonton, Canada). A RMN bidimensional foi utilizada para confirmar os metabólitos presentes nas amostras. Metabólitos que não foram identificados nessa etapa foram removidos das análises seguintes. Os metabólitos identificados foram definidos com base no banco de dados público *Bovine Metabolome Database* (BMDB, <https://bovinedb.ca>).

2.2.4 Processamento de dados

Os dados foram analisados na plataforma *MetaboAnalyst 5.0* (<http://www.metaboanalyst.ca>), por meio de análise de componentes principais (PCA), análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) e importância variável na projeção (VIP, do inglês, *Variable importance in the projection*), conforme método proposto por Xia et al. (2009) e Xia et al. (2011). Os metabólitos foram analisados pelo procedimento MIXED disponível no programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA, 2011). A análise das vias metabólicas foi realizada no banco de dados depositado da espécie *Bos taurus taurus*. A identificação e a visualização das vias metabólicas foram realizadas no *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.genome.jp/kegg>).

3. RESULTADOS

No pré-confinamento 57 metabólitos foram identificados e quantificados, sendo: ácidos orgânicos derivados (28,07%), aminoácidos (28,07%), cetoácidos/hidroxiácidos (12,28%), nucleotídeos/purinas/pirimidinas (5,26%), açúcar (8,77%), aminas (3,51%), álcool (5,26%), fenol (3,51%) e outros (5,26%) (Tabela 2). No entanto, no pós-confinamento foram observados 55 compostos, sendo: ácidos orgânicos derivados (25,45%), aminoácidos (25,45%), cetoácidos/hidroxiácidos (14,55%), nucleotídeos/purinas/pirimidinas (5,45%), açúcar (9,09%), aminas (5,45%), álcool (3,64%), fenol (3,64%) e outros (7,27%). Os ácidos orgânicos derivados, como acetato, butirato, propionato, isobutirato, isovalerato e valerato, juntamente com açúcares (glicose) e álcool (etanol) foram os metabólitos mais abundantes nas fezes em ambos os grupos experimentais.

Oito metabólitos foram exclusivamente identificados no pré-confinamento (2-fenilpropionato, caprilato, fumarato, desaminotirosina, gama-glutamil fenilalanina, NADH, timidina, pantotenato) e sete compostos estavam presentes apenas no pós-confinamento (acetamida, 2-oxoglutarato, uracila, xantina, trimetilamina, dimetil sulfonas). Trinta e nove metabólitos foram identificados entre os grupos experimentais pré e pós-confinamento ($p < 0,05$). Os animais no pré-confinamento apresentaram maiores concentrações de 2-hidroxisovalerato, histidina, metionina, tirosina, lactato, fucose e maltose em relação ao pós-

confinamento ($p < 0,05$). No entanto, 32 compostos pertencentes às classes de ácidos orgânicos derivados, aminoácidos, cetoácidos/hidroxiácidos, nucleotídeo/purina/pirimidina, açúcar, aminas, álcool, fenol e outros apresentaram maiores concentrações quando os animais estavam no pós-confinamento ($p < 0,05$).

Tabela 2. Concentração dos metabólitos das fezes obtidos no pré e pós-confinamento de bovinos Nelore.

Metabólitos	Fórmula	ID ^a	Pré (N = 21) ^b	Pós (N = 21) ^b	p-valor
Ácido orgânico derivado					
2-Hidroxivalerato	C ₅ H ₁₀ O ₃	BMDB0001863	31,03 ± 6,17	12,01 ± 3,08	<0,001
3-Hidroxiiisovalerato	C ₅ H ₁₀ O ₃	BMDB0000754	1,80 ± 0,42	11,73 ± 5,06	<0,001
2-Fenilpropionato	C ₉ H ₁₀ O ₂	BMDB0011743	7,10 ± 0,90	-	-
Caprilato	C ₈ H ₁₆ O ₂	BMDB0000482	31,86 ± 11,06	-	-
Acetamida	C ₂ H ₅ NO	BMDB0031645	-	91,48 ± 15,64	-
Acetato	C ₂ H ₄ O ₂	BMDB0000042	8.735,75 ± 2.513,94	14.733,32 ± 2.552,35	<0,001
Butirato	C ₄ H ₈ O ₂	BMDB0000039	472,18 ± 113,59	1.815,08 ± 539,86	<0,001
Citrato	C ₆ H ₈ O ₇	BMDB0000094	10,60 ± 1,86	13,87 ± 2,64	<0,001
Fenilacetato	C ₈ H ₈ O ₂	BMDB0000209	24,73 ± 9,80	34,36 ± 11,03	0,004
Formato	CH ₂ O ₂	BMDB0000142	23,56 ± 8,74	26,36 ± 6,54	0,246
Fumarato	C ₄ H ₄ O ₄	BMDB0000134	2,95 ± 0,64	-	-
Isobutirato	C ₄ H ₈ O ₂	BMDB0001873	132,96 ± 33,22	159,00 ± 23,99	0,005
Isovalerato	C ₅ H ₁₀ O ₂	BMDB0000718	100,29 ± 22,55	100,89 ± 25,21	0,935
Propionato	C ₃ H ₆ O ₂	BMDB0000237	2.131,79 ± 464,07	3.510,39 ± 714,78	<0,001
Succinato	C ₆ H ₆ O ₄	BMDB0000254	14,50 ± 5,31	49,32 ± 12,96	<0,001
Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	BMDB0062038	7,60 ± 3,02	7,52 ± 2,55	0,069
Valerato	C ₅ H ₁₀ O ₂	BMDB0000892	169,21 ± 28,47	181,15 ± 65,68	0,449
Aminoácido					
Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	BMDB0000161	27,53 ± 8,31	46,35 ± 8,19	<0,001
Betaína	C ₅ H ₁₂ NO ₂	BMDB0000043	8,55 ± 3,20	14,24 ± 5,02	0,018
Creatina	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	BMDB0000064	12,28 ± 2,71	13,67 ± 4,82	0,258
Creatina fosfato	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	BMDB0001511	10,10 ± 2,33	18,96 ± 5,93	<0,001
Creatinina	C ₄ H ₇ N ₃ O	BMDB0000562	12,73 ± 2,55	15,41 ± 3,52	0,019
Desaminotirosina	C ₉ H ₁₀ O ₃	BMDB0002199	23,36 ± 3,63	-	-
Gama-Glutamil Fenilalanina	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	BMDB0000594	27,49 ± 0,09	-	-
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	BMDB0000123	29,17 ± 10,05	39,39 ± 9,63	<0,001

Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	BMDB0000177	7,83 ± 1,84	6,14 ± 1,88	0,026
Isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	BMDB0000172	12,59 ± 3,64	15,36 ± 3,25	0,013
Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	BMDB0000687	12,22 ± 3,65	19,16 ± 5,39	<0,001
Metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	BMDB0000696	15,81 ± 3,04	13,07 ± 4,37	0,023
Sarcosina	C ₃ H ₇ NO ₂	BMDB0000271	3,68 ± 1,47	5,57 ± 2,19	0,002
Treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	BMDB0000167	18,73 ± 6,99	35,10 ± 10,57	<0,001
Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	BMDB0000158	46,19 ± 14,88	35,53 ± 6,63	0,004
Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	BMDB0000883	12,82 ± 3,55	22,16 ± 6,79	<0,001
Cetoácido/Hidroxiácido					
2-Hidroxibutirato	C ₃ H ₈ O ₃	BMDB0000008	38,88 ± 14,64	66,96 ± 11,28	<0,001
2-Hidroxisobutirato	C ₄ H ₈ O ₃	BMDB0000729	2,00 ± 0,75	7,55 ± 2,05	<0,001
2-Oxoglutarato	C ₅ H ₆ O ₅	BMDB0000208	-	39,33 ± 11,21	-
3-Hidroxibutirato	C ₄ H ₈ O ₃	BMDB0000357	10,78 ± 3,40	23,60 ± 8,70	<0,001
Acetoacetato	C ₄ H ₆ O ₃	BMDB0000060	6,49 ± 2,14	17,94 ± 6,58	<0,001
Lactato	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001311	67,33 ± 19,21	46,82 ± 9,73	<0,001
Levulinato	C ₅ H ₈ O ₃	BMDB0000720	15,01 ± 3,75	13,90 ± 3,94	0,383
Piruvato	C ₃ H ₄ O ₃	BMDB0000243	11,12 ± 3,73	16,40 ± 3,32	<0,001
Nucleotídeo/Purina/Pirimidina					
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	BMDB0001847	2,21 ± 0,88	4,50 ± 1,80	<0,001
NADH	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₄ P ₂	BMDB0001487	4,10 ± 1,59	-	-
Timidina	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	BMDB0000273	3,13 ± 1,20	-	-
Uracila	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	BMDB0000300	-	24,72 ± 7,50	-
Xantina	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	BMDB0000292	-	13,49 ± 6,50	-
Açúcar					
1,3-Diidroxiacetona	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001882	7,00 ± 1,60	7,76 ± 3,03	0,326
Fucose	C ₆ H ₁₂ O ₅	BMDB0000174	34,39 ± 15,78	2,50 ± 0,76	<0,001
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	BMDB0000122	108,60 ± 38,10	132,25 ± 21,41	0,017
Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	BMDB0000163	27,70 ± 40,03	1,60 ± 0,62	<0,001
Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	BMDB0000283	64,24 ± 15,17	93,30 ± 37,22	0,005

Amina					
Dimetilamina	C ₂ H ₇ N	BMDB0000087	5,73 ± 1,64	6,90 ± 1,68	0,028
Metilamina	CH ₅ N	BMDB0000164	45,17 ± 21,56	67,94 ± 15,22	<0,001
Trimetilamina	C ₃ H ₉ N	BMDB0000906	-	11,88 ± 3,90	-
Álcool					
Etanol	C ₂ H ₆ O	BMDB0000108	334,76 ± 75,63	431,40 ± 189,06	0,035
Metanol	CH ₄ O	BMDB0001875	29,19 ± 6,29	32,15 ± 6,11	0,130
Pantotenato	C ₉ H ₁₇ NO ₅	BMDB0000210	7,10 ± 2,08	-	-
Fenol					
3-Hidroximandelato	C ₈ H ₈ O ₄	BMDB0000750	18,43 ± 5,30	24,60 ± 4,39	<0,001
3-Hidroxifenilacetato	C ₈ H ₈ O ₃	BMDB0000440	14,80 ± 2,65	26,00 ± 4,80	<0,001
Outros^c					
Acetona	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001659	9,47 ± 1,86	9,81 ± 1,38	0,502
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	BMDB0001525	9,66 ± 2,39	30,04 ± 6,76	<0,001
Colina	C ₅ H ₁₄ NO	BMDB0000097	4,53 ± 1,31	4,54 ± 1,33	0,981
Dimetil sulfona	C ₂ H ₆ O ₂ S	BMDB0004983	-	3,78 ± 1,55	-

^aID Bovine Metabolome Database (BMDB).

^bMédia ± desvio padrão.

^cMetabólitos = cetonas, alcaloide, sais de amônio quaternários e sulfona, respectivamente.

A análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram aplicadas aos dados de espectros de ^1H NMR para visualizar diferenças no metaboloma fecal dos animais no pré e pós-confinamento (Figura 1A e B). Os dois componentes principais do PCA explicaram 86,1% da variância total dos dados (CP1 = 77,6%; CP2= 8,5%). Da mesma forma, o PLS-DA explicou 85,5% da variância dos dados com os dois primeiros componentes. Os valores observados nas análises PCA e PLS-DA demonstram baixa sobreposição ou similaridade entre os grupos experimentais e explicam que grande parte da variação obtida nos metabólitos está associada com o pré e pós-confinamento. Para o primeiro e segundo componentes da PLS-DA, estatísticas descritivas de acurácia de predição do modelo, qualidade do ajuste (R^2) e predição da qualidade (Q^2) foram: 0,95; 0,73 e 0,71 e 1,00, 0,84 e 0,83, respectivamente.

Com base nas pontuações de projeções do gráfico VIP (VIP>1,0) (Figura 1C), três metabólitos contribuíram para maior porcentagem dos resíduos explicados no gráfico PLS-DA entre os animais no pré e pós-confinamento: acetato, butirato e propionato.

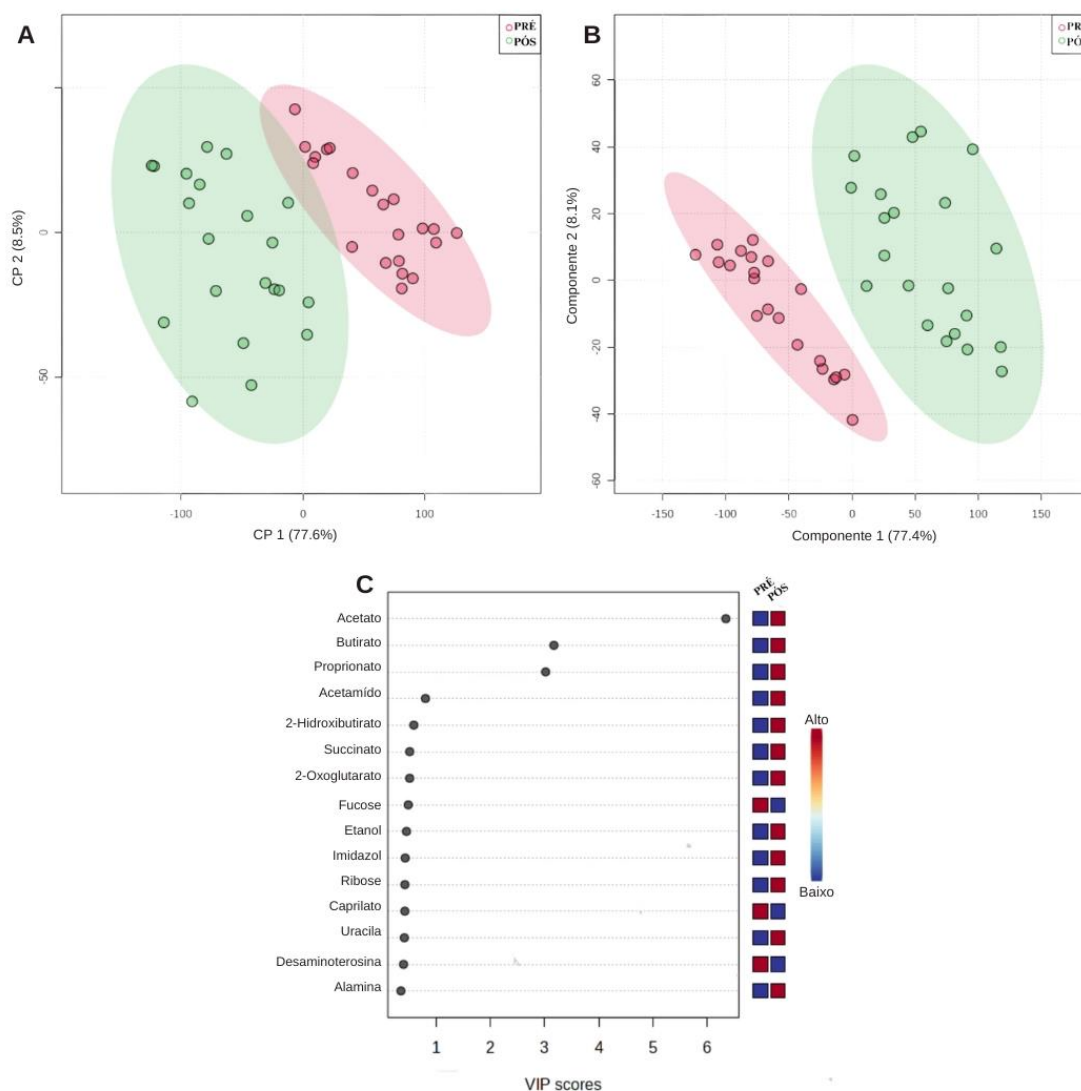


Figura 1. Metaboloma das fezes de animais Nelore no pré e pós-confinamento. (A) Análise de componentes principais (PCA) dos metabólitos identificados e quantificados nas fezes por ^1H NMR (cada ponto corresponde a um animal, e a cor vermelha do ponto corresponde ao pré-confinamento e cor verde ao pós-confinamento). (B) Gráfico de pontuação da análise discriminante de mínimos quadrados, parciais (PLS-DA) das fezes de animais Nelore (cada ponto corresponde a um animal, e a cor vermelha do ponto corresponde ao pré-confinamento e cor verde pós-confinamento). (C) Gráfico da importância da variável na projeção (VIP scores) dos metabólitos fecais que diferiram entre os grupos pré e pós-confinamento.

Foram detectadas cinco vias metabólicas ($p < 0,05$ e impacto $> 0,2$) como sendo as principais para diferenciar o pré e pós-confinamento dos bovinos Nelore: síntese e degradação de corpos cetônicos (bta00088); biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (bta00400); metabolismo da glicina, serina e treonina (bta00260); metabolismo do piruvato (bta00620); metabolismo da histidina (bta00340) (Figura 2 e Tabela 3).

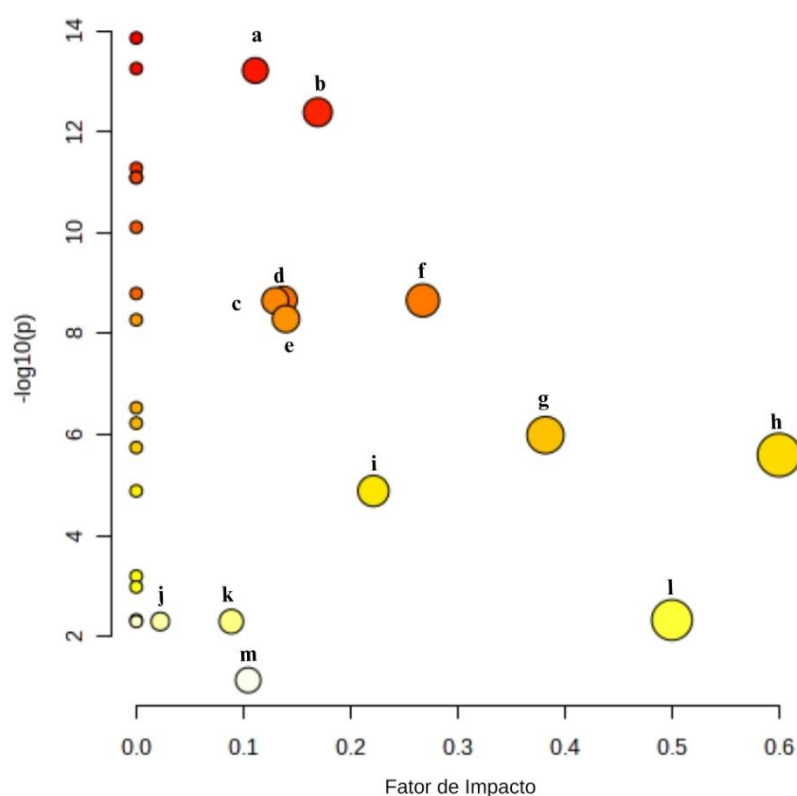


Figura 2. Integração do metaboloma das fezes de animais da raça Nelore. Vias metabólicas dos distintos metabólitos observados nas fezes dos animais Nelore. O eixo x representa o valor do impacto da via calculado a partir da análise topológica da via, e o eixo y é o logaritmo do *p-valor* obtido da análise de enriquecimento da via. A cor do ponto é baseada no *p-valor* e o raio do ponto é determinado com base em seus valores de impacto de caminho (visualizar a Tabela 3).

Tabela 3. Análise das vias metabólicas das fezes de animais Nelore no pré e pós-confinamento.

Letra ^a	Via metabólica	Compostos totais ^b	Compostos observados ^c	<i>p</i> -valor ^d	-log(p) ^e	Impacto ^f
a	Metabolismo do butanoato	15	4	<,0001	13,2100	0,1111
b	Ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs)	20	3	<,0001	12,3840	0,1695
c	Glicólise e gliconeogênese	26	5	<,0001	8,6520	0,1297
d	Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	32	4	<,0001	8,6700	0,1376
e	Metabolismo da tirosina	42	3	<,0001	8,2920	0,1397
f	Metabolismo do piruvato	22	3	<,0001	8,6579	0,2675
g	Metabolismo da glicina, serina e treonina	34	4	<,0001	5,9919	0,3819
h	Síntese e degradação de corpos cetônicos	5	2	<,0001	5,5978	0,6000
i	Metabolismo da histidina	16	1	<,0001	4,8858	0,2213
j	Biossíntese primária de ácidos biliares	46	1	0,004	2,3013	0,0224
k	Metabolismo da glutatona	28	1	0,004	2,3013	0,0887
l	Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	4	1	0,004	2,3307	0,5000
m	Metabolismo da cisteína e metionina	33	2	0,007	1,1391	0,1045

^aLetra corresponde às informações mostradas na Figura 2.

^bCompostos totais corresponde ao número total de compostos na via metabólica.

^cCompostos observados corresponde ao número realmente correspondido dos dados enviados pelo usuário.

^d*p*-valor foi calculado a partir da análise de enriquecimento.

^e-log(p) corresponde ao logaritmo do *p*-valor.

^fImpacto corresponde ao valor de impacto do caminho calculado a partir da análise de topologia do caminho.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o metaboloma das fezes de bovinos da raça Nelore submetidos ao pré e ao pós-confinamento, com dietas ricas em carboidratos fibrosos e não-fibrosos, respectivamente. Até o momento, apenas um estudo descreveu o metaboloma fecal de bovinos Nelore (Malheiros et al., 2021). No entanto, há relatos na literatura sobre metabólitos fecais em outras raças de bovinos como Angus, Angus x Simental, Luxi Yellow x Wagyu e laque (Zhu et al., 2019; Valeiro et al., 2020; Chen et al., 2022).

A composição metabólica das fezes pode revelar informações preciosas sobre a complexa interação entre os ruminantes e o ecossistema ruminal (Zhu et al., 2019). Nas fezes, encontram-se dados relevantes relacionados ao hospedeiro, à microbiota e aos componentes da alimentação. É importante destacar que a diversidade da microbiota ruminal em bovinos pode ser influenciada por vários fatores, sendo a dieta e a raça os principais determinantes (Abaker et al., 2019; Lengowski et al., 2020; Lima et al., 2021). Além disso, fatores como idade, sexo, estado fisiológico e ambiente também desempenham papel importante nessa modulação. Por fim, todas essas interações complexas podem influenciar a composição dos metabólitos fecais nos bovinos.

Desse modo, distintas intervenções nutricionais podem levar a variações na fermentação microbiana no trato gastrointestinal, o que resulta na produção de metabólitos distintos (Abaker et al., 2019; Lima et al., 2021). Além disso, características genéticas dos bovinos podem afetar a composição da microbiota ruminal e a fermentação dos alimentos (Lengowski et al., 2020). Nossos dados de metaboloma revelaram notável diversidade de metabólitos nas fezes, resultado da atividade dos microrganismos ruminais, como descrito em estudos anteriores (Zhu et al., 2019; Foroutan et al., 2020; Eom et al., 2021; Malheiros et al., 2021), associado à raça Nelore e ao protocolo nutricional adotado, enfatizando a influência desses fatores na composição dos metabólitos fecais em bovinos.

A fermentação ruminal em bovinos é um processo complexo que envolve a ação de diversos microrganismos na degradação das fibras e dos carboidratos presentes na dieta. A degradação dos carboidratos fibrosos ocorre em várias

etapas, com microrganismos especializados atuando na quebra da fibra em componentes mais simples, como celulose e hemicelulose, por meio de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (McAllister et al., 1997). Esses componentes são posteriormente fermentados pelos microrganismos ruminais, o que resulta na produção de AGVs, como acetato, propionato e butirato (McAllister et al., 1997; Liang et al., 2016). Geralmente, o acetato é o AGVs com maior proporção em relação ao propionato e butirato no rúmen nesse tipo de fermentação (Van Soest, 1994; Kozloski, 2011). Além disso, também no rúmen, ocorre a fermentação de dietas que contêm altos teores de carboidratos não fibrosos, nos quais o amido, os açúcares simples e outros carboidratos solúveis são decompostos pelos microrganismos ruminais. As amilases produzidas pelos microrganismos são responsáveis pela degradação do amido em moléculas menores, como dextrinas e glicose (Russell et al., 2001). Essas moléculas são então fermentadas, resultando na produção de AGVs (Russell et al., 2001; Nagaraja et al., 2016). Nesse tipo de fermentação, o propionato é geralmente o AGVs predominante em relação ao acetato e butirato (Van Soest, 1994; Kozloski, 2011; Saleem et al., 2013).

Portanto, independentemente da dieta fornecida, a fermentação resulta na produção AGVs, que desempenham papel fundamental na obtenção de energia (Van Soest, 1994; Seymour et al., 2005; Liang et al., 2016). Em nosso estudo, foram observadas concentrações mais elevadas desses ácidos nos grupos experimentais estudados, o que destaca sua importância no metabolismo ruminal. O acetato é convertido pelos microrganismos ruminais em acetil-CoA, uma molécula que pode ser utilizada no ciclo do ácido cítrico para a produção de energia por meio da fosforilação oxidativa (Van Soest, 1994). Da mesma forma, o propionato e o butirato podem ser diretamente empregados no ciclo do ácido cítrico, onde são convertidos em succinil-CoA e, posteriormente, utilizados para a produção de energia (Van Soest, 1994). Além disso, uma parte do propionato pode ser convertida em glicose por meio do processo de gliconeogênese, fornecendo importante fonte de energia para o animal (Liang et al., 2016).

Esses processos metabólicos desempenham papel crucial na obtenção de energia a partir dos ácidos orgânicos derivados da fermentação ruminal (Van

Soest, 1994; Liang et al., 2016). Uma parte significativa dessa energia é utilizada pelos microrganismos ruminais para o seu próprio crescimento e atividades metabólicas (Van Soest, 1994). Outra parte é absorvida pelo epitélio ruminal, onde é empregada na manutenção e proliferação das células nessa região (Van Soest, 1994). Adicionalmente, uma parcela da energia é absorvida pelo animal, passando da parede do rúmen para o trato digestivo e, subsequentemente, para a corrente sanguínea (Van Soest, 1994; Liang et al., 2016)

Estudos realizados em bovinos da raça Nelore por Malheiros et al. (2021), assim como em *Bos taurus taurus* por Foroutan et al. (2020) e Eom et al. (2021), encontraram concentrações menores de acetato, propionato e butirato nas bioamostras fecais em comparação com os resultados do nosso estudo. Essa diferença indica que as dietas ricas em carboidratos fibrosos e não-fibrosos utilizadas em nossa pesquisa modificaram o ambiente ruminal e, conseqüentemente, o perfil metabólico das fezes dos bovinos, principalmente em relação à produção de AGVs.

No presente estudo, durante o período de pré-confinamento com o fornecimento de uma dieta rica em carboidratos fibrosos, foram detectados exclusivamente os metabólitos 2-fenilpropionato, caprilato, fumarato, desaminotirosina, gama-glutamil fenilalanina, NADH, timidina e pantotenato. Embora a fermentação exata do 2-fenilpropionato ainda não esteja completamente elucidada, estudo sugere que ele pode ser convertido em outros compostos, como AGVs, por meio de diferentes rotas metabólicas (Martin et al., 2010). Uma possível rota de fermentação envolve a degradação do 2-fenilpropionato em AGVs, como propionato e acetato, que são fontes importantes de energia para os bovinos (Van Soest, 1994). Essa degradação é mediada por bactérias ruminais específicas que possuem enzimas capazes de metabolizar o 2-fenilpropionato. Além disso, o 2-fenilpropionato pode atuar como substrato para a microbiota ruminal, estimulando a atividade e o crescimento microbiano no rúmen, além de estar relacionado ao metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (Martin et al., 2010). Em estudos conduzidos por Hino et al. (2008) com bovinos de leite alimentados com uma dieta rica em carboidratos fibrosos, assim como em nosso estudo, foi observada a presença

de caprilato no rúmen. Isso evidencia a consistência dos resultados encontrados, fortalecendo a associação entre a dieta rica em carboidratos fibrosos e a produção de caprilato no ambiente ruminal. As bactérias ruminais possuem enzimas específicas capazes de degradar compostos fenólicos, como lignina e taninos, que são considerados anti-nutricionais para os animais. Durante a fermentação ruminal, essas bactérias metabolizam os compostos fenólicos em AGVs, incluindo o caprilato (Hino et al., 2008). O caprilato está diretamente relacionado à eficiência da fermentação ruminal e à capacidade das bactérias ruminais em degradar os compostos fenólicos presentes na dieta fibrosa (Hino et al., 2008). Portanto, fica evidente que a presença de uma dieta rica em carboidratos fibrosos estimula a produção de caprilato no rúmen, proporcionando uma fonte adicional de energia para os bovinos.

O fumarato desempenha um papel importante na fermentação ruminal como um aceptor de hidrogênio. Durante a fermentação de carboidratos fibrosos no rúmen, o fumarato pode ser reduzido a succinato por meio da transferência de elétrons, resultando na produção de NADH (Van Soest, 1994). O NADH é produzido como resultado das reações de redução que ocorrem durante a fermentação de carboidratos, sendo necessário reoxidá-lo para que o processo de fermentação não seja inibido. Em condições anaeróbicas no rúmen, o NADH deve ser reoxidado por meio da transferência de elétrons para receptores que não sejam oxigênio. Além disso, o NADH é um dos principais sumidouros, juntamente com sulfato, nitrato e fumarato, na redução de CO_2 a CH_4 (Morgavi et al., 2010). Portanto, uma dieta rica em fibra promove a produção de caprilato no rúmen devido à participação do fumarato como aceptor de hidrogênio e ao metabolismo anaeróbico dos AGVs, incluindo a reoxidação do NADH.

A presença de timidina na fermentação ruminal pode afetar a síntese de DNA dos microrganismos ruminais, essencial para o crescimento e reprodução desses organismos (Hungate, 1975). Embora não seja um componente dietético comum, a timidina pode estar presente na fermentação ruminal devido a fatores específicos, como dietas ricas em carboidratos fibrosos ou outros processos metabólicos (Wang et al., 2015). O pantotenato, também conhecido como vitamina B5, desempenha papel crucial na fermentação ruminal, mesmo quando

a dieta é rica em carboidratos fibrosos. Durante a fermentação, o pantotenato é necessário para a síntese de coenzimas, incluindo a coenzima A (CoA), que desempenha um papel fundamental na degradação e síntese de ácidos graxos. A presença adequada de pantotenato na fermentação ruminal é essencial para manter a atividade enzimática necessária para a degradação eficiente da fibra e produção de AGVs. Quando a dieta é rica em fibras, é importante garantir que os microrganismos ruminais tenham acesso suficiente ao pantotenato para sustentar seu metabolismo e atividade enzimática (Nocek, 1997).

Por fim, a desaminotirosina e a gama-glutamil fenilalanina presentes na fase pré-confinamento são aminoácidos que estão presentes na composição proteica da dieta dos bovinos. No entanto, até o momento, a literatura científica não apresenta relatos específicos sobre o metabolismo desses aminoácidos no rúmen bovino. A investigação aprofundada da degradação e metabolismo dos aminoácidos no rúmen é uma área complexa e em constante progresso. Embora exista entendimento geral da fermentação ruminal e da utilização de aminoácidos pelos microrganismos ruminais, há ainda lacunas no conhecimento referentes a aminoácidos específicos, como a desaminotirosina e a gama-glutamil fenilalanina. A existência dessas lacunas destaca a importância de pesquisas futuras para uma investigação mais aprofundada da interação entre a dieta rica em fibras e o metabolismo dos aminoácidos no rúmen, com o objetivo de preencher as lacunas existentes e alcançar uma compreensão mais abrangente dos processos bioquímicos envolvidos.

Durante o período pós-confinamento, quando uma dieta rica em carboidratos não-fibrosos foi fornecida, foram exclusivamente detectados os metabólitos acetamida, 2-oxoglutarato, uracila, xantina, trimetilamina e dimetil sulfonas. Esses metabólitos podem surgir como resultado da fermentação ruminal devido às especificidades da dieta fornecida. A acetamida é um composto orgânico que pode ser produzido na fermentação ruminal a partir da modificação de um aminoácido específico ou pela condensação de grupos amino, como resultado da degradação de componentes da dieta, como proteínas (Belasco, 1954; Simon et al., 1973). Quando metabolizada no rúmen, a acetamida pode ser convertida pelas enzimas amidase em acetato e amônio, e

posteriormente utilizada como fonte de nitrogênio não proteico para a microflora ruminal (Mor et al., 2019). Estudos sugerem que a acetamida pode ser absorvida pela parede ruminal e entrar na corrente sanguínea (Kijora et al., 1975). Consequentemente, a acetamida pode ser depositada na carne e/ou leite de bovinos (Vismeh et al., 2017), podendo estar presente como um resíduo potencialmente detectável. No entanto, é importante ressaltar que a presença de acetamida na carne ou no leite de bovinos pode depender de vários fatores, como a quantidade consumida, a taxa de metabolização e a presença de outros compostos na dieta.

O 2-oxoglutarato, também conhecido como α -cetoglutarato, é um metabólito intermediário do ciclo do ácido cítrico e desempenha papel importante no metabolismo energético e na biossíntese de aminoácidos (Clemmons et al., 2020). Na fermentação ruminal, o 2-oxoglutarato pode ser produzido a partir da degradação de diferentes substratos, incluindo carboidratos não-fibrosos, como o amido. Quando uma dieta rica em amido é fornecida, ocorre maior disponibilidade desse substrato para os microrganismos ruminais. Como resultado, a fermentação ruminal é estimulada e ocorrem alterações nos perfis metabólicos. Estudos mostram que o 2-oxoglutarato pode ser um dos metabólitos produzidos durante a fermentação ruminal de dietas ricas em amido (Russell e Rychlik, 2001; Li et al., 2012). A presença de 2-oxoglutarato na fermentação ruminal em dietas ricas em amido pode ter implicações na síntese de aminoácidos pelos microrganismos ruminais. O 2-oxoglutarato serve como precursor para a síntese de glutamato e glutamina, aminoácidos essenciais para o metabolismo dos microrganismos ruminais e para a produção de proteínas microbianas.

A trimetilamina e a xantina são produtos intermediários da degradação de ácidos nucleicos por bactérias ruminais (Trent et al., 2006). A trimetilamina é um composto orgânico volátil que se forma a partir da decomposição da colina e outros compostos nitrogenados presentes na dieta pelos microrganismos ruminais. Já a xantina é um produto resultante da degradação da purina, um componente encontrado em nucleotídeos presentes em células vegetais. A concentração desses metabólitos no rúmen pode aumentar quando os bovinos

são alimentados com dietas ricas em grãos (Kozloski et al., 2009; Dai et al., 2015; Lopes et al., 2019). Estudos mostraram a presença de trimetilamina na fermentação ruminal de bovinos alimentados com diferentes dietas (Kozloski et al., 2009). Da mesma forma, a presença de xantina foi observada em estudos que investigaram a fermentação ruminal de dietas ricas em amido (Dai et al., 2015). A trimetilamina pode ser convertida em metilamina, a qual serve como fonte de carbono e energia para alguns microrganismos ruminais (Rode et al., 1987). Por sua vez, a xantina pode ser metabolizada pelos microrganismos ruminais para a produção de ácido úrico e, posteriormente, ácido alantóico, que é utilizado como fonte de nitrogênio pela microbiota ruminal (Joblin et al., 1989).

A uracila é um nucleotídeo que faz parte da estrutura dos ácidos nucleicos, como o RNA. Na fermentação ruminal, a uracila pode ser encontrada como resultado da degradação de ácidos nucleicos provenientes da dieta, como o RNA presente em células vegetais (Holley et al., 1965). Quando uma dieta rica em amido é fornecida, ocorre um aumento na disponibilidade de carboidratos não-fibrosos para os microrganismos ruminais. Esses microrganismos são capazes de degradar o RNA presente na dieta, liberando nucleotídeos como a uracila. Além disso, maiores quantidades de ácidos nucléicos no rúmen podem ser indicativas da renovação genética microbiana ou do material vegetal em fermentação (Clemmons et al., 2020), aumentando também a síntese e a disponibilidade de proteína microbiana bruta (Leng e Nolan, 1984; O'Callaghan et al., 2018). Estudos realizados por McAllan e Smith (1973) analisaram a degradação de DNA e RNA no líquido ruminal *in vitro* e descobriram que, embora muitos componentes do DNA e do RNA sejam completamente ou em sua maioria degradados, hipoxantina, uracila e timina resistiram à degradação após quatro horas de incubação. Dos compostos mencionados, a uracila foi a mais resistente à degradação, com aproximadamente 60% da uracila original.

As dimetil sulfonas são produzidas na fermentação ruminal de dietas ricas em carboidratos não-fibrosos, como resultado da degradação de compostos sulfurados, como a metionina e cisteína, presentes em proteínas produzidas por qualquer organismo vivo. Estudos conduzidos por Chalupa et al. (1984) investigaram a produção de gases sulfurados no rúmen e observaram a

presença de dimetil sulfonas. Além disso, Choct et al. (1996) estudaram a formação de gases e compostos sulfurados no rúmen de ovinos e relataram a produção de dimetil sulfonas como um dos produtos resultantes da fermentação.

Por fim, os AGVs produzidos na fermentação ruminal, independentemente da dieta fornecida, desempenham um papel crucial na síntese e regulação dos aminoácidos essenciais no rúmen. Os microrganismos ruminais utilizam os AGVs como fonte de carbono, juntamente com compostos nitrogenados, para a produção de novos aminoácidos (Sauer et al., 1975; Atasoglu et al., 1998; Kajikawa et al., 2022). Isso é evidenciado pelas vias metabólicas enriquecidas observadas no estudo, como a biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano, o metabolismo da glicina, serina e treonina, e o metabolismo da histidina. Essas descobertas ressaltam a importância da interação complexa entre a fermentação ruminal, a dieta e o metabolismo dos microrganismos ruminais na regulação da síntese de aminoácidos essenciais. A presença de altas concentrações de AGVs no rúmen durante a alimentação pode contribuir significativamente para a biossíntese desses aminoácidos, fornecendo os blocos de construção necessários para a síntese de proteínas e o funcionamento adequado do organismo. Portanto, compreender e otimizar a produção de AGVs na fermentação ruminal pode ter impactos importantes na nutrição e no desempenho dos bovinos.

Em resumo, realizamos a primeira caracterização da biodiversidade do metaboloma fecal do Nelore em dietas ricas em carboidratos fibrosos e não fibrosos, revelando que a maioria dos metabólitos fecais é comum aos grupos experimentais. Os microrganismos ruminais demonstram uma alta adaptabilidade a diferentes tipos de carboidratos, graças à presença de uma ampla variedade de enzimas capazes de degradar e fermentar diferentes estruturas de carboidratos. Independentemente do tipo de carboidrato presente na dieta, esses microrganismos são capazes de produzir metabólitos semelhantes (Henderson et al., 2015a). Uma característica importante dos microrganismos ruminais é a conservação das vias metabólicas envolvidas na degradação e fermentação de carboidratos. Isso significa que eles possuem as mesmas vias metabólicas para converter os substratos em produtos finais, como

os AGVs. Essa conservação das vias metabólicas contribui para a produção de metabólitos semelhantes, independentemente da composição da dieta (Henderson et al., 2015b; Wang et al., 2020).

No entanto, é importante destacar que, embora existam semelhanças nos metabólitos produzidos, as proporções e concentrações específicas desses metabólitos podem variar dependendo da composição da dieta e das condições ruminais. Além disso, certos compostos podem ser mais abundantes em dietas específicas, mas a presença e a influência de outros metabólitos também devem ser consideradas para obter maior compreensão completa do metaboloma fecal dos bovinos Nelore.

5. CONCLUSÃO

O aumento da densidade energética e proteica da dieta exerceu impacto significativo nas concentrações dos metabólitos fecais em bovinos Nelore. Essas mudanças sugerem que a composição da dieta desempenha papel crucial na composição e concentração do metaboloma fecal, refletindo adaptações fisiológicas e bioquímicas dos bovinos em confinamento, com o objetivo de otimizar a absorção e utilização dos nutrientes fornecidos pela dieta.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

Abaker J A, Elghandour MMY, Salem AZM, Kholif AE, Olafadehan AO, Odongo NE (2019) Effect of dietary supplementation of *saccharomyces cerevisiae* on rumen fermentation and fecal metabolites in beef cattle. **Animal Feed Science and Technology** 253:97-105.

ABIEC. Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne (2022) **Beef Report** Disponível em: <<http://Abiec.Com.Br/Publicacoes/Beef-Report-2021/>>

Andrade BGN, Bressani FA, Cuadrado RRC, Polyana CT, Oliveira PSN, Mourão GB, Coutinho LL, Reecy JM, Koltes JE, Walsh P, Berndt A, Palhares JCP, Regitano LCA (2020) The structure of microbial populations in Nelore GIT reveals inter-dependency of methanogens in feces and rumen. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 11:1-10.

Artegoitia VM, Foote AP, Lewis RM, Freetly HC (2017) Rumen fluid metabolomics analysis associated with feed efficiency on crossbred steers. **Scientific Reports** 7:1-14.

Atasoglu C, Valdés C, Walker ND, Newbold CJ, Wallace RJ (1998). De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. **Applied Environmental Microbiology** 64:2836-2843.

Bannink A, France J, Lopez S, Gerrits WJJ, Kebreab E, Tamminga S, Dijkstra J (2008) Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. **Animal Feed Science and Technology** 143:3-26.

Belasco IJ (1954) New nitrogen feed compounds for ruminants - a laboratory evaluation. **Journal of Animal Science** 13:601-610.

Chalupa W, Grubb JA, Kronfeld DS (1984). In vivo, in vitro and bacterial fermentation of sulfur-containing amino acids by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science** 58:1501-1509.

Chen D, Su M, Zhu H, Zhong G, Wang X, Ma W, Wanapat M, Tan Z (2022) Using untargeted lc-ms metabolomics to identify the association of biomarkers in cattle feces with marbling standard longissimus lumborum. **Animals** 12:2243.

Choct M, Kocher A, Waters DLE, Pettersson D, Ross G, Bedford MR (1996) The effect of microbial and cereal factors on the production of odorous compounds in the pig colon and the influence of dietary fats. **Journal of Science, Food and Agriculture** 71:413-422.

Clemmons BA, Powers JB, Campagna SR, Seay TB, Embree MM, Myer PR (2020) Rumen fluid metabolomics of beef steers differing in feed efficiency. **Metabolomics** 16:23.

Dai X, Tian Y, Li J, Su X, Wang H, Wu X (2015) Metabolism of dietary nucleotides and purine derivatives in the rumen of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 98:1862-1873.

Eom JS, Kim ET, Kim HS, Choi YY, Lee SS, Kim SH, Lee SS (2021) Metabolomics comparison of rumen fluid and milk in dairy cattle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Animal Bioscience** 34:213-222.

Foroutan A, Fitzsimmons C, Mandal R, Piri-Moghadam H, Zhen J, Guo AC, Li C, Guan LL, Wishart DS (2020) The bovine metabolome. **Metabolites** 10:1-26.

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

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

Hino T, Yamanaka H, Suzuki T, Wada Y, Moritani M, Mitsumori M (2008). Detection of caproate and caprylate in the rumen of a cow fed a high-forage diet. **Journal of General and Applied Microbiology** 54:1-7.

Hobson PN, Stewart CS (2012) Rumen microbial ecosystem (2^a edição). **Blackie Academic & Professional**.

Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisse M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A (1965) Structure of a ribonucleic acid. **Science** 147:1462-1465.

Hungate RE (1975) The rumen microbial ecosystem. **Annual Review of Ecology and Systematics** 6:39-66.

Janssen PH (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology** 160:1-22.

Joblin KN, McCartney CA, Chambers JR (1989) Metabolism of xanthine and hypoxanthine by the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Applied and Environmental Microbiology Journal** 55:1112-1116.

Kajikawa H, Mitsumori M, Ohmomo S (2022) Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science** 85:2015-2022.

Kijora C, Gorsch R, Muller J, Bergner H (1975) Untersuchungen zum Umsatz von ¹⁴C-¹⁵N-Azetamid bei Schafen. **Archiv für Tierernaehrung** 25:165-181.

Kozloski GV (2011) Bioquímica dos ruminantes (3ª edição). **Santa Maria: UFMS** 1:216.

Kozloski GV, Trevisan G, Brun MV, Ribeiro LA, Alves TP, da Silveira MF (2009) Rumen fermentation and animal performance of beef cattle fed diets with different levels of concentrate and starch. **Animal Feed Science and Technology** 153:267-275

Leng RA, Nolan JV (1984) Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science** 67:1072-1089.

Lengowski MB, Dill-McFarland KA, Suen G, Thallman RM (2020) The effect of sire breed and diet on the rumen and fecal microbiome of beef cattle. **PLOS ONE** 15:e0240501.

Li M, Penner GB, Hernandez-Sanabria E, Oba M, Guan LL (2012) Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. **Journal of Applied Microbiology** 112:944-954.

Liang Y, McAllister TA, Beauchemin KA, Yang WZ (2016) Rumen microbiome and its association with feed efficiency in beef cattle. **Animal Frontiers** 6:26-34.

Lima AM, Pauletti P, Santos GG, Zeoula LM, Mercadante MEZ, Resende FD, Ladeira MM (2021) Diet-induced changes in the ruminal microbiota alter metabolic pathways and increase production of volatile fatty acids in Nelore steers. **Microorganisms** 9:1616.

Lopes DRG, Reau AJL, Duarte MS, Detmann E, Bento CBP, Mercadante MEZ, Bonilha SFM, Suen G, Mantovani HC (2019) The bacterial and fungal microbiota of Nelore steers is dynamic across the gastrointestinal tract and its fecal-associated microbiota is correlated to feed efficiency. **Frontiers in Microbiology** 10:1263.

Malheiros JM, Correia BSB, Ceribeli C, Cardoso DR, Colnago LA, Junior SB, Reecy JM, Mourão GB, Coutinho LL, Palhares JCP, Berndt A, Regitano LC (2021) Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (*Bos indicus*). **Scientific Reports** 11:12752.

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

McAllan A, Smith R (1973). Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. **British Journal of Nutrition** 29:467-474.

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ (1997) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science** 75:2791-2806.

Millen DD, Pacheco RDL, Arrigoni MDB, Galyean ML, Vasconcelos JT (2009) A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science** 87:3427-3439.

Mor P, Bals B, Kumar S, Tyagi N, Reen JK, Tyagi B, Choudhury PK, Tyagi AK (2019) Influence of replacing concentrate mixture with AFEX pellets on rumen fermentation, blood profile and acetamide content in the rumen of crossbred (Alpine × Beetle) female goats. **Small Ruminant Research** 170:109-115.

Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ (2010) Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal** 4:1024-1036.

Nagaraja TG, Titgemeyer EC, Galyean ML (2016) Nutrition and gastrointestinal microbial ecology. In **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution** 195-233.

Nocek JE (1997) Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science** 80:1005-1028.

O'Callaghan TF, Vásquez-Fresno R, Serra-Cayuela A, Dong E, Mandal R, Hennessy D, McAuliffe S, Dillon P, Wishart DS, Stanton C, Ross RP (2018) Pasture feeding changes the bovine rumen and milk metabolome. **Metabolites** 8:1-24.

Rode LM, Hespell RB, Russell JB (1987) The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology** 45:179-184.

Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ (2001) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science** 73:2779-2792.

Russell JB, Rychlik JL (2001) Factors that alter rumen microbial ecology. **Science** 292:1119-1122.

Saleem AM, Zanouny AI, Salem HB (2013). Effect of dietary energy source on in vitro ruminal fermentation of carbohydrates and fatty acids profile in the ruminal fluid of sheep. **Animal Feed Science and Technology** 184:24-31.

Sauer FD, Erfle JD, Mahadevan S (1975) Amino acid biosynthesis in mixed rumen cultures. **Biochemical Journal** 150, 357-372.

Saviotto D, Berry DP, Friggens NC (2014) Towards an improved estimation of the biological components of residual feed intake in growing cattle. **Journal of Animal Science** 92:467–476.

Seymour WM, Campbell DR, Johnson ZB (2005) Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. **Animal Feed Science and Technology** 119:155-169.

Simon O, Munchmeyer R, Gorsch R, Bergner H (1973) Einfluß von Harnstoff, Azetamid und Azetylharnstoff auf die freien Aminosäuren des Blutplasmas und die Aminosäurezusammensetzung der Pansenproteine beim Schaf. **Archiv für Tierernaehrung** 23:555-566.

Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV (2006) Invited review: diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. **Journal of Endotoxin Research** 12:205-223.

Uyeh DD, Mallipeddi R, Pamulapati T, Park T, Kim J, Woo S, Ha Y (2018) Interactive livestock feed ration optimization using evolutionary algorithms. **Computers and Electronics in Agriculture** 155:1-11.

Valerio A, Casadei L, Giuliani A, Valerio M (2020) Fecal metabolomics as a novel noninvasive method for short-term stress monitoring in beef cattle. **Journal of Proteome Research** 19, 845–853 (2020).

Van Soest PJ (1994) Nutritional ecology of the ruminant (1^a edition). **Ithaca: Cornell University Press** 1:476.

Vismeh R, Haddad D, Moore J, Nielson C, Bals B, Campbell T, Julian A, Teymouri F, Jones AD, Bringi V (2017) Exposure assessment of acetamide in milk, beef, and coffee using xanthidrol derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66:298-305.

Wallace RJ, Snelling TJ, McCartney CA, Tapio I, Strozzi F (2017) Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. **Genetics Selection Evolution** 49:1-11.

Wang L, Xu Q, Kong F, Yang Y (2020) Understanding the microbial ecosystem in the rumen of dairy cows and enhancing its feed efficiency. **Microorganisms** 8:677.

Wang M, Sun XZ, Janssen PH, Tang SX, Tan ZL (2015) Effect of fiber source on rumen fermentation, fiber digestion, and fiber-degrading bacteria in vitro. **Journal of Dairy Science** 98:1-9.

Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS (2011) Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics** 9:280-299.

Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research** 37:652-660.

Zhu C, Li C, Yaning W, Laghi L (2019) Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolites** 9:41.

CAPÍTULO 3 - METABOLÔMICA FECAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE ASSOCIADA AO CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL

Resumo - O aproveitamento eficiente dos nutrientes na bovinocultura de corte é essencial para reduzir o consumo de alimentos, diminuir os custos e promover produção sustentável. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o perfil metabolômico das fezes de touros da raça Nelore, selecionados para distintos grupos de consumo alimentar residual (CAR, kg MS/dia). Cento e oito touros da raça Nelore foram alojados em baias coletivas (Intergado®) para a realização do teste de eficiência alimentar, com duração de 77 dias. O CAR dos 108 animais foi calculado e posteriormente selecionados dois grupos experimentais, animais eficientes (CAR negativo = $-1,19 \pm 0,34$ kg MS/dia; N=15) e não eficientes (CAR positivo = $+1,09 \pm 0,27$ kg MS/dia; N=15) para os ensaios de metabolômica. Os metabólitos fecais foram extraídos e os espectros obtidos por meio da análise de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN). 56 metabólitos foram identificados e quantificados nas amostras fecais dos touros eficientes e não eficientes. Desses, 36 metabólitos apresentaram expressão diferencial entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Observou-se que os metabólitos butirato, propionato e valerato apresentaram maiores concentrações no grupo de touros eficientes, enquanto o acetato mostrou maior concentração no grupo de touros não eficientes. Os metabólitos identificados fornecem informações relevantes sobre as principais vias metabólicas, como a síntese e degradação de corpos cetônicos, biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, metabolismo de glicina, serina e treonina, ciclo do ácido cítrico e metabolismo do piruvato. É importante destacar que touros eficientes e não eficientes apresentaram diferenças significativas na concentração de metabólitos fecais, especialmente em relação aos ácidos graxos voláteis (AGVs). Esses resultados destacam o potencial do metaboloma fecal, em particular a concentração dos AGVs, como biomarcadores promissores para avaliar e selecionar animais mais eficientes.

Palavras-chave: biomarcadores, *Bos taurus indicus*, eficiência alimentar, metabólitos.

CHAPTER 3 - FECAL METABOLOMICS OF NELORE BULLS ASSOCIATED WITH RESIDUAL FEED INTAKE

Abstract - Efficient nutrient utilization in beef cattle farming is essential for reducing feed consumption, lowering costs, and promoting sustainable production. In this context, the aim of this study was to investigate the metabolomic profile of feces from Nelore breed bulls selected for different residual feed intake (RFI) groups (kg DMI/day). One hundred and eight Nelore bulls were housed in collective pens (Intergado®) for a 77-day feed efficiency test. RFI was calculated for all 108 animals, and subsequently, two experimental groups were selected: efficient animals (low RFI = -1.19 ± 0.34 kg DMI/day; N=15) and inefficient animals (high RFI = $+1.09 \pm 0.27$ kg DMI/day; N=15) for metabolomics assays. Fecal metabolites were extracted, and spectra were obtained through Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) analysis. A total of 56 metabolites were identified and quantified in fecal samples from efficient and inefficient bulls. Among them, 36 metabolites showed differential expression between the experimental groups ($p < 0.05$). It was observed that the metabolites butyrate, propionate, and valerate had higher concentrations in the efficient bull group, while acetate showed higher concentration in the inefficient bull group. The identified metabolites provide relevant information about key metabolic pathways such as synthesis and degradation of ketone bodies, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, glycine, serine, and threonine metabolism, citric acid cycle, and pyruvate metabolism. Importantly, efficient and inefficient bulls exhibited significant differences in fecal metabolite concentrations, particularly in relation to volatile fatty acids (VFAs). These results highlight the potential of fecal metabolome, particularly VFAs concentrations, as promising biomarkers for assessing and selecting more efficient animals.

Keywords: biomarkers, *Bos taurus indicus*, feed efficiency, metabolites.

1. INTRODUÇÃO

O eficiente aproveitamento de nutrientes na bovinocultura de corte desempenha um papel fundamental na redução do consumo de alimento, na diminuição dos custos e no fomento da produção sustentável, como destacado por Nkrumah et al. (2006) e Williams et al. (2013). Nesse contexto, a avaliação da eficiência alimentar em bovinos é de extrema importância e pode ser estimada por meio do conceito de consumo alimentar residual (CAR, em kg MS/dia), conforme proposto por Koch et al. (1963). O CAR é calculado a partir da diferença entre o consumo de alimento observado e o consumo estimado, conforme a metodologia estabelecida por Koch et al. (1963). Bovinos eficientes demonstram um consumo observado menor do que o consumo estimado, sendo, portanto, classificados com CAR negativo, conforme descrito por Basarab et al. (2003). Por outro lado, os animais não eficientes apresentam um CAR positivo.

No Brasil, apenas um programa de melhoramento genético utiliza o CAR como critério de seleção dos touros (Williams, 2010; Damiran et al., 2018). No entanto, o CAR é característica poligênica, regulada por inúmeros processos biológicos e influenciada por diferentes fatores ambientais (Capper e Hayes, 2012; Oliveira et al., 2014; Widmann et al., 2015; Tizioto et al., 2016; Wallace et al., 2017). Esses fatores incluem interações complexas entre a microbiota ruminal, o metabolismo dos bovinos, a composição da dieta, a digestão e a absorção dos alimentos (Herd et al., 2004; Myer et al., 2015; Artegoitia et al., 2017; Andrade et al., 2020; Lopes et al., 2021; Xue et al., 2022) entre outros.

Nos últimos anos, as abordagens "ômicas" têm desempenhado um papel crucial na ampliação do conhecimento sobre os fenótipos de eficiência alimentar em bovinos (Jung et al., 2017; Benedeti et al., 2018; Duarte et al., 2019). Dentre essas abordagens, a metabolômica tem se mostrado particularmente útil na caracterização do metaboloma em diferentes bioamostras, como sangue, líquido ruminal, urina e fezes, além de permitir a associação desses metabólitos e vias ao consumo alimentar residual (CAR) em bovinos (Karisa et al., 2014; Shabat et al., 2016; Clemmons et al., 2017; Novais et al., 2019; Welch et al., 2020; Liu et al., 2022; Taiwo et al., 2022; Sidney et al., 2023). Essas tecnologias também têm revelado que a microbiota e o metaboloma ruminal estão parcialmente refletidos

nas fezes dos bovinos (Andrade et al., 2020; Malheiros et al., 2021). Além disso, o acesso às fezes dos touros durante o período de confinamento tem se mostrado uma alternativa viável para evitar procedimentos invasivos e obter determinadas bioamostras, como o líquido ruminal.

Os estudos relacionados ao metaboloma fecal de bovinos são limitados (Zhu et al., 2019; Valerio et al., 2020; Chen et al., 2022; Luo et al., 2022; Wang et al., 2022). Além disso, há uma escassez de informações sobre a associação dos metabólitos das fezes e via metabólicas com o CAR de bovinos. Com o objetivo de preencher essa lacuna, o presente estudo investigou o perfil metabolômico das fezes de touros da raça Nelore, selecionados para distintos grupos de consumo alimentar residual (CAR, kg MS/dia), no intuito de identificar possíveis biomarcadores fecais que possam contribuir para o processo de seleção de bovinos eficientes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Inovação em Genética e Nutrição Animal (CIGNA), localizado na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu - SP. O teste de eficiência alimentar foi conduzido de acordo com as diretrizes de bem-estar animal, conforme a Lei Estadual nº 11.977 do Estado de São Paulo, Brasil e realizado por rebanhos de seleção comercial.

2.1 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

108 touros da raça Nelore provenientes de propriedades situadas nos estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais, participantes do Programa de Melhoramento Genético Nelore Qualitas® foi utilizada no presente estudo. O programa utiliza índice de seleção empírico com as seguintes ponderações: 20% da diferença esperada na progênie (DEP) para peso à desmama direto, 40% da DEP para ganho de peso pós-desmama, 20% da DEP para perímetro escrotal e 20% da DEP para musculabilidade aos 450 dias.

Os animais com peso médio ($\pm$ DP) de aproximadamente de $525,00 \pm 56,45$ kg e idade de $662,03 \pm 34,24$ dias foram alojados em quatro baias coletivas (N=27 animais/baia), as quais eram equipadas com cochos eletrônicos da empresa Intergado® (Intergado Ltda., Contagem, Minas Gerais, Brasil). Os bovinos foram submetidos ao período de adaptação à dieta/instalações por 21 dias e posteriormente submetidos ao teste de eficiência alimentar por 56 dias. A dieta foi formulada no programa *Large Ruminant Nutrition System v.1.0.3.3* (LRNS) e fornecida de acordo com o protocolo “*step by step*” na forma de ração total misturada, em duas refeições ao dia, às 08:00h e 16:00h (Tabela 1), com acesso *ad libitum*. Durante o experimento, amostras da dieta foram coletadas semanalmente, secas em estufas com ventilação forçada à temperatura de 55 °C por 72h e moídas em moinhos tipo Willey (peneiras com malhas de 1mm). Posteriormente, foram levadas à estufa por 24 horas a 105 °C para determinação da matéria seca (AOAC, 1995). Ao término do teste, uma amostra de fezes foi coletada diretamente da ampola retal de cada bovino. Essas amostras foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise de metabólica

Tabela 1. Composição da dieta utilizada no teste de eficiência alimentar.

Ingredientes	%MS	%MO
Silagem de milho	32,30	49,49
Bagaço de cana	4,90	4,95
Milho grão úmido	51,21	38,67
Farelo de amendoim	8,92	5,43
Ureia	0,89	0,49
Premix ¹	1,78	0,98
Nutrientes²		
Matéria seca, %	60,00	
Proteína bruta, %	15,60	
Nutrientes digestíveis totais, %	77,00	
Energia metabolizável, Mcal/kg MS	2,77	
Energia líquida de manutenção, Mcal/kg MS	1,84	
Energia líquida de ganho, Mcal/kg MS	1,20	
Fibra detergente neutro, %	26,90	
Carboidratos não fibrosos, %	54,00	
Extrato etéreo, %	3,20	
Cálcio, %	0,60	
Fósforo, %	0,38	

%MS, porcentagem de matéria seca; %MO, porcentagem de matéria orgânica.

¹Composição do premix (kg do produto) 170g Ca, 20g P, 26g Mg, 120g Na, 30g S, 16mg Co, 834mg Cu, 40mg I, 1530mg Mn, 8mg Se, 2276mg Zn, 83333UI Vitamina A, 10.333UI Vitamina D, 266UI Vitamina E, 1.000mg Monensina ²Valores calculados pelo BCNRM (*Nutrient Requirements of Beef Cattle*) 2016.

2.2 FENÓTIPOS E SELEÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais receberam dieta com a proporção volumoso:concentrado de 40:60 para ganho médio diário estimado (GMD, kg/dia) de 1,700 kg/dia. O consumo de matéria seca (CMS, kg MS/dia) nos sistemas de baias coletivas foi obtido pelo registro automático do consumo diário individual e calculado pela multiplicação do consumo individual pela porcentagem de matéria seca (MS, %) da dieta total.

O ganho médio diário (GMD, kg/dia) foi estimado como o coeficiente de regressão linear dos pesos em função dos dias em teste (DIT, dias):

$$y_i = \alpha + \beta * DIT_i + e_i$$

Em que: y_i é o peso do animal na i-ésima observação; α é o intercepto que representa o peso inicial; β é o coeficiente de regressão linear que representa o GMD; e_i é o erro aleatório.

O peso vivo metabólico (PVM, kg) foi obtido por meio da equação:

$$PVM = [\alpha + (DIT_i/2 * GMD_i)]^{0.75}$$

Em que: α é o intercepto; DIT_i é o dia em teste para cada animal i; GMD_i é o ganho médio diário predito para cada animal i.

O consumo alimentar residual (CAR, kg MS/dia) proposto por Koch et al. (1963) foi calculado por meio da regressão fenotípica do consumo de matéria seca (CMS, kg/dia) em função do ganho médio diário (GMD, kg/dia) e peso vivo metabólico (PVM, kg):

$$CMS_i = \beta_0 + \beta_1(GMD_i) + \beta_2(PVM_i) + \varepsilon \text{ (i.e., CAR}_i\text{)},$$

Em que, o CMS_i é o consumo de matéria seca predito para cada animal i; GMD_i é o ganho médio diário do animal i; PVM_i é o peso vivo metabólico do animal i; β_0 é o intercepto da regressão; β_1 é o coeficiente de regressão parcial do GMD; β_2 é o coeficiente de regressão parcial do PVM e ε é o resíduo da equação do animal i (isto é, consumo alimentar residual).

O ganho médio diário residual (GMDR, kg/dia), proposto MacNeil et al. (2011), foi calculado por meio da regressão fenotípica do ganho médio diário

(GMD, kg/dia) em função do consumo de matéria seca (CMS, kg/dia) e peso vivo metabólico (PVM, kg):

$$GMD_i = \beta_0 + \beta_1(CMS_i) + \beta_2(PVM_i) + \varepsilon \text{ (i.e., } GMDR_i),$$

Em que, GMD_i é o ganho médio diário predito para cada animal i ; CMS_i é o consumo de matéria seca do animal i ; PVM_i é o peso vivo metabólico do animal i ; β_0 é o intercepto da regressão; β_1 é o coeficiente de regressão parcial do CMS; β_2 é o coeficiente de regressão parcial do PVM e ε é o resíduo da equação do animal i (isto é, ganho médio diário residual).

A conversão alimentar (CA, kg) foi calculada pela relação do consumo de matéria seca (CMS) por ganho médio diário de cada animal (CMS/GMD) (Brody, 1945), e a eficiência alimentar bruta (EAB, kg) é essa relação inversa, ou seja, GMD/CMS (Schenkel et al., 2004). A CA e EAB são consideradas medidas brutas por não levarem em consideração as diferenças das exigências de manutenção e crescimento dos animais (Mrode et al., 1990; Bishop et al., 1991; Arthur et al., 1996).

Os fenótipos foram analisados com o procedimento PROC GLM disponível no programa estatístico *Statistical Analysis System*® (SAS Institute, Cary, NC, EUA, 2011). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O CAR dos 108 touros foi calculado e utilizado na separação dos dois grupos contrastantes para a análise metabolômica: (1) touros eficientes (<média do CAR -0,5 desvio padrão) (CAR negativo = $-1,19 \pm 0,34$ kg MS/dia; $n = 15$); e (2) touros não eficientes (>média do CAR +0,5 desvio padrão) (CAR positivo = $+1,09 \pm 0,27$ kg MS/dia; $n = 15$).

2.3 METABOLÔMICA

2.3.1 Extração dos metabólitos

Aproximadamente 300 mg de fezes de cada animal foi homogeneizada com o tampão de fosfato de sódio em óxido de deutério (0,10 M, pD 7,4) contendo 0,050% de 3-trimetilsilil-2,2,3,3-d4-propionato de sódio (TMSP-d4, SigmaAldrich). As amostras homogeneizadas foram agitadas por 60 segundos, centrifugadas a $13.000 \times g$ por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi filtrado com membrana de polietersulfona de 25 mm de diâmetro e transferido para novo

microtubo de 2 mL. O volume de 450 uL de sobrenadante foi adicionado em tubo de RMN de 5 mm juntamente com 150 uL de óxido de deutério como descrito em Malheiros et al. (2021).

2.3.2 Aquisição dos espectros por ^1H RMN

Os espectros por ^1H RMN foram adquiridos a 298 K em espectrômetro de 14 T Bruker Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha) equipado com a sonda PABBO de 5 mm. Primeiramente um protocolo foi estabelecido para as amostras de controle de qualidade (CQ) constituída por um *pool* de alíquotas dos extratos metabólicos de fezes (pulso de 90° calibrado e irradiação na frequência da água), e então este protocolo foi realizado em modo totalmente automático usando a rotina Bruker por interface ICON-NMR (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

Os espectros foram adquiridos para próton RMN utilizando pulso de 90° (sequência zg), 64 K data points, com largura espectral de 20,0276 ppm e tempo de aquisição d1 de 2,726 s. Foram adquiridos um ganho de 225, um atraso de reciclagem de 1 seg (*delay*), varredura de 0 (*scans*) e um acúmulo de ns = 16 *transients*. A supressão da água foi obtida pela sequência de pulsos denominada 1D NOESY (Bruker 1D noesygppr1d), utilizando os mesmos dados. Os *free induction decays* foram multiplicados por uma função de multiplicação exponencial de 0,3 Hz antes da transformação de Fourier, somente uma correção de fase de ordem zero será permitida, e o sinal de TMSP-d4 será calibrado em $\delta = 0,00$ ppm por meio do software Topspin Versão 3.6 para análise de RMN (Bruker Inc., Karlsruhe, Alemanha). Os experimentos de RMN bidimensional com as aquisições J-resolved (JRES) RMN, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^1H COSY foram realizados em quatro amostras aleatórias, sendo duas de cada grupo.

2.3.3 Processamento dos dados

Os metabólitos foram identificados e quantificados por meio do *software* Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx, Edmonton, Canada). A RMN bidimensional foi utilizada para confirmar os metabólitos presentes nas amostras. Os

metabólitos identificados foram definidos com base no banco de dados públicos *Bovine Metabolome Database* (BMDB, <https://bovinedb.ca>).

As concentrações dos metabólitos foram analisadas na plataforma *MetaboAnalyst 5.0* (<http://www.metaboanalyst.ca>) por meio de análise de componentes principais (PCA), análise discriminante parcial dos mínimos quadrados (PLS-DA) e importância variável na projeção (VIP score), no intuito de identificar os metabólitos ($p < 0,05$) (Xia et al., 2009 e Xia et al., 2011). A análise das vias metabólicas foi realizada utilizando o banco de dados da espécie *Bos taurus taurus*. A identificação e visualização das vias metabólicas foram realizadas no *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.genome.jp/kegg>).

3. RESULTADOS

O peso inicial (PESOI), final (PESOF), ganho médio diário (GMD) e peso vivo metabólico (PVM) não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tabela 2). Os touros eficientes apresentaram menor consumo de matéria seca (CMS) e conversão alimentar (CA) ($p < 0,05$) em comparação aos touros não eficientes, diferença de 2,29 kg/dia e 1,36 kg entre os tratamentos, respectivamente. A eficiência alimentar bruta (EAB) e o ganho médio diário residual (GMDR) também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais, sendo que touros eficientes apresentam desempenho superior em comparação aos touros não eficientes.

Tabela 2. Médias ajustadas das características de eficiência alimentar de touros da raça Nelore eficientes (CAR negativo) e não eficientes (CAR positivo).

Variáveis	Eficientes (n = 15)	Não eficientes (n = 15)	p-valor
PESOI, kg	515,39 ± 64,94	517,46 ± 46,95	0,5994
PESOF, kg	617,14 ± 64,19	616,86 ± 44,14	0,9777
GMD, kg	1,81 ± 0,42	1,77 ± 0,37	0,7882
PVM, kg	115,96 ± 9,66	116,16 ± 6,79	0,8971
CMS, kg/dia	9,23 ± 0,96 ^b	11,52 ± 0,69 ^a	<,0001
CA, kg	5,28 ± 1,11 ^b	6,64 ± 1,10 ^a	0,0038
EAB, kg	0,19 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,02 ^b	<,0001
CAR kg MS/dia	-1,19 ± 0,34 ^b	1,09 ± 0,27 ^a	<,0001
GMDR kg/dia	0,26 ± 0,36 ^a	-0,19 ± 0,28 ^b	0,0013

*Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. PESOI, peso no início do teste; PESOF, peso no final do teste; GMD, ganho médio diário; PVM, peso vivo metabólico; CMS, consumo de matéria seca; CA, conversão alimentar; EAB, eficiência alimentar bruta; CAR, consumo alimentar residual; GMDR, ganho médio diário residual.

Os espectros de ¹H RMN foram analisados e 56 metabólitos foram identificados e quantificados nas amostras fecais. O metaboloma foi composto por ácido orgânico derivado (28,57%), aminoácido (25,00%), cetoácido/hidroxiácido (14,29%), purina/pirimidina (5,36%), amina (5,36%), açúcar (5,36%), álcool (3,57%), cetona (3,57%), fenol (3,57%), alcaloide, sais de amônio quaternário e sulfona contribuíram com 1,79% cada grupo (Tabela 3). Os metabólitos mais abundantes nas fezes dos touros Nelore independente do grupo experimental, foram os ácidos graxos voláteis de cadeia curta, que incluem acetato, butirato, propionato e valerato.

No presente estudo, 36 metabólitos foram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais de touros eficientes e não eficientes (p<0,05). O grupo de touros eficientes apresentou maior concentração dos metabólitos presentes nas seguintes classes dos ácidos orgânicos derivados (3-hidroxiisovalerato, acetamida, butirato, citrato, formato, isobutirato, propionato, succinato, timol e valerato), aminoácidos (alanina, creatina, creatinina, glicina, isoleucina, leucina, treonina e tirosina), cetoácidos/hidroxiácidos (2-hidroxibutirato, 2-hidroxiisobutirato, 2-oxoglutarato, 3-hidroxibutirato,

acetoacetato, lactato e piruvato), purina/pirimidina (uracila), aminas (dimetilamina) e alcaloide (imidazol) em relação a touros não eficientes ($p < 0,05$). No entanto, os metabólitos presentes na classe dos ácidos orgânicos derivados (acetato, fenilacetato e isovalerato), aminoácidos (betaína e valina), cetoácidos/hidroxiácidos (levulinato), aminas (metilamina) e açúcar (1,3-diidroxiacetona) apresentaram maiores concentrações nos touros não eficientes ($p < 0,05$).

Tabela 3. Concentração dos metabólitos das fezes obtidos para os grupos de touros eficientes (CAR negativo) e não eficientes (CAR positivo) raça Nelore.

Metabólitos	Fórmula	ID ^a	Eficientes (n = 15) ^b	Não eficientes (n = 15) ^b	p-valor
Ácido orgânico derivado					
2-Hidroxiisovalerato	C ₅ H ₁₀ O ₃	BMDB0000407	13,42 ± 2,70	11,45 ± 4,49	0,157
3-Hidroxiisovalerato	C ₅ H ₁₀ O ₃	BMDB0000754	15,67 ± 3,04	7,76 ± 3,29	<0,001
Acetamida	C ₂ H ₅ NO	BMDB0031645	99,49 ± 17,14	86,43 ± 14,09	0,030
Acetato	C ₂ H ₄ O ₂	BMDB0000042	13.974,92 ± 2607,51	14.368,60 ± 2.806,87	0,029
Butirato	C ₄ H ₈ O ₂	BMDB0000039	2.271,19 ± 562,82	1.424,08 ± 151,04	<0,001
Citrato	C ₆ H ₈ O ₇	BMDB0000094	15,74 ± 2,28	11,37 ± 1,71	<0,001
Fenilacetato	C ₈ H ₈ O ₂	BMDB0000209	29,56 ± 7,16	40,41 ± 10,38	0,002
Formato	CH ₂ O ₂	BMDB0000142	29,94 ± 7,46	23,74 ± 4,50	0,010
Fumarato	C ₄ H ₄ O ₄	BMDB0000134	2,38 ± 0,57	2,66 ± 0,80	0,394
Isobutirato	C ₄ H ₈ O ₂	BMDB0001873	168,14 ± 21,72	148,51 ± 22,07	0,020
Isovalerato	C ₅ H ₁₀ O ₂	BMDB0000718	86,49 ± 17,71	115,11 ± 19,62	<0,001
Maleato	C ₄ H ₄ O ₄	BMDB0000176	1,79 ± 0,49	1,39 ± 0,57	0,105
Propionato	C ₃ H ₆ O ₂	BMDB0000237	4.137,71 ± 1.037,60	3.208,75 ± 670,75	0,007
Succinato	C ₆ H ₆ O ₄	BMDB0000254	58,31 ± 8,88	39,94 ± 6,64	<0,001
Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	BMDB0062038	9,01 ± 1,93	6,60 ± 2,03	0,002
Valerato	C ₅ H ₁₀ O ₂	BMDB0000892	213,59 ± 67,86	144,48 ± 28,93	<0,001
Aminoácido					
Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	BMDB0000161	49,78 ± 7,16	42,51 ± 7,69	0,012
Betaína	C ₅ H ₁₂ NO ₂	BMDB0000043	5,24 ± 1,14	6,64 ± 2,12	0,033
Creatina	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	BMDB0000064	17,74 ± 3,62	9,91 ± 1,69	<0,001
Creatina fosfato	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	BMDB0001511	21,75 ± 5,24	18,14 ± 6,62	0,108
Creatinina	C ₄ H ₇ N ₃ O	BMDB0000562	18,93 ± 1,90	13,34 ± 1,91	<0,001
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	BMDB0000123	42,27 ± 10,05	35,42 ± 7,07	0,039
Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	BMDB0000177	6,88 ± 1,32	5,57 ± 1,73	0,136
Isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	BMDB0000172	17,59 ± 3,52	13,71 ± 2,17	<0,001

Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	BMDB0000687	22,59 ± 4,61	15,07 ± 2,97	<0,001
Metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	BMDB0000696	13,41 ± 3,40	13,66 ± 4,77	0,868
Sarcosina	C ₃ H ₇ NO ₂	BMDB0000271	5,74 ± 2,53	5,28 ± 1,72	0,565
Treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	BMDB0000167	41,93 ± 8,78	28,71 ± 4,70	<0,001
Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	BMDB0000158	41,91 ± 10,40	32,58 ± 4,45	0,003
Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	BMDB0000883	17,34 ± 7,17	26,32 ± 3,76	<0,001
Cetoácido/Hidroxiácido					
2-Hidroxi butirato	C ₃ H ₈ O ₃	BMDB0000008	70,59 ± 12,31	61,01 ± 6,27	0,012
2-Hidroxi isobutirato	C ₄ H ₈ O ₃	BMDB0000729	8,33 ± 1,55	6,39 ± 1,84	0,004
2-Oxoglutarato	C ₅ H ₆ O ₅	BMDB0000208	46,97 ± 8,57	29,04 ± 4,82	<0,001
3-Hidroxi butirato	C ₄ H ₈ O ₃	BMDB0000357	31,97 ± 4,47	16,04 ± 3,53	<0,001
Acetoacetato	C ₄ H ₆ O ₃	BMDB0000060	23,51 ± 3,25	12,39 ± 3,19	<0,001
Lactato	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001311	50,97 ± 9,48	41,55 ± 8,69	0,008
Levulinato	C ₅ H ₈ O ₃	BMDB0000720	11,77 ± 3,37	15,87 ± 2,81	<0,001
Piruvato	C ₃ H ₄ O ₃	BMDB0000243	18,43 ± 1,39	14,09 ± 3,41	<0,001
Purina/pirimidina					
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	BMDB0001847	4,07 ± 1,40	4,33 ± 1,94	0,677
Uracila	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	BMDB0000300	29,14 ± 9,13	22,53 ± 6,47	0,030
Xantina	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	BMDB0000292	13,25 ± 3,86	12,92 ± 7,61	0,880
Amina					
Dimetilamina	C ₂ H ₇ N	BMDB0000087	7,98 ± 1,23	6,13 ± 1,79	0,002
Metilamina	CH ₅ N	BMDB0000164	59,02 ± 19,00	71,21 ± 13,00	0,049
Trimetilamina	C ₃ H ₉ N	BMDB0000906	12,40 ± 2,16	9,86 ± 4,46	0,057
Açúcar					
1,3-Diidroxiacetona	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001882	5,65 ± 1,68	9,73 ± 2,09	<0,001
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	BMDB0000122	135,49 ± 14,68	130,79 ± 25,32	0,538
Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	BMDB0000283	92,51 ± 30,75	81,89 ± 42,72	0,440
Álcool					
Etanol	C ₂ H ₆ O	BMDB0000108	431,25 ± 143,84	426,84 ± 225,11	0,949

Metanol	CH ₄ O	BMDB0001875	30,85 ± 8,16	33,17 ± 7,68	0,429
Cetona					
Acetoína	C ₄ H ₈ O ₂	BMDB0000039	14,07 ± 3,12	14,55 ± 5,69	0,776
Acetona	C ₃ H ₆ O ₃	BMDB0001659	10,29 ± 1,64	9,60 ± 1,50	0,243
Fenol					
3-Hidroxmandelato	C ₈ H ₈ O ₄	BMDB0000750	26,05 ± 3,05	23,25 ± 4,78	0,065
3-Hidroxifenilacetato	C ₈ H ₈ O ₃	BMDB0000440	27,34 ± 6,65	26,70 ± 3,10	0,738
Alcaloide					
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	BMDB0001525	33,60 ± 5,91	25,79 ± 2,74	<0,001
Sais de amônio quaternários					
Colina	C ₅ H ₁₄ NO	BMDB0000097	4,32 ± 1,07	4,73 ± 1,44	0,380
Sulfona					
Dimetil sulfona	C ₂ H ₆ O ₂ S	BMDB0004983	3,67 ± 1,41	3,95 ± 1,58	0,605

^aID Bovine Metabolome Database (BMDB).

^bMédia ± desvio padrão.

A análise de componentes principais (PCA) e a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram aplicadas aos espectros de ^1H RMN para visualizar diferenças no perfil metabólico fecal entre os grupos experimentais (Figura 1A e B). Os dois primeiros componentes principais do PCA explicaram 82,7% da variância total. O PLS-DA indicou cobertura de 61,5% definida pelos dois primeiros componentes. Além disso, os parâmetros de validação cruzada (acurácia = 0,78, Q^2 = 0,33 e R^2 = 0,55 para o componente 1 e acurácia = 0,88, Q^2 = 0,58 e R^2 = 0,66 para o componente 2) demonstram uma separação parcial entre as concentrações dos metabólitos pertencentes às fezes dos grupos experimentais.

As pontuações do VIP scores > 1,0 com base no modelo de PLS-DA indicaram 4 metabólitos influentes (Figura 1C). Dentre esses compostos, maiores concentrações de butirato, propionato e valerato foram observadas no grupo de touros eficientes, porém o acetato apresentou maior concentração no grupo de touros não eficientes.

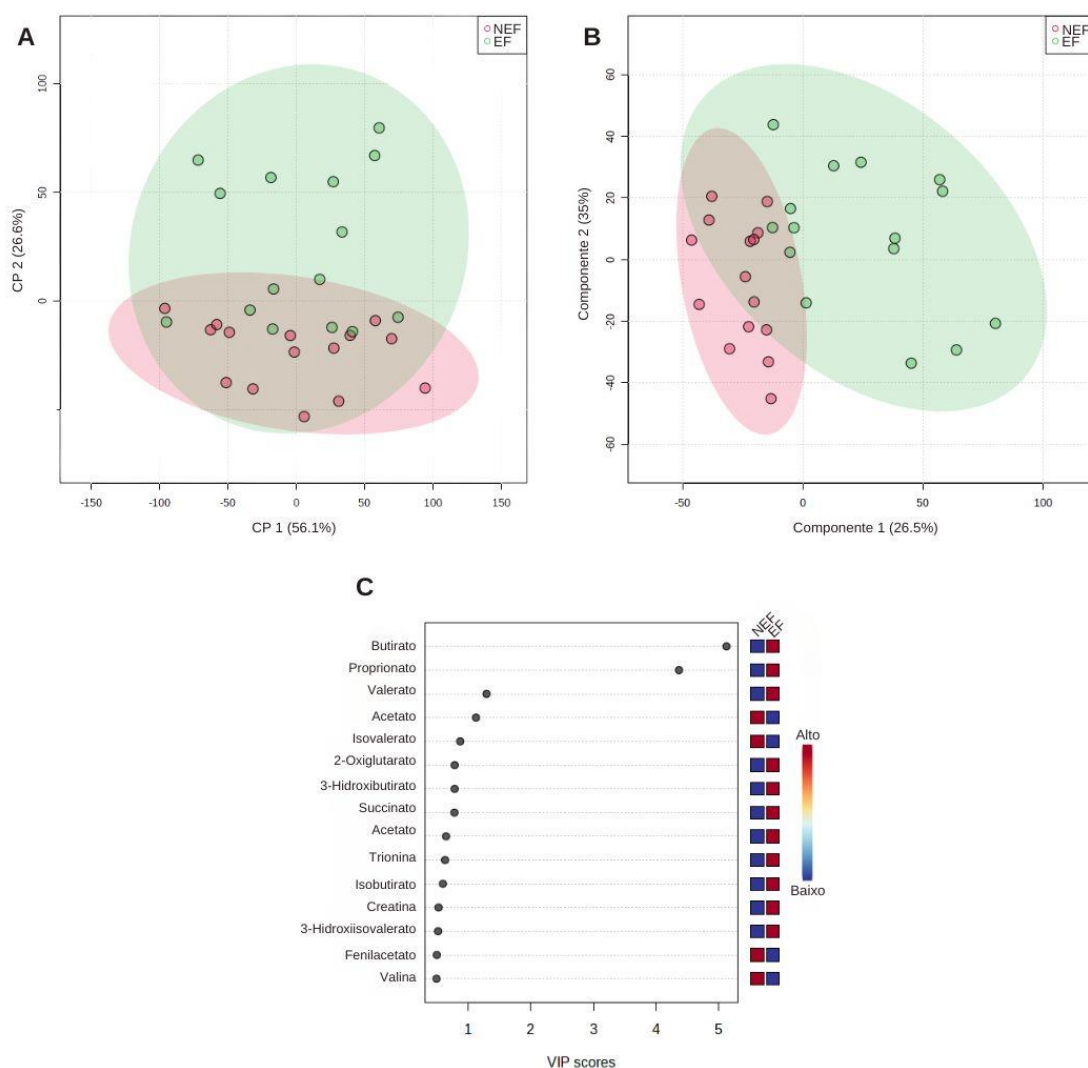


Figura 1. Metaboloma das fezes de touros Nelore separados em eficientes (EF) e não eficientes (NEF). (A) Análise de componentes principais (PCA) dos metabólitos identificados e quantificados nas fezes dos touros por ^1H NMR (cada ponto corresponde a um animal). Ponto vermelho corresponde a touros eficientes e ponto verde equivale a touros não eficientes. (B) Gráfico de pontuação da análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) das fezes de touros Nelore (cada ponto corresponde a um animal). Ponto vermelho corresponde a touros eficientes e ponto verde equivale a touros não eficientes. (C) Gráfico da importância da variável na projeção (VIP scores) dos metabólitos fecais que diferiram entre os grupos de touros eficientes (CAR negativo) e não eficientes (CAR positivo).

A análise de enriquecimento das vias metabólicas foi realizada para avaliar as vias mais relevantes associadas a metabólitos diferenciais nas fezes de touros eficientes e não eficientes. Os metabólitos diferenciais abrangem cinco principais vias bioquímicas ($p > 0,05$ e impacto $> 0,2$), que podem revelar os mecanismos metabólicos das fezes relacionados ao CAR: síntese e degradação de corpos cetônicos (bta00088), biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (bta00400); metabolismo da glicina, serina e treonina (bta00260); ciclo do ácido cítrico (bta00020) e metabolismo do piruvato (bta00620) (Figura 2 e Tabela 4).

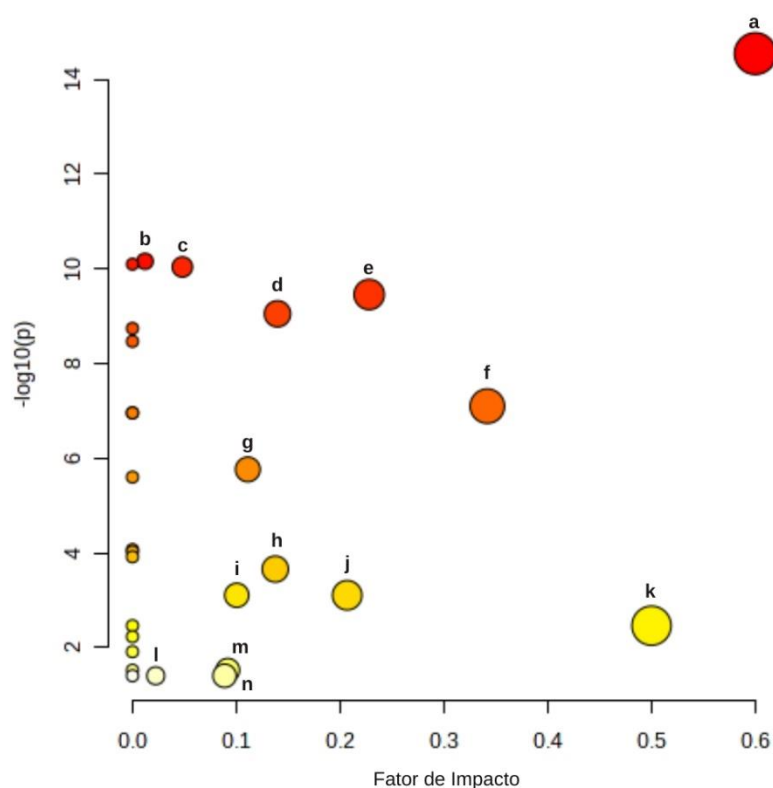


Figura 2. Integração do metaboloma das fezes de touros da raça Nelore. Vias metabólicas dos distintos metabólitos observados nas fezes dos touros Nelore. O eixo x representa o valor do impacto da via calculado a partir da análise topológica da via, e o eixo y é o logaritmo do *P-valor* obtido da análise de enriquecimento da via. A cor do ponto é baseada no p-valor e o raio do ponto é determinado com base em seus valores de impacto de caminho (visualizar a Tabela 4).

Tabela 4. Análise das vias metabólicas das fezes de touros Nelore pertencentes aos grupos contrastantes para o consumo alimentar residual (CAR).

Letra ^a	Via metabólica	Compostos totais ^b	Compostos observados ^c	<i>p</i> -valor ^d	-log(p) ^e	Impacto ^f
a	Síntese e degradação de corpos cetônicos	5	2	<0,001	14,5470	0,60000
b	Metabolismo da arginina e prolina	38	2	<0,001	10,1600	0,01212
c	Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	28	5	<0,001	10,0400	0,04808
d	Metabolismo da tirosina	42	3	<0,001	9,0502	0,13972
e	Ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs)	20	4	<0,001	9,4576	0,22801
f	Metabolismo da glicina, serina e treonina	34	5	<0,001	7,0996	0,34180
g	Metabolismo do butanoato	15	5	<0,001	5,7633	0,11111
h	Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	32	4	<0,001	3,6579	0,13757
i	Glicólise e gliconeogênese	26	2	<0,001	3,1049	0,10044
j	Metabolismo do piruvato	22	2	<0,001	3,1049	0,20684
k	Biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano	4	1	<0,001	2,4622	0,50000
l	Biossíntese primária dos ácidos biliares	46	1	0,0394	1,4037	0,02239
m	Metabolismo da pirimidina	38	1	0,0300	1,5222	0,09182
n	Metabolismo da glutatona	28	1	0,0394	1,4037	0,08873

^aLetra corresponde às informações mostradas na Figura 2.

^bCompostos totais corresponde ao número total de compostos na via metabólica.

^cCompostos observados corresponde ao número realmente correspondido dos dados enviados pelo usuário.

^d*p*-valor foi calculado a partir da análise de enriquecimento.

^e-log(p) corresponde ao logaritmo do *p*-valor.

^fImpacto corresponde ao valor de impacto do caminho calculado a partir da análise de topologia do caminho.

4. DISCUSSÃO

A eficiência alimentar pode ser mensurada de diferentes formas, como CA e EAB. No entanto, é importante ressaltar que essas medidas são brutas e não consideram as diferenças das exigências de manutenção e crescimento dos animais (Nascimento, 2011). Além disso, essas características são altamente correlacionadas com o crescimento e tamanho corporal (Arthur et al., 2001). Portanto, se utilizadas como critério de seleção, essas características podem auxiliar na identificação de animais eficientes, mas a longo prazo podem ocasionar o desenvolvimento de características indesejáveis ao rebanho (Grion et al., 2014).

Diante disso, outras medidas de eficiência, como o CAR e GMDR, foram propostas e têm sido amplamente utilizadas em estudos científicos (Oliveira et al., 2022; Brunes et al., 2023). No entanto, é importante observar que o GMDR pode acarretar um aumento nos gastos com a alimentação, por não ser capaz de identificar diferenças no consumo de alimento (Crowley et al., 2010). Nesse contexto, o CAR tem se destacado em programas de melhoramento animal. Esse fato ocorre, uma vez que é possível identificar animais com menores exigências de manutenção, resultantes do menor CMS, além de manter a constância do GMD (Paulino et al., 2004). Além disso, o CAR apresenta independência em relação às características de crescimento e tamanho corporal, devido a sua equação de predição. Isso se deve porque as correlações entre o CAR, GMD e PVM são nulas, de acordo com a definição estatística, onde a covariância entre o resíduo e as variáveis preditoras é zero (Branco et al., 2009).

No presente estudo, os animais eficientes (CAR negativo) apresentaram melhores desempenhos em termos de CA, EAB e GMDR. Isso indica que esses touros foram capazes de converter a quantidade de alimento consumido em ganho de peso de forma mais eficiente em comparação aos touros não eficientes (CAR positivo). Adicionalmente, os touros eficientes também demonstraram um menor CMS. Esse resultado reforça a informação anterior de que esses animais conseguiram obter um bom ganho de peso consumindo menores quantidades de alimento em comparação ao outro grupo experimental. No entanto, não foi observado diferenças nas características de crescimento como PESOI, PESOF,

GMD e PVM entre os grupos experimentais. Esses resultados podem ser explicados pela baixa correlação existente entre essas características com o CAR (Arthur et al., 2001; Del Claro et al., 2012).

No entanto, o CAR é uma característica complexa e influenciada por uma ampla gama de genes. Devido a essa complexidade, estudos recentes têm se dedicado a identificar associações entre os metabólitos e vias metabólicas relacionadas ao CAR em bovinos (Karisa et al., 2014; Shabat et al., 2016; Clemmons et al., 2017; Novais et al., 2019; Welch et al., 2020; Liu et al., 2022; Sidney et al., 2022; Taiwo et al., 2022). Entretanto, muitos desses estudos utilizam métodos invasivos para obtenção das amostras, ou realizam coletas após o abate dos animais (Shabat et al., 2016; Welch et al., 2020; Liu et al., 2022; Sidney et al., 2022). Desse modo, no intuito de adotar uma metodologia não invasiva em touros, optamos por trabalhar com amostras de fezes. Embora os estudos que exploram o metaboloma fecal ainda sejam escassos, pesquisas anteriores já demonstraram relação entre o microbioma e o metaboloma ruminal e fecal de bovinos (Andrade et al., 2020; Malheiros et al., 2021).

Dentre os metabólitos observados, os ácidos graxos de cadeia curta (AGVs) como acetato, butirato, propionato e valerato, desempenham um papel fundamental no metabolismo de ruminantes, pois são importantes precursores da síntese de glicose e gordura. Esses são responsáveis por fornecer até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes (Bergman, 1990). No presente estudo, a dieta utilizada era rica em carboidratos não-fibrosos de fácil fermentação. Esses carboidratos, podem auxiliar no aumento da atividade microbiana no rúmen, e acarretar na redução do pH ruminal, resultando em uma maior produção desses metabólitos (Church, 1988; Bergman, 1990; Pinedo et al., 2008). Devido a diminuição do pH ruminal, ocorre um aumento na proporção de ácidos graxos livres e, consequentemente, uma maior absorção desses AGVs para a corrente sanguínea (Quigley et al., 1991). No entanto, há um ponto de saturação em que a absorção desses AGVs é limitada, o que pode levar a uma maior excreção desses metabólitos nas fezes dos touros.

Como mencionado anteriormente, os estudos que investigam a associação entre o CAR e o metaboloma fecal são escassos. Devido a esse fato,

os resultados aqui observados podem ser comparados a estudos similares que avaliaram a associação do metaboloma do líquido ruminal com o CAR. Os nossos resultados corroboram aos obtidos por Shabat et al. (2016) em amostras de líquido ruminal de bovinos da raça Holandês, no qual os AGVs, butirato, propionato e valerato foram observados em maiores concentrações em animais eficientes. Por outro lado, Liu et al. (2022) não encontraram diferenças nos metabólitos de animais eficientes e não eficientes ao avaliar o líquido ruminal de novilhas da raça Angus. Além disso, um estudo realizado por Welch et al. (2020) analisou bioamostras de líquido ruminal e fezes de bovinos da raça Angus.

Estudos indicaram relação direta entre a eficiência alimentar e a disponibilidade de energia para os ruminantes, influenciada pela microbiota ruminal. Essa microbiota é responsável pela atividade fermentativa e consequentemente produção de AGVs (Jeweel et al., 2015; Kenny et al., 2018; Liu et al., 2022). Esses ácidos graxos são importantes fontes de energia para o animal e desempenham um papel crucial na eficiência do processo de fermentação ruminal e na utilização dos nutrientes da dieta.

No presente estudo, observou-se que o butirato estava presente em maiores concentrações nos animais eficientes. Segundo Jeweel et al. (2015) e Shabat et al. (2016), animais eficientes apresentam maior população de *Lachnospiraceae*, as quais são grandes produtoras de butirato (Meehan e Beiko, 2014). Além disso, de acordo com Zhang et al. (2013), dietas com altos teores de carboidratos não-fibrosos prontamente fermentáveis têm sido associadas ao favorecimento do crescimento de microrganismos pertencentes à essa família. No entanto, esses estudos utilizaram distintas intervenções nutricionais e raças, o que pode ter acarretado alterações nos metabólitos de bovinos eficientes e não eficientes. Dietas ricas em carboidratos-fibrosos, como a utilizada por Liu et al. (2022), não apresentaram diferenças significativas nos metabólitos entre animais eficientes e não eficientes. Por outro lado, estudos como o de Shabat et al. (2016) e Welch et al. (2020), os quais utilizaram dietas ricas em carboidratos não-fibrosos, revelaram diferenças nos metabólitos identificados entre animais eficientes e não eficientes. Esses achados ressaltam a importância de considerar

a composição da dieta ao investigar a associação entre os metabólitos fecais e a eficiência alimentar dos bovinos.

Animais não eficientes apresentaram maior concentração de acetato em comparação aos animais eficientes. Esse resultado pode ser explicado pela ordem de metabolização dos ácidos graxos voláteis no rúmen, onde o acetato é metabolizado primeiro, seguido pelo propionato e, por fim, o butirato (Barcroft et al., 1994; Sehested et al., 1999a; Sutton et al., 1963). Portanto, é possível que os touros eficientes já tivessem metabolizado o acetato e o propionato, estando em estágio de metabolização do butirato, enquanto os animais não eficientes ainda estavam no processo de metabolização do acetato. Esses resultados indicam que os animais eficientes apresentaram uma taxa de metabolização mais rápida em comparação aos não eficientes, o que pode contribuir para uma melhor utilização dos AGVs e, consequentemente, para uma maior eficiência alimentar.

O CAR é um indicador de eficiência metabólica, uma vez que está relacionado às necessidades energéticas básicas e às diferenças na eficiência de crescimento. Quanto mais eficiente for a conversão de nutrientes em energia, mais eficiente será o animal (Baldwin et al., 1980; Richardson e Herd, 2004). No presente estudo, identificamos cinco vias metabólicas principais associadas a metabólitos distintos nas fezes de touros eficientes e não eficientes (conforme apresentado na Tabela 4).

Dentre essas vias, destaca-se a via da síntese e degradação de corpos cetônicos. Os corpos cetônicos são produtos da degradação dos AGVs, que foram encontrados em maior concentração em ambos os grupos experimentais. No entanto, é possível que esses corpos cetônicos tenham sido metabolizados de forma mais rápida nos animais mais eficientes. Alta eficiência nessa via metabólica pode indicar maior capacidade da utilização de reservas de gordura como fonte de energia (Marzzoco e Torres, 2007). Isso pode levar a uma melhor eficiência alimentar, uma vez que a gordura é uma fonte mais densa de energia, fornecendo 2,25 Mcal/kg a mais do que os carboidratos (Medeiros et al., 2015). Desta forma, os bovinos podem converter mais eficientemente a energia armazenada em ganho de peso.

A via da biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano também foi identificada em nosso estudo. Tanto a fenilalanina quanto a tirosina desempenham papel fundamental na síntese de neurotransmissores, hormônios e pigmentos (Corsino, 2009). Já o triptofano, um aminoácido essencial, é um precursor importante para a produção de serotonina, melatonina e niacina (vitamina B3) (Alves, 2004; Corsino, 2009). A fenilalanina é um aminoácido essencial e limitante, onde a sua disponibilidade pode limitar a síntese proteica, e conseqüentemente, o crescimento do animal (Alves, 2004; Kaufman e Luppig, 1982). A disponibilidade adequada desses aminoácidos é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos animais, bem como para a síntese de moléculas importantes em várias vias metabólicas (Rossi e Tirapegui, 2003).

A via do metabolismo da glicina, serina e treonina desempenha um papel importante no fornecimento de aminoácidos glicogênicos, que podem ser convertidos em glicose e utilizados como fonte de energia. Além disso, esses aminoácidos estão envolvidos em diversas outras vias metabólicas e processos fisiológicos essenciais, como a síntese de proteínas e a atuação como precursores na síntese de outros compostos (González e Silva, 2022). Outras vias observadas foram a do ciclo do ácido cítrico, também conhecida como ciclo de Krebs, e a via do metabolismo do piruvato. O ciclo do ácido cítrico ocorre nas mitocôndrias das células e está envolvida na oxidação completa de moléculas de carboidratos, gorduras e aminoácidos. Durante esse ciclo, o piruvato, produto final da glicólise, presente em maior concentração nos animais eficiente desse experimento, é convertido em acetil-CoA, o qual entra no ciclo para a produção de energia na forma de ATP (González e Silva, 2022). O metabolismo do piruvato desempenha um papel fundamental na conversão do piruvato em diversos produtos metabólicos, como o acetil-CoA, lactato, oxaloacetato e alanina, de acordo com as condições metabólicas e as demandas energéticas da célula (González e Silva, 2022).

As vias metabólicas evidenciadas no presente estudo indicam uma maior eficiência nos processos de síntese de aminoácidos e produção de energia. Esses processos são essenciais para sustentar as atividades metabólicas, promover a síntese de proteínas e fornecer a energia necessária para o

crescimento muscular. Os aminoácidos desempenham um papel crucial como substratos na construção das proteínas, que por sua vez são fundamentais para o crescimento muscular. Dessa forma, a eficiência desses processos metabólicos sugere que animais mais eficientes têm maior aproveitamento de energia, proporcionando melhores condições para o ganho de peso e crescimento. Esses achados destacam a importância de promover a eficiência metabólica na pecuária, visando otimizar a produção animal de forma sustentável.

5. CONCLUSÃO

Touros eficientes e não eficientes da raça Nelore apresentam diferenças significativas na concentração de metabólitos fecais, especialmente nos ácidos graxos voláteis acetato, butirato e propionato. Animais eficientes demonstraram uma taxa de metabolização mais acelerada em comparação aos não eficientes, indicando uma maior capacidade de aproveitamento desses ácidos graxos voláteis e, conseqüentemente, uma maior eficiência alimentar.

Esses resultados ressaltam o potencial do metaboloma fecal, especialmente a concentração dos ácidos graxos voláteis, como biomarcadores para avaliar e selecionar animais com maior eficiência na conversão de alimentos. Essas descobertas são de suma importância para a indústria pecuária, uma vez que viabilizam a identificação de animais com maior capacidade de aproveitamento dos nutrientes da dieta, o que resulta em uma produção animal eficiente e sustentável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves DD (2004) Nutrição aminoacídica de bovinos. **Revista Brasileira de Agrociência** 10:265-271.

Andrade BGN, Bressani FA, Cuadrado RRC, Polyana CT, Oliveira PSN, Mourão GB, Coutinho LL, Reecy JM, Koltjes JE, Walsh P, Berndt A, Palhares JCP, Regitano LCA (2022) The structure of microbial populations in Nelore GIT reveals inter-dependency of methanogens in feces and rumen. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 11:1-10.

AOAC (Eds.16) (1995) Official Methods of Analysis. **Arlington: AOAC International**, 102p.

Artegoitia VM, Foote AP, Lewis RM, Freetly HC (2017) Rumen fluid metabolomics analysis associated with feed efficiency on crossbred steers. **Scientific Reports** 7:1-14.

Arthur PF, Archer JA, Johnston DJ, Herd RM, Richardson EC, Parnell PF (2001) Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science** 79:2805-2811.

Arthur PF, Herd RM, Wright J, Xu G, Dibley K, Richardson EC (1996) Net feed conversion efficiency and its relationship with other traits in beef cattle. In: **Proceedings of the Australian Society of Animal Production** 21, 107-110.

Baldwin RL, Smith NE, Taylor J, Sharp M (1980) Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. *Journal of animal science* 51:1416–1428.

Barcroft J, Mcanally RA, Phillipson AT (1944) Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. *Journal of Experimental Biology* 20:120-129.

Basarab JA, Price MA, Aalhus JL, Okine EK, Snelling WM, Lyle KL (2003) Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science** 83:189-204.

Benedeti PDB, Detmann E, Mantovani HC, Bonilha SFM, Serão NVL, Lopes DRG, Silva W, Newbold CJ, Duarte MS (2018) Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) with high residual feed intake have increased the expression of genes involved in oxidative phosphorylation in rumen epithelium. **Animal Feed Science and Technology** 235:77-86.

Bergman EM (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews** 70:567-590.

Bishop MD, Davis ME, Harvey WR, Wilson GR, VanStavern BD (1991) Divergent selection for postweaning feed conversion in Angus beef cattle: II.

Genetic and phenotypic correlations and realised heritability estimates. **Journal of Animal Science** 69:4360-4367.

Branco AF, Mouro GF, Harmon DL, Coneglian SM, Maia FJ, Prohmann PE, Paris W (2009) Fluxo portal de nutrientes em ovinos alimentados para manutenção com dietas contendo diferentes níveis de volumosos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 10:1010-1018.

Brody S (1945) Bioenergetics and growth: with special reference to the efficiency complex in domestic animals. **New York: Reinhold Publishing Corporation**, 1023p.

Brunes LC, Faria CU, Magnabosco CU, Lobo RB, Peripolli E, Aguilar I, Baldi F (2023) Genomic prediction ability and genetic parameters for residual feed intake calculated using different approaches and their associations with growth, reproductive, and carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Applied Genetics** 64:159-167

Capper JL, Hayes DJ (2012) The environmental and economic impact of removing growth-enhancing technologies from US beef production. **Journal of Animal Science** 90:3527-3537,

Chen Y, Hu G, Shao T, Zhang D, Zhao Y (2022) Dynamic changes in the fecal bacterial community during the growth of beef cattle. **Animals** 12:136.

Church, DC (1988) The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. **New Jersey: Prentice-Hall** 564p

Clemmons BA, Mihelic RI, Beckford RC, Powers JB, Melchior EA, McFarlane ZD, Cope ER, Embree MM, Mulliniks JT, Campagna SR (2017) Serum metabolites associated with feed efficiency in black angus steers. **Metabolomics** 13:147

Corsino PE (2009) Bioquímica. **Editora UFMS**, 213p.

Crowley JJ, Mcgee M, Kenny DA, Crews Jr DH, Evans RD, Berry DP (2010) Phenotypic and genetic parameters for different measures of feed efficiency in different breeds of Irish performance-tested beef bulls. **Journal of Animal Science** 3:885-894.

Damiran D, Penner GB, Larson K, Lardner HA (2018) Use of residual feed intake as a selection criterion on the performance and relative development costs of replacement beef heifers. **The Professional Animal Scientist** 34:156-166.

Del Claro AC, Mercadante MEZ, Silva JAV (2012) Meta análise de parâmetros genéticos relacionados ao consumo alimentar residual e a suas características componentes em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47(2):302-310.

Duarte DAS, Newbold CJ, Detmann E, Silva FF, Freitas PHF, Veroneze R, Duarte MS (2019) Genome-wide association studies pathway-based meta-analysis for residual feed intake in beef cattle. **Animal Genetics** 50:150-153.

González FHD, Silva SC (2022) Introdução à bioquímica clínica veterinária. **Editora UFRGS**, 568p.

Grion AL, Mercandante MEZ, Cyrillo JNSG, Bonilha SFM, Magnani E, Branco RH. (2014) Selection for feed efficiency traits and correlated genetic responses in feed intake and weight gain of Nellore cattle. **Journal of Animal Science** 92:955-965.

Herd RM, Oddy VH, Richardson EC (2004) Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 44:423-430.

Jewell KA, McCormick CA, Odt CL, Weimer PJ, Suen G (2015) Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. **Applied and Environmental Microbiology** 81:4697-4710.

Jung US, Kim MJ, Wang T, Lee JS, Jeon SW, Jo NC, Kim WS, Baik M, Lee HG (2017) Upregulated heat shock protein beta-1 associated with caloric restriction and high feed efficiency in longissimus dorsi muscle of steer. **Livestock Science** 202:109:114.

Karisa BK, Thomson J, Wang Z, Li C, Montanholi YR, Miller SP, Moore SS, Plastow GS (2014) Plasma metabolites associated with residual feed intake and other productivity performance traits in beef cattle. **Livestock Science** 165:200-211.

Kaufman W, Luppig W (1982) Protected proteins and protected amino acids for ruminants. Application to Feed Formulation. **Butterworths**, p.36-68.

Kenny DA, Fitzsimons C, Waters SM, Mcgee M (2018) Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle the current state of the art and future challenges. **Animal** 12:1815–1826.

Koch RM, Swiger LA, Chambers D, Gregory KE (1963) Efficiency of feed use in beef cattle, **Journal of Animal Science** 22:486-494.

Liu H, Zhang Y, He S, Li X (2022) Metabolomics analysis of plasma in beef cattle with divergent feed efficiency. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 106:961-969.

Lopes DRG, Duarte MS, Reau AJL, Chaves IZ, Mendes TAO; Detmann E, Bento CBP, Mercadante MEZ, Bonilha SFM, Suen G, Mantovani (2021) Assessing the relationship between the rumen microbiota and feed efficiency in Nellore steers. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 12:79.

Luo G, Huang Y, Yu P, Lin X, Fang X, Wang Z, Chen Z (2022) Fecal microbial and metabolic features associated with ruminal methane emissions in beef cattle. **Science of the Total Environment** 806:150663.

MacNeil MD, Lopez-Villalobos N, Northcutt SL (2011) A prototype national cattle evaluation for feed intake and efficiency of Angus cattle. **Journal of Animal Science** 89:3917-3923.

Malheiros JM, Correia BSB, Ceribeli C, Cardoso DR, Colnago LA, Junior SB, Reecy JM, Mourão GB, Coutinho LL, Palhares JCP, Berndt A, Regitano LC (2021) Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (*Bos indicus*). **Scientific Reports** 11:12752.

Marzzoco A, Torres BB (2007) Bioquímica básica. **Guanabara Koogan** p.386.

Medeiros SR, Gomes RC, Bungenstab DJ (2015) Nutrição de bovinos de corte: Fundamentos e aplicações. **Embrapa**, p.14.

Meehan CJ, Beiko RG (2014) A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. **Genome Biology and Evolution** 6:703-713.

Mrode RA, Smith C, Thompson R (1990) Selection for rate and efficiency of lean gain in Hereford cattle. 2. Evaluation of correlated responses. **Animal Science** 51:35-46.

Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA, Freetly HC (2015) Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. **Springerplus** 4:1-13.

Nascimento ML (2011) Eficiência alimentar e suas associações com lucro, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos Nelore. 2011. 118p. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura (Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Nkrumah JD, Okine EK, Mathinson GW, Schmid K, Li C, Basarab JA, Price MA, Wang Z, Moore SS (2006) Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 84:145-153.

Novais FJ, Pires P, Alexandre PA, Dromms RA, Iglesias AH, Ferraz JB, Styczynski MPW, Fukumasu H (2019) Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics** 20:1-10.

Oliveira MHV, Malheiros JM, Ospina AMT, Dominguez-Castaño P, Benfica LF, Correia LECS, Gaya LG, Mercadante MEZ, Castilhos AM, Cyrillo JNSG, Sartori JB, Albuquerque LG, Silva JAIIV (2022) Analysis of residual feed intake in Nelore bulls of different ages, rib eye area, and backfat thickness. **Tropical Animal Health and Production** 54:295.

Oliveira PSN, Cesar ASM, Nascimento ML, Chaves AS, Tizioto PC, Tullio RR; Lanna DPD, Rosa AN, Sonstegard TS, Mourao GB, Reecy JM, Garrick DJ, Mudadu MA, Coutinho LL, Regitano LCA (2014) Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. **BMC Genetics** 15:100.

Paulino PV, Castro FC, Magnabosco AC, Sainz RD (2004) Performance and residual feed intake differences between steers housed in individual or group pens. **Journal of Animal Science** 88:324-329.

Pinedo LA, Ribeiro JL, Najm MH, Faustino MG, Santos VP (2008) Aplicação de técnicas para estudos de avaliação de alimentos in vitro e in situ para ruminantes. **Pubvet** 2:2008.

Quigley III JD, Caldwell LA, Sinks GD, Heitmann (1991) Changes in blood glucose, nonesterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves. **Journal of Dairy Science** 74:250-257.

Richardson ECA, Herd RMB (2004) Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection Cooperative Research Centre for Cattle and Beef Quality. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 44:431-440.

Rossi L, Tirapegui J (2004) Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** 48:227-233.

Schenkel FS, Miller SP, Wilton JW (2004) Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science** 84:177-185.

Sehested J, Diernaes L, Moller PD, Skadhauge E (1999) Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology** 123:399-408.

Shabat SK, Sasson G, Doron-Faigenboim A, Durman T, Yaacoby S, Berg Miller ME, White BA, Shterzer N, Mizrahi I (2016) Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal** 10:2958-2972.

Sidney T, Taiwo G, Idowu M, Amusan I, Cervantes AP, Ogunade I (2023) Rumen fluid amine/phenol-metabolome of beef steers with divergent residual feed intake phenotype. **Ruminants** 3:1-8.

Sutton JD, McGilliard AD, Richard M, Jacobson NL (1963) Functional development of rumen mucosa. II. Metabolic activity. **Journal of Dairy Science** 46:530-537.

Taiwo G, Idowu M, Sidney T, Morenikeji OB, Ogunade IM (2022) Urine metabolome reveals candidate biomarkers for divergent residual feed intake in beef cattle. **Urine** 4:7-13.

Tizioto PC, Coutinho LL, Oliveira PSN, Cesar ASM, Diniz WJS, Lima AO, Rocha MI, Decker JE, Schnabel RD, Mourão GB, Tullio RR, Zerlotini-Neto A, Taylor JF, Regitano LCA (2016) Gene expression differences in Longissimus muscle of

Nelore steers genetically divergent for residual feed intake. **Scientific Reports** 6:1-12,

Valerio A, Casadei L, Giuliani A, Valerio M (2020) Fecal metabolomics as a novel noninvasive method for short-term stress monitoring in beef cattle. **Journal of Proteome Research** 19:845-853.

Wallace RJ, Snelling TJ, McCartney CA, Tapio I, Strozzi F (2017) Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. **Genetic Selection Evolution** 49:9-20.

Wang Z, Wu Q, Sun Q, Peng Q, Wang L, Zhao W, Wang W (2022) Composition, predicted functions, and potential correlations with host phenotypes of rumen and fecal microbiota in beef cattle. **Frontiers in Microbiology** 13:642062.

Welch BC, Lourenco JM, Davis DB, Krause TR, Carmichael MN, Rothrock MJ, Pringle TD, Callaway, TR (2020) The impact of feed efficiency selection on the ruminal, cecal, and fecal microbiomes of Angus steers from a commercial feedlot. **Journal of Animal Science** 98:230.

Widmann P, Reverter A, Weikard R, Suhre K, Hammon HM, Albrecht E, Kuehn C (2015) Systems biology analysis merging phenotype, metabolomics and genomic data identifies non-SMC condensing I complex, subunit G (NCAPG) and cellular maintenance processes as majores contributors to genetic variability in bovine feed efficiency. **Plos One** 10:0124574.

Willams OW, Miller SP, Wood BJ (2013) Aspects of selection for feed efficiency in meat producing poultry. **World's Poultry Science Journal** 69:77-88.

Williams CB (2010) Application of biological simulation models in estimating feed efficiency of finishing steers. **Journal of Animal Science** 88:2523-2529.

Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS (2011) Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics** 9:280-299.

Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research** 37:652-660.

Xue MY, Xie YY, Zhong Y, Ma XJ, Sun HZ, Liu JX (2022) Integrated meta-omics reveals new ruminal microbial features associated with feed efficiency in dairy cattle. **Microbiome** 10:32.

Zhang R, Zhu W, Zhu W, Liu J, Mao S (2013) Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 94:1886-1895.

Zhu C, Li C, Wang Yaning, Laghi L (2019) Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolites** 9:41.