

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA NÃO-
DEGRADÁVEL NO RÚMEN SOBRE O CONSUMO,
METABOLISMO E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS
NELORE RECRIADOS A PASTO NO PERÍODO DAS SECAS**

**Ana Veronica Lino Dias
Zootecnista**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA NÃO-
DEGRADÁVEL NO RÚMEN SOBRE O CONSUMO,
METABOLISMO E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS
NELORE RECRIADOS A PASTO NO PERÍODO DAS SECAS**

Ana Veronica Lino Dias

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadoras: Dra. Juliana Duarte Messana

Dra. Yury Tatiana Granja-Salcedo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

D541i

Dias, Ana Veronica Lino

Influência da suplementação com proteína não-degradável no rúmen sobre o consumo, metabolismo e microbiota ruminal de bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas / Ana Veronica Lino Dias. -- Jaboticabal, 2021
87 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Telma Teresinha Berchielli

Coorientadora: Juliana Duarte Messana

1. Nutrição animal. 2. Rúmen Microbiologia. 3. Aminoácidos na nutrição animal. 4. Metabolismo. 5. Suplementos dietéticos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA NÃO-DEGRADÁVEL NO RÚMEN SOBRE O CONSUMO, METABOLISMO E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS NELORE RECRIADOS A PASTO NO PERÍODO DAS SECAS

AUTORA: ANA VERÔNICA LINO DIAS

ORIENTADORA: TELMA TERESINHA BERCHIELLI

COORIENTADORA: JULIANA DUARTE MESSANA

COORIENTADORA: YURY TATIANA GRANJA-SALCEDO

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

Juliana Duarte Messana

Pos-doutoranda JULIANA DUARTE MESSANA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Juliana Duarte Messana

Dr. PABLO DE SOUZA CASTAGNINO (Participação Virtual)
Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ - Unesp - Botucatu

Juliana Duarte Messana

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

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Veronica Lino Dias, nascida em 17 de agosto de 1994 na cidade de Mogi Mirim, estado de São Paulo. Filha de Antônia Marina Lino e Clésio Macedo Dias. Possui graduação em Zootecnia (2014 - 2018), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Campus de Jaboticabal. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica CNPq sob a orientação da professora Dra. Telma Teresinha Berchielli. Em agosto de 2019 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de nutrição e alimentação animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Campus de Jaboticabal, sob a orientação da professora Dra. Telma Teresinha Berchielli e coorientação da Dra. Juliana Duarte Messana e Dra. Yury Tatiana Granja-Salcedo, sendo bolsista FAPESP (processo 2019/21280-8).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, saúde e todas as bênçãos que Ele tem gerado em minha vida.

A minha mãe, por toda paciência, amor incondicional e encorajamento.

A toda minha família, em especial ao meu pai e minha irmã, por todo amor e apoio.

Ao meu amor, Guilherme, por sempre acreditar em meu potencial, me apoiar sempre e por sempre me ajudar a me manter firme e forte.

Ao meu sobrinho Theo, por ser minha alegria e um presente em minha vida.

A Aparecida Auxiliadora Silva, por sempre estar torcendo e orando por mim, obrigada por todo o carinho e amor!

A minha orientadora Prof.^a Dr^a Telma Teresinha Berchielli, pela confiança em meu trabalho, por todas as oportunidades e orientação durante minha graduação e mestrado. Muito obrigado!

As minhas co-orientadoras Dr^a Juliana Duarte Messana e Dr^a Yury Tatiana Granja-Salcedo pela orientação, paciência, ensinamentos e carinho para comigo sempre.

Ao Prof. Dr Ricardo Andrade Reis pelas valiosas considerações e sugestões em minha qualificação e por todo o ensinamento. Assim como a Dr^a Ana Rebeca Castro Lima, muito obrigada por toda ajuda!

A todos os professores que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, em especial aos professores Ricardo Andrade Reis, Flavio Dutra de Resende, Hrasilva Borba, Luciano Hauschild, Izabelle Molina, Yury Tatiana Granja-Salcedo, Telma Teresinha Berchielli e Euclides Braga Malheiros pelos conhecimentos transmitidos nas suas respectivas disciplinas

Ao Grupo de Estudos em Nutrição de Ruminantes (GENRU), por toda a experiência e ensinamentos adquiridos. A todos os membros do grupo: Karine Dalla Vecchia, Geovany Carvalho, Kênia Alves, Paloma Gonçalves, Larissa Coelho, Ana Rebeca Lima, Liziane Brito, Lorryny Galoro, João Marcelo Sanchez, Juliana Duarte, Elisabeth Machado, Yasmin Andrade, Maria Júlia Ganga, Paulo Detogni, Willian Souza e Thayna Ribeiro, por cada ajuda e vivência.

Ao funcionário do setor, Vlademir por toda ajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Ana Paula e Sr. Orlando por todo auxílio e amizade.

Ao Dr. Vinícius Carneiro por todos os ensinamentos e ajuda.

As minhas amigas, Tainá Marchi, Marília Andrade, Gilmara Alves e Karina Petri.

A amiga que Jaboticabal me deu, Karine Della Vecchia, meu muito obrigada por toda ajuda, por me ouvir e aconselhar sempre.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal, ao programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Departamento de Zootecnia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 2019/21280-8).

Sumário

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS.....	iii
1.1. Introdução	1
1.2. Suplementação proteica de bovinos em pastagens tropicais	2
1.2.1. Perfil de aminoácidos da proteína metabolizável por ruminantes	4
1.2.2. Impacto da proteína sobre a diversidade microbiana ruminal	6
2. Objetivo.....	10
3. Referências	10
CAPÍTULO 2 – Suplementação com nitrogênio não proteico ou proteína não-degradável no rúmen e seu efeito no metabolismo e diversidade microbiana ruminal em novilhos Nelore criados em pastos de baixa qualidade.....	19
1.Introdução.....	20
2.Material e Métodos	21
2.1. Local, animais e duração do experimento	21
2.2. Dietas experimentais.....	22
2.3. Amostragem do pasto e do suplemento	24
2.4. Consumo e digestibilidade.....	24
2.5. Parâmetros ruminais.....	26
2.6. Diversidade bacteriana ruminal	26
2.7. Análise estatística	28
3.Resultados.....	28
4.Discussão	42
5.Conclusão	42
6.Referências.....	42
CAPÍTULO 3- Eficiência do uso de aminoácidos em bovinos suplementados com diferentes fontes de N em pasto de baixa qualidade	49
1. Introdução	50
2. Material e Métodos.....	51
2.1. Animais e delineamento experimental.	52
2.2. Dietas experimentais	52
2.3. Consumo, digestibilidade e fluxo.....	55
2.4. Parâmetros sanguíneos	57

2.5. Análise de aminoácidos	57
2.6. Cálculos	58
2.7. Análise estatística	59
3. Resultados.....	59
4.Discussão	65
5.Conclusão	69
6.Referências.....	69



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Impacto da proteína metabolizável na produção de bovinos de corte e emissão de gases do efeito estufa"**, protocolo nº 16.688/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Telma Teresinha Berchielli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de novembro de 2016.

Vigência do Projeto	01/03/2017 a 01/03/2022
Espécie / Linhagem	<i>Bos indicus</i> (Bovino Nelore)
Nº de animais	112
Peso / Idade	200 kg
Sexo	Machos
Origem	Fazenda

Jaboticabal, 04 de novembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNA NÃO-DEGRADÁVEL NO RÚMEN SOBRE O CONSUMO, METABOLISMO E MICROBIOTA RUMINAL DE BOVINOS NELORE RECRIADOS A PASTO NO PERÍODO DAS SECAS

RESUMO - Este experimento teve como objetivo avaliar a influência da suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) ou com proteína não degradável no rúmen (PNDR) sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, parâmetros ruminais e sanguíneos, utilização de aminoácidos e microbiota ruminal de bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas. Foram utilizados 8 novilhos Nelore ($263 \pm 48,69$ kg de peso corporal), alocados em piquetes de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, dispostos em quatro quadrados latinos 2×2 (2 tratamentos e 2 períodos) balanceados para efeitos residuais. Foram utilizados dois tipos de suplementação: sal mineral e ureia como fonte de NNP; ou glúten de milho como fonte de PNDR com adição de sal mineral. O consumo e digestibilidade não foram influenciados pelo tipo de suplementação utilizada ($P > 0,05$). Exceto, o consumo de FDN, o qual foi menor nos animais que receberam SGM ($P = 0,0464$). Animais suplementados com PNDR apresentaram maior proporção isoButirato, isoValerato e Valerato no ambiente ruminal ($P < 0,05$). A Pmic e a eficiência de síntese de proteína microbiana (EPBmic) foram similares nos animais alimentados com diferentes suplementos ($P > 0,05$). A fonte de PNDR no suplemento não influenciou os estimadores de diversidade, índices de riqueza e composição total de bactérias e Archaeas. Apenas o filo Firmicutes foi mais abundante no rúmen de animais suplementados com SMU ($P = 0,0188$). O uso de PNDR estimulou uma mudança na abundância de bactérias como *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus.spp*, *Papillibacter.spp*, e a família Christensenellaceae, o que aumentou a proporção de isoButirato, isoValerato e Valerato no rúmen, e a funcionalidade, para utilização de aminoácidos como fonte de energia para manutenção dos microrganismos e fonte de N para produção de Pmic através da reciclagem. O fluxo de AA não foi influenciado pelo suplemento utilizado no experimento ($P > 0,05$). O fluxo de AA de origem microbiana e o fluxo de AA provenientes da PNDR também não foram influenciados pelo suplemento ($P > 0,05$), da mesma forma que a digestibilidade e absorção não obtiveram diferença

significativa ($P > 0,05$). Animais suplementados com PNDR apresentaram maior quantidade dos AAs isoleucina, treonina e cistina na composição sanguínea ($P < 0,05$). Os suplementos afetaram a albumina presente no soro sanguíneo de animais recebendo NNP, que apresentaram menor concentração dessa proteína ($P < 0,05$). Embora tenha sido observada essa maior concentração sanguínea de isoleucina, treonina e cistina, a suplementação com PNDR não aumentou a eficiência de utilização do N pelos animais alimentados com pastos de gramíneas tropicais durante o período seco. Assim como a suplementação com NNP não resultou em aumento de AA proveniente da Pmic no duodeno.

Palavras-chave: Bactérias, digestibilidade, fermentação ruminal, glúten de milho 60

INFLUENCE OF RUMEN UNDEGRADED PROTEIN SUPPLEMENTATION ON INTAKE, METABOLISM AND RUMINAL MICROBIOTA OF NELLORE CATTLE GRAZING IN THE DRY SEASON

ABSTRACT - This experiment aimed to evaluate the influence of supplementation with non-protein nitrogen (NPN) or ruminal undegradable protein (RUP) on intake, digestibility of nutrients, ruminal and blood parameters, use of amino acids and ruminal microbiota in Nellore cattle reared on pasture in the dry period. Eight Nellore steers with 263 ± 48.69 kg of body weight were used, allocated on pasture of *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, arranged in four 2×2 Latin squares (2 treatments and 2 periods) balanced for residual effects. Two types of supplementation were used: mineral salt and urea; or corn gluten as a source of RUP with the addition of mineral salt. Intake and digestibility were not influenced by the type of supplement used ($P > 0.05$). Except for the NDF consumption, which was lower in the animals that received gluten ($P = 0.0464$) Animals supplemented with gluten showed a higher proportion of isoButyrate, isoValerate and Valerate of these acids in the rumen environment ($P < 0.05$). The time influenced all ruminal fermentation parameters evaluated ($P < 0.05$). Pmic and efficiency of microbial protein synthesis (EPBmic) were similar in animals fed different supplements ($P > 0.05$). The source of RUP in the supplement did not influence the diversity, wealth index and total composition of bacteria and Archaeas. Only the phylum Firmicutes was more abundant in the rumen of animals supplemented with SMU ($P = 0.0188$). The AA flow was not influenced by the supplement used in the experiment ($P > 0.05$). The flow of AA of microbial origin and the flow of AA from RUP were also not influenced by the supplement ($P > 0.05$), in the same way that digestibilities did not obtain significant difference ($P > 0.05$). Animals supplemented with SGM showed a greater amount of AAs isoleucine, threonine and cystine in the blood composition ($P < 0.05$). The supplements affected the albumin present in the blood of animals receiving SMU, which had a lower concentration of this protein ($P < 0.05$). The use of RUP stimulated a change in the abundance of bacteria such as *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus.spp*, *Papillibacter*, and *Christensenellaceae*, which increased the proportion of isoButyrate, isoValerate and Valerate in the rumen,

and the functionality, for use of amino acids as a source of energy for the maintenance of microorganisms and a source of N for the production of Pmic through recycling. Supplementation with urea resulted in an increase in the abundance of the phylum Firmicutes. RUP supplementation in this study did not result in a greater flow of amino acids to the duodenum, but resulted in a higher content of isoleucine, threonine and cystine in the blood of the animals that received this in the diet. Although this higher blood concentration of these AA was observed, supplementation with RUP did not increase the efficiency of N use by animals fed with tropical grass pastures during the dry period. Just as supplementation with NNP did not result in an increase in AA from Pmic in the duodenum.

Keywords: Bacteria, digestibility, rumen fermentation, corn gluten 60

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1.1. Introdução

A produção de animais a pasto representa 86% dos abates brasileiros, com uma área ocupada de 162,53 milhões de hectares (ABIEC, 2020), sendo uma das espécies forrageiras que se destaca nesta produção a *Urochloa brizantha*, com ênfase para as cultivares Marandu, Piatã e Xaraés (Jank et al., 2013). Adicionalmente, a produção forrageira é afetada pela sazonalidade climática, onde durante o período chuvoso se tem maior produtividade e qualidade das forrageiras, e no período das secas há redução da qualidade (alto teor de MS e de fibra, reduzido teor proteico e digestibilidade) e possivelmente da quantidade (altura do dossel, relação folha x colmo) de forragem (Moraes et al., 2006). Neste cenário das secas, as forrageiras podem ter valores de proteína bruta abaixo de 7% (Reis et al., 2005).

A baixa qualidade da forragem (reduzido teor proteico e elevada lignificação) resulta em menor digestibilidade da fibra e produção de ácidos graxos de cadeia curta devido a limitação da atividade microbiana (Minson, 1990). Neste cenário, os microrganismos não obtêm o N necessário para seu crescimento apenas com a ingestão do pasto, devido a isso há a necessidade da suplementação com fontes proteicas (Poppi e McLennan, 1995), para que a proteína metabolizável não seja prejudicada.

A proteína metabolizável é suprida em sua maioria pela Pmic e a PNDR, sendo utilizada para a manutenção e produção animal (Hanigan et al., 2018). Essa proteína metabolizável quando possui um perfil de aminoácidos de alta qualidade, aumenta a eficiência de utilização proteica e reduz a excreção de nitrogênio (Alves, 2004).

Entender a função da proteína para o ruminante, além de conhecer sua taxa de degradação e composição aminoacídica, ajuda a formular rações com menor excreção de nitrogênio para o solo, além de aumentar a eficiência de síntese microbiana (Ribeiro et al., 2015), esse entendimento leva a uma melhor utilização dos aminoácidos da dieta.

As fontes de PNDR podem ser digeridas e absorvidas no intestino do animal, sendo que algumas podem não ser aproveitadas sendo então excretadas nas fezes,

mas a PNDR digerida pode levar a um melhor aproveitamento de aminoácidos pelo ruminante e reduzir as perdas de N através da urina (Ribeiro et al., 2014). Algumas fontes proteicas que têm sua degradação ampliada a nível ruminal podem levar a maior síntese de proteína microbiana a qual gera maior aporte de aminoácidos microbianos para o intestino e ácidos graxos para o metabolismo de energia (Detmann et al., 2004).

O fluxo e qualidade da proteína bruta (PB) que chega ao intestino varia de acordo com a Pmic e PNDR e suas digestibilidades (Clark et al., 1992), de modo que as fontes proteicas então afetam o fluxo e a qualidade da proteína digestível. O desenvolvimento da nutrição animal permite o equilíbrio de AA na dieta para se melhorar a eficiência de utilização de proteína (Schwab, 2010), porém o conhecimento do fluxo de AA e digestibilidade podem melhorar ainda mais os modelos de nutrição. Alguns autores demonstram que além da proteína, a energia pode ser um limitante para os microrganismos e têm associado a velocidade de liberação de N e energia (através da degradação de carboidratos) para uma melhor eficiência dos microrganismos e aumento da Pmic (Prado et al., 2004; Zeoula et al., 2006; Caldas Neto et al., 2007; Caldas Neto et al., 2008).

1.2. Suplementação proteica de bovinos em pastagens tropicais

A *Urochloa brizantha* é uma das espécies forrageiras mais utilizadas no Brasil e um exemplo desta é o cultivar Xaraés, o qual possui alta produção, mas apresenta maior resistência ao cisalhamento (que pode influenciar a degradação da forragem na digestão) diminuindo o consumo dos animais, com valor nutritivo menor ao do cultivar Marandu (Torres et al., 2001; Valle et al., 2004). Fato que pode ocorrer devido à anatomia de diferentes plantas forrageiras, logo que Lempp (2013) em seu estudo verificou que o arranjo do esclerênquima, tecido de sustentação das plantas, do cultivar Xaraés possui como característica a lignificação. Forrageiras que apresentam esta característica têm o seu potencial qualitativo prejudicado, pois ela afeta a degradação ruminal e digestibilidade da planta pelos ruminantes. Devido a isso, a suplementação é uma ferramenta de extrema importância para animais mantidos nestes pastos.

A suplementação de bovinos em pastagens pode ser definida como o ato de fornecer nutrientes para o sistema, isso pode causar mudanças na produção seja no consumo, aporte de nutrientes e/ou energia (Paulino et al., 2004). Ela é uma ferramenta para o suprimento de nutrientes limitantes, assim como a melhoria na eficiência de uso de forrageiras (Poppi e Mclennan, 1995). Essa suplementação pode ser aditiva ou substitutiva entre pasto e suplemento, a primeira é a qual o suplemento fornecido possui efeito adicional ao consumo de forrageira, não prejudicando o mesmo, e dando maior aporte de nutrientes, já a substitutiva faz com que o animal ingira o suplemento e diminua significativamente o consumo de forragem (Moore et al., 1980).

A suplementação de bovinos mantidos em pastagens nas secas tem por objetivo complementar a alimentação animal e suprir as deficiências da forrageira no período (Geron et al., 2012), podendo auxiliar no aproveitamento da pastagem através da ação dos microrganismos que utilizam amônia para seu desenvolvimento e degradam a forragem para síntese proteica e produção de ácidos graxos no rúmen, fornecendo proteína e energia ao animal (Costa et al., 2015).

No período de secas o nitrogênio é o maior limitante se comparado a outros nutrientes, assim o fornecimento de formulações que supram esse nutriente é de grande importância (De Carvalho et al., 2011; Jayme et al., 2013; Neto e Paulino, 2000). Neste período as forrageiras podem apresentar valores de proteína abaixo de 7% MS e alta fibra, o que pode limitar o consumo caso não haja uma suplementação para suprir as deficiências (Reis et al., 2005), além de limitar a atividade dos microrganismos afetando digestibilidade da forragem (Detmann et al, 2004). Assim, é recomendado que seja realizada suplementação proteica desde que se tenha disponibilidade energética (Reis et al., 2009).

Bento et al. (2016) mostraram que novilhos ingerindo feno de Tifton 85 (*Cynodon sp.*) com 9,8% de PB na MS recebendo infusão de caseína como fonte de PDR diretamente no rúmen obtiveram maior estímulo da fermentação ruminal em relação aos animais que a receberam no abomaso, devido a caseína infundida, tendo assim mais amônia disponível a nível ruminal para aproveitamento pelos microrganismos, favorecendo seu crescimento, além de 6,1% mais proteína microbiana. Esse fato possui grande importância no consumo e melhor digestibilidade

de forragens de baixa qualidade (Detmann et al., 2011; Souza et al., 2010), devido ao crescimento das bactérias celulolíticas, as quais necessitam da amônia como substrato.

No entanto, quando a suplementação com PDR é fornecida em excesso, a amônia será absorvida via parede ruminal sendo levada até o fígado onde será metabolizada a ureia e uma parte da mesma acaba sendo eliminada via urina (Butler, 1998) e se transforma em gases (como óxido nitroso e amônia), afetando a sustentabilidade do sistema (Lobley et al., 1995).

Por outro lado, quando bovinos, em pastos de baixa qualidade, são suplementados com fonte de PNDR o aporte de N da dieta no rúmen é reduzido e a reciclagem se faz necessária para manutenção da microbiota (Detmann et al., 2010, Naves et al., 2010). A reciclagem é uma função de grande prioridade para que os microrganismos tenham fornecimento contínuo de N como uma estratégia de sobrevivência (Egan, 1965; Van Soest, 1994). O nitrogênio amoniacal ruminal segundo Preston (1986) na concentração de 5 mg/100 mL de líquido ruminal são suficientes para crescimento microbiano, porém Detmann et al. (2009) demonstrou que em forrageiras tropicais valores de 15 mg/dL podem maximizar a ingestão de fibra.

1.2.1. Perfil de aminoácidos da proteína metabolizável por ruminantes

A proteína ingerida pelo ruminante ao entrar em contato com o ambiente ruminal é identificada pelos microrganismos, posteriormente sofrem a ação das proteases sendo quebradas em oligopeptídeos, os quais poderão sofrer ação das oligopeptidases gerando peptídeos e aminoácidos livres (Socreppa, 2020). Esses últimos vão para o interior das bactérias e podem sofrer degradação dos peptídeos e AA, ser incorporados na proteína microbiana ou deaminados em amônia para síntese proteica (Santos e Mendonça, 2011).

Os AA que são disponíveis para o aproveitamento dos ruminantes são produtos da Pmic, PNDR (proteína metabolizável) que chega ao intestino e sua digestibilidade (Tigmeyer, 1990). A composição de AA presente na Pmic é considerada constante (Clark et al., 1992) e com excelente perfil de aminoácidos (NRC, 2001). Porém, dietas

ricas em PNDR podem afetar a eficiência de produção de Pmic e o fluxo de AA de origem microbiana para o intestino (Cecava et al., 1991).

No entanto, Souza et al. (2020) encontraram que a composição de aminoácidos da Pmic variou de acordo com o perfil de aminoácidos da dieta ofertada. Assim, é eminente que informações mais específicas da composição de aminoácidos da Pmic auxiliaria na precisão do fornecimento de AA para bovinos (Sok et al., 2017), a digestibilidade destes AA da Pmic também é importante para se conhecer a qualidade da proteína que chega ao intestino para absorção (Clark et al., 1992).

O entendimento dos fatores que afetam a eficiência dos microrganismos ruminais em capturar N no meio e como consequência sua transformação na taxa e extensão da desaminação dos aminoácidos, está ligado ao controle dos microrganismos específicos (Calsamiglia et al., 2010), para intensificar a produção de Pmic.

Quando se utiliza a PNDR para suprir as exigências de aminoácidos pelos ruminantes deve-se, porém, levar em conta o balanço de aminoácidos desta fonte (Borucki et al., 2008). O perfil de AA e digestibilidade de cada AA da PNDR possui ampla variação em cada alimento e dentro deles (Mjoun et al., 2010). Dentre as fontes de PNDR temos o glúten de milho, um subproduto do milho que resulta da moagem úmida com adição de dióxido de enxofre para produção de amido e apresenta aproximadamente 60% PB (Teklebrhan et al., 2020). Após a limpeza do milho o grão permanece em solução ácida e aquosa a 50°C com dióxido de enxofre por 40 horas para a separação do amido e das proteínas, através desta solução ocorre o amolecimento do milho para a separação do gérmen, glúten e amido, através de peneiras e centrifugação, gerando uma solução concentrada que é seca a 90°C em média para posteriormente realizar a moagem produzindo assim o glúten de milho (Santos, 2004).

Em relação ao perfil aminoacídico o glúten, assim como o milho, tem como AA limitante a lisina (Batista et al., 2016) e elevado teor de metionina (Fernandes, 1998). Mas, apesar de ter alta proporção proteica não possui padrão da composição de aminoácidos, por ser um subproduto (Zhuang et al., 2013). E então, o glúten pode ter elevado teor de outros aminoácidos ou não em diferentes lotes. De acordo com os

dados de composição dos alimentos, o glúten de milho 60 possui 90,55% de MS, 63,96% de PB, 36% de PDR e 60,13% de PNDR (Valadares Filho et al., 2020).

Vista a influência do perfil de AA na proteína metabolizável sobre a utilização de N pelo animal, é de suma importância a compreensão do metabolismo de AA, o que leva a um melhor entendimento dos requisitos aminoacídicos (Zhao et al., 2020). O uso de formulação de dietas considerando o perfil aminoacídico do alimento e da Pmic, através do conhecimento da composição de AA limitantes ou não, e o seu aproveitamento considerando a exigência do animal seria a solução para se ter uma dieta mais eficiente, que melhore o desempenho animal e diminua a excreção de N no solo (Abbasi et al., 2018).

1.2.2. Impacto da proteína sobre a diversidade microbiana ruminal

A dieta ofertada aos animais pode ter diferentes fontes de N, seja ele proteico ou nitrogênio não proteico (NNP) e a capacidade dos microrganismos para utilizar esse último vai depender da degradação dos carboidratos do alimento ingerido, para gerar energia, a qual é necessária ao crescimento microbiano (Alves et al., 2010). A compreensão do microbioma do rúmen é complexa graças as inter-relações entre os microrganismos (Russell e Hespell, 1981).

Os ruminantes em si não possuem a capacidade de produzir enzimas que degradem a fibra ingerida, assim os microrganismos presentes no rúmen são extremamente importantes para que haja um aproveitamento adequado do alimento, através do processo de fermentação (Wlodarski, 2017). Os ruminantes em seu desenvolvimento tiveram a adaptação de seu trato digestivo para o melhor aproveitamento dos carboidratos fibrosos (principalmente celulose e hemicelulose) usando-os como uma fonte de energia e dos compostos nitrogenados (como a ureia) como fonte proteica (Valadares Filho e Pina, 2006). Os microrganismos presentes no rúmen e o ruminante vivem em uma relação de simbiose onde os primeiros convertem amônia e carboidratos estruturais em proteínas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC's) respectivamente, vitaminas, entre outros nutrientes, através da fermentação, para que o ruminante possa assim produzir carne, leite ou lã (Kamra, 2005).

Os microrganismos possuem grande importância no rúmen para o metabolismo de energia e proteína para o animal e também são essenciais para evitar a intoxicação ruminal (Weimer, 1998). Portanto, o estudo das bactérias ruminais e do aproveitamento de nitrogênio pelas mesmas tem ganho cada vez mais importância científica. Logo que, em várias dietas os AA de origem microbiana são grande parte dos AA que chegam ao intestino, assim a eficiência do crescimento microbiano possui alta importância para os ruminantes (Russell et al., 1992).

A população ruminal como se sabe é a responsável pela fermentação do bolo alimentar e é formada por uma vasta população de diversos microrganismos como: bactérias, fungos, protozoários, archaeas e vírus (Russell, 2002). Sabe-se que dos microrganismos presentes no rúmen as bactérias e os protozoários representam mais de 90% da biomassa total, onde as bactérias são as mais estudadas (Weimer, 2015), mas essa proporção pode variar com a dieta, espécie, saúde do ruminante (que pode afetar as condições ruminais tais como: temperatura, pressão osmótica e motilidade), composição da dieta e idade (Welkie et al., 2010). Apesar desta proporção ser variável as bactérias são essenciais para que o ruminante tenha uma boa saúde e consequentemente produção (Welkie et al., 2010). De Jesus et al. (2019) demonstram que nos resultados de diversidade bacteriana a maior comunidade presente no ambiente ruminal de bovinos zebuínos em sistema de pastejo é o filo Firmicutes, seguido do Bacteroidetes e Proteobacteria. Fato que confirma que Firmicutes e Bacteroidetes são de suma importância no metabolismo de animais alimentados com forrageiras tropicais.

A grande maioria das bactérias presentes no rúmen são proteolíticas, mas a maior parte da amônia produzida no ambiente é produzida pelas bactérias conhecidas por hiperprodutoras de amônia (Krause e Russell, 1996), essas fermentam aminoácidos para obtenção de energia (James et al., 1988, Chen e Russell, 1989), a sua alta desaminação faz com que as bactérias hiperprodutoras sejam importantes também para a reciclagem de nitrogênio (Chen e Russell, 1989).

A dieta pode afetar a população microbiana de diversas maneiras, Zhou et al. (2017) trabalhando com animais em terminação com três diferentes níveis de uréia (0%, 0,8% e 2% na MS) avaliaram os efeitos da ureia sobre a composição microbiana e archaeal do rúmen, e verificaram que na suplementação com 2% de ureia houve o

aumento em abundância do gênero *Methanobrevibacter*.spp graças a sua capacidade de crescer de forma rápida sendo hidrogenotrófica, e afetou negativamente a abundância dos gêneros bacterianos, *Butyrivibrio*.spp e *Coprococcus*.spp devido à redução de FDN (fibra em detergente neutro) e FDA (fibra em detergente ácido) dos tratamentos. O desenvolvimento de bactérias celulolíticas, onde as de maior importância são a *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, tem como um dos substratos principais para o seu crescimento os ácidos graxos de cadeia ramificada (Dehority, 2004), gerando como produtos o acetato, succinato, formato, butirato, H₂ e CO₂ (Wlodarski et al., 2017). As famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae são de extrema importância por serem altamente especializadas na degradação de celulose complexa e hemicelulose da forrageira (Biddle et al., 2013). Essas bactérias responsáveis pela degradação da fibra são de crescimento lento e são altamente dependentes principalmente de amônia, isovalerato, isobutirato e 2-metilbutirato para síntese proteica em dietas de alta fibra (Russell e Sniffen, 1984).

Larue et al. (2005) e Yu et al. (2006) encontraram eubactérias aderidas as partículas da biomassa ruminal de linhagens do filo Firmicutes que estão relacionadas a espécies que usam AA e peptídeos, resultando em diminuição da atividade da desaminase no rúmen.

Outro grupo extremamente importante nos ruminantes é o de archaeas metanogênicas que auxiliam na estabilização e manutenção das atividades no rúmen (Janssen e Kirs, 2008). Esses microrganismos quando no rúmen há alta produção de H₂ utilizam esse composto para produzir CH₄, auxiliando nos processos fermentativos (Krumholz et al., 1983).

Wu et al. (2020) trabalhando com caprinos em crescimento e utilizando o glúten de milho para substituir o milho moído da dieta verificaram elevação do pH ruminal (devido a diminuição do teor de amido), aumento da degradação de proteína em amônia (resultado do maior conteúdo e digestibilidade proteica) e diminuição da síntese microbiana e do número de bactérias ruminais (essa mudança pode ter sido contribuída pelo amido inferior que gerou falta de energia para o desenvolvimento das bactérias no rúmen).

Em estudos que utilizaram vacas leiteiras Belanche et al. (2012), avaliaram o efeito da dieta sobre a fermentação ruminal com níveis de proteína que atendiam o requerido pelo animal em 110% ou 80%, e observaram que quando o nível de proteína foi abaixo do exigido houve uma diminuição substancial na diversidade microbiana ruminal, abundância ruminal de bactérias totais, fungos anaeróbios, metanógenos, e a maioria das bactérias celulolíticas, isso devido à falta de substrato para o desenvolvimento das mesmas.

Alves et al. (2020), avaliaram o perfil microbiano de bovinos Nelore associado a retenção dos animais verificaram que a riqueza do microbioma ruminal foi menor no grupo de animais de alta retenção de N, de modo que a composição microbiana deste grupo é mais especializada para utilização de N e também menos complexa. Wang et al. (2019) estudaram cabras e a forma que a microbiota do trato gastrointestinal destes animais afetam a eficiência de utilização de N, onde os animais foram divididos em dois grupos (alta ou baixa eficiência de utilização de N), os resultados indicaram que o grupo de alta eficiência tinha menor concentração de nitrogênio amoniacal, o que indica maior taxa de síntese de Pmic e consequentemente menor perda de N na forma de ureia.

A genômica e a biologia molecular proporcionam atualmente um conhecimento mais profundo em relação a estrutura e função dos microrganismos (Firkins et al., 2007). Recentemente estudos acerca do potencial funcional da microbiota ruminal vêm sendo desenvolvidos utilizando caminhos da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) (Ogunade et al., 2019), esses ajudam a entender como as comunidades microbianas atuam no metabolismo dos ruminantes através da identificação das vias dominantes do microbioma que demonstra a importância dos microrganismos para cada função no ruminante. Lopes et al. (2015) estudando o perfil funcional de ovelhas em diferentes idades encontraram que mesmo em animais com diversidade nas comunidades bacterianas entre si o padrão funcional era semelhante.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos em torno da microbiologia ruminal com o objetivo de se ter o melhor aproveitamento da dieta fornecida aos animais levando em conta a degradação, fermentação e digestão do que foi ingerido (Weimer, 2011). Esses estudos auxiliaram no melhor entendimento e conhecimento da população de microrganismos presentes no compartimento ruminal e

consequentemente na formulação de dietas mais eficientes, o que gera maiores ganhos e menores perdas ao produtor, além disso a diminuição de perdas gera uma produção mais sustentável (Morgavi et al., 2013). Devemos analisar e considerar a comunidade microbiana ruminal como um todo, pois esta estrutura que ditará o metabolismo do animal (Firkins et al., 2007).

2. Objetivo

Objetivou-se avaliar a influência da suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) ou com proteína não degradável no rúmen (PNDR) sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, parâmetros ruminais e sanguíneos, utilização de aminoácidos e microbiota ruminal de bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas.

3. Referências

Abbasi IHR, Abbasi F, Abd El-Hack ME, Abdel-Latif MA, Soomro RN, Hayat K, Mohamed MAE, Bodinga BM, Yao J, Cao Y (2018). Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 181-190.

ABIEC - Perfil da Pecuária no Brasil Relatório Anual (2020). Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/> Acesso em: 14 de dezembro 2020.

Alves D (2004). Nutrição aminoacídica de bovinos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 3.

Alves EM, dos Santos Pedreira M, de Oliveira CAS, Ferreira DN, Moreira BS, Freire LDR (2010). Importância da sincronização do complexo proteína/energia na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 844-849.

Alves KLGC, Granja-Salcedo YT, Messana JD, Souza VC, Ganga MJG, Colovate PHD, Kishi LT, Berchielli TT (2020). Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle. **Anaerobe**, p. 102316.

Belanche A, Doreau M, Edwards JE, Moorby JM, Pinloche E, Newbold CJ (2012). Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 9, p. 1684-1692.

Bento CBP, Azevedo AC, Gomes DI, Batista ED, Rufino LMA, Detmann E, Mantovani HC (2016). Effect of protein supplementation on ruminal parameters and microbial community fingerprint of Nellore steers fed tropical forages. **Animal**, v. 10, n. 1, p. 44-54.

Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. **Diversity**. 5: 627–640.

Borucki SI, Phillip LE, Lapierre H, Jardon PW, Berthiaume R (2008). The relative merit of ruminal undegradable protein from soybean meal or soluble fiber from beet pulp to improve nitrogen utilization in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3947 – 3957.

Butler WR (1998). Symposium: optimizing protein nutrition for reproduction and lactation. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2533-2539.

Caldas Neto SF, Zeoula LM, Kazama R, Prado IND, Geron LJV, Oliveira FCLD, Prado OPPD (2007). Proteína degradável no rúmen associada a fontes de amido de alta ou baixa degradabilidade: digestibilidade in vitro e desempenho de novilhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.452-460.

Caldas Neto SF, Zeoula LM, Prado IND, Branco AF, Kazama R, Geron LJV, Maeda EM, Fereli F (2008). Proteína degradável no rúmen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.1094-1102.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren AM (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1184.

Cecava MJ, Merchen NR, Berger LL, Mackie RI, Fahey Jr GC (1991). Effects of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 5, p. 2230-2243.

Chen G, Russell JB (1989). More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1052–1057.

Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323.

Costa NDL, Monteiro ALG, Silva ALP, De Moraes A, Giostri AF, Stivari TSS, ... Pin EA (2015). Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 247, p. 31-41.

De Carvalho DMG, da Silva Cabral L et al. (2011). Suplementos para ovinos mantidos em pastos de capim-marandu. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 2, p. 196-204.

Dehority BA (2004). Rumen microbiology. Nottingham: **Nottingham University Press**, 2nd ed. 372 p.

De Jesus RB, Granja-Salcedo YT, Messana JD, Kishi LT, Lemos EG, de Souza JAM, Berchielli, TT (2019). Characterization of ruminal bacteria in grazing Nellore steers. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 32, n. 4.

Detmann E, Paulino, MF, Zervoudakis JT, Cecon PR, Valadares Filho SDC, Gonçalves LC, ... Melo AJN (2004). Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação de novilhos mestiço em pastejo durante época seca: desempenho produtivo e característica de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p.169-180.

Detmann E, Paulino, MF, Mantovani, HC, Valadares Filho, SDC, Sampaio, CB, De Souza MA, Lazzarini I, Detmann KS (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**, v. 126, n. 1-3, p. 136-146.

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

Detmann E, Queiroz ACD, Zorzi K, Mantovani HC, Bayão GFV, Gomes MPC (2011). In vitro degradation of neutral detergent fiber of low-quality tropical forage according to supplementation with true protein and (or) non-protein nitrogen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1272-1279.

Egan AR (1965). The fate and effects of duodenally infused casein and urea nitrogen in sheep fed on a low-protein roughage. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 2, p. 169-177.

Fernandes VG (1998). Co-produtos na industrialização do milho. **Mogi Guaçu: Corn Products do Brasil**.

Firkins JL, Yu Z, Morrison M (2007). Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E1-E16.

Figueiras JF, Detmann E, Paulino MF, Valente TNP, Valadares Filho SDC, Lazzarini I (2010). Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1303-1312.

Geron LJV, Mexia AA, Garcia J, Silva MM, Zeoula LM (2012). Suplementação concentrada para cordeiros terminados a pasto sobre custo de produção no período da seca. **Semina: Ciências Agrárias**, 33, 797-808.

Hanigan MD, White RR, Apelo SIA, Aguilar M, Estes KA, Myers A (2018). Predicting post-absorptive protein and amino acid metabolism. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47.

Hoffmann A, de MORAES EHBK, Mousquer CJ, Simioni TA, Gomer FJ, Ferreira VB, da SILVA HM (2014). Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período da seca. **Nativa**, v. 2, n. 2, p. 119-130.

James B, Strobel HJ, Chen G (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.4, p. 872–877.

Jank L, Braz TGS, Martuscello JA (2013). Gramíneas de Clima Tropical. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal.

Janssen PH, Kirs M (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 3619–3625. 10.1128/AEM.02812-07.

Jayme CG, Oliveira PCS, Arcanjo AHM, Moreira LC, Jayme DG (2013). Suplementação de bovinos de corte a pasto durante o período seco. **PUBVET**, v.7, p.2446-2564, 2013.

Kamra DN (2005). Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134.

Krause DO, Russell JB (1996). An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.3, p.815–821.

Köster HH, Cochran RC, Titgemeyer EC, Vanzant ES, Nagaraja TG, Kreikemeier KK, St. Jean G (1997). Effect of increasing proportion of supplemental nitrogen from urea on intake and utilization of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1393-1399.

Krumholz LR, Forsberg CW, Veira DM (1983). Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.676-680.

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 7, p. 530-543.

Lempp B (2013). Anatomia de Plantas forrageiras. In: Reis RA, Bernardes TF, Siqueira GR. **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal: Gráfica Multipress.

Leng RA (1990). Factors affecting the utilization of quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 277-303.

Lobley GE, Connell AM, Lomax A, Brown DS, Milne E, Calder AG, Farningham DAH (1995). Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *Br J Nutr* 73:667–685.

Lopes LD, de Souza Lima AO, Taketani RG, Darias P, da Silva LRF, Romagnoli EM, ... Mendes R (2015). Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 1, p. 15-30.

Maiga HA, Schingoethe DJ, Henson JE (1996). Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 9, p. 1647-1653.

Minson DJ (1990). **Forage in ruminant nutrition**. New York: Academic Press. 483p.

Mjoun K, Kalscheur KF, Hippen AR, Schingoethe DJ (2010). Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers grains products. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4144-4154.

Moore JE (1980). Forage crops. **Crop quality, storage, and utilization**, p. 61-91.

Moraes EHBKD, Paulino MF, Zervoudakis JT, Valadares Filho SDC, Cabral LDS, Detmann E, Valadares RFD, Moraes KAKD (2006). Associação de diferentes fontes energéticas e protéicas em suplementos múltiplos na recria de novilhos mestiços sob pastejo no período da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 914-920.

Morgavi DP, Kelly WJ, Janssen PH, Attwood GT (2013). Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. 7, p. 184–201.

Mousquer CJ (2015). **Associação da altura do pasto e níveis de suplementação para bovinos de corte no período de transição águas-seca**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia.

Naves, JR (2010). **Utilização de fontes nitrogenadas com diferentes taxas de degradabilidade em dietas à base de cana-de-açúcar para vacas leiteiras**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.

National Research Council – NRC (2001). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: D.C. 363p.

Neto GAF, Paulino MF (2000). **Suplementação de bovinos em pastagens: uma abordagem mecanística**. Viçosa: Garcez Neto, AF.

Ogunade IM, Lay J, Andries K, McManus CJ, Bebe F (2019). Effects of live yeast on differential genetic and functional attributes of rumen microbiota in beef cattle. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-7.

Paulino MF (2001). Estratégias de suplementação para bovinos em pastejo. In: Simpósio De Produção De Gado De Corte, 1., 2001, Viçosa, MG. **Anais...** p.137-156.

Paulino MF, Figueiredo DD, Moraes EHBK, Porto MO, Sales MF, Acedo TS, Villela SDJ, Valadares Filho SDC (2004). Suplementação de bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. **Simpósio de produção de gado de corte**, v. 4, p. 93-144.

Pina DS et al. (2010). **Degradação Ruminal da Proteína dos Alimentos e Síntese de Proteína Microbiana**. 2010. Disponível em: [http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/brcorte/brcorte2010port/2Degradabilidade proteina.pdf](http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/brcorte/brcorte2010port/2Degradabilidade%20proteina.pdf)

Poppi DP, Mclennan SR (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.1, p.278-290.

Porto MO, Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SDC, Sales MFL, Cavali J, Nascimento ML, Acedo TS (2011). Ofertas de suplementos múltiplos para tourinhos Nelore na fase de recria em pastagens durante o período da seca: desempenho produtivo e características nutricionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2548-2557.

Prado OPP, Zeoula LM, Neto SFC, Geron LJV, Fereli F, Maeda E, Oliveira FCL, Kazama R (2004). Digestibilidade dos nutrientes de rações com diferentes níveis de proteína degradável no rúmen e fonte de amido de alta degradabilidade ruminal em ovinos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. Maringá, v. 26, no. 4, p. 521-527.

Preston TR (1986). Analytical methods for characterizing In: Feed resources for ruminants. **Better utilization of crop residues and by products in animal feeding: research guidelines**.2. A practical manual for research workers. Rome: FAO, p.106.

Reis RA, Rodrigues LDA, Pereira JRA (1997). Suplementação como estratégia de manejo de pastagem. In: Simpósio Sobre Manejo De Pastagem, 13., 1997, Piracicaba, São Paulo. **Anais...** Piracicaba: FEALQ. p.123-150.

Reis RA, Melo GD, Bertipaglia LMA, Oliveira AP (2005). Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. In: **Volumosos Na Produção De Ruminantes**, 2., 2005, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal:FUNEP, p.25-60.

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

Reynolds CK, Kristensen NB (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. **Journal of animal science**, v. 86, n. suppl_14, p. E293-E305.

Ribeiro PR, Macedo Junior GL, Silva SP (2014). Aspectos nutricionais da utilização das proteínas pelos ruminantes. **Veterinária notícias**, Uberlândia, v. 20, n. 2, p. 1-14.

Ribeiro PR, De Lima Macedo G, Da Silva SP (2015). Aspectos nutricionais da utilização da proteína na pelos ruminantes.

Russell JB, Hespell RB (1981). Microbial rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 6, p. 1153-1169.

Russell JB, Sniffen CJ (1984). Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 987-994.

Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 1. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3551- 3561.

Russell JB, Mantovani HC (2002). The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 347-355.

Salazar DR, Cortinhas CS, Jr JEF (2008). Sincronismo energia-proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. **PUBVET**, v. 2, n. 12.

Santos FAP, Mendonça AP (2011). Metabolismo de proteínas. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG. 2ed. **Nutrição de Ruminantes**. FAPESP: Jaboticabal, SP. p.265-297, 2011.

Santos FDA (2004). Gluten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 3, p. 79-100.

Schwab CG (2010). Balancing diets for amino acids: Nutritional, environmental and financial implications. In: **Proceedings of the 19th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference, Grand Wayne Center, Fort Wayne, Indiana, USA, 20-21 April, 2010**. Purdue University Press.

Socreppe LM (2020). Sincronização ruminal de energia e proteína em bovinos de corte criados em sistema pasto-suplemento.

Sok M, Ouellet DR, Firkins JL, Pellerin D, Lapierre H (2017). Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5241-5249.

Souza MA, Detmann E, Paulino MF, Sampaio CB, Lazzarini I, Filho SPC (2010). Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low – quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.42, n.6, p.1299-1310.

Souza VC, Messana JD et al (2020). Assessing amino acid utilization in young Nellore steers fed high-concentrate diets with different sources and levels of nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114642.

Teklebrhan T, Wang R, Wang M, Wen JN, Tan LW, Zhang XM, Ma ZY, Tan ZL (2020). Effect of dietary corn gluten inclusion on rumen fermentation, microbiota and methane emissions in goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 259, p. 114314.

Torres FE, Valle CB, Macedo MCM, Lempp B (2001). Características físicas e químicas de nove acessos de *Brachiaria brizantha*. In: **Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 38., 2001. Anais... Piracicaba.

Valadares Filho SDC, Paulino PVR, Magalhães KA, Paulino M (2002). Modelos nutricionais alternativos para otimização de renda na produção de bovinos de corte. **Simpósio de Produção de Gado de Corte**, v. 3, p. 197-254.

Valadares Filho SC, Pina DS (2006). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, v.1, 583p.

Valadares Filho SC, Machado PAS, Chizzotti ML, Amaral HF, Magalhães KA, Capelle ER (2020). CQBAL 4.0. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos. Disponível em www.cqbal.com.br. Acesso em 17/11/2020

Valle CB, Euclides VPB, Pereira JM, Valério JR, Pagliarini MS, Macedo MCM, Leite GG, Lourenço AJ, Fernandes CD, Dias-Filho MB, Lempp B, Pott A, Souza MA (2004). O capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiárias. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 36p (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 149).

Van Soest PJ (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Cornell University Press. Ithaca, NY. USA. 476 pp.

Wang L, Liu K, Wang Z, Bai X, Peng Q, Jin L (2019). Bacterial community diversity associated with different utilization efficiencies of nitrogen in the gastrointestinal tract of goats. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 239.

Weimer PJ (1998). Manipulação da fermentação ruminal: uma perspectiva ecológica microbiana. **J. Anim. Sci.** 76, 3114-3122.

Weimer PJ (2011). End product yields from the extraruminal fermentation of various polysaccharide, protein and nucleic acid components of biofuels feedstocks. **Bioresource Technology**, v.102. n.3, p.3254-9.

Weimer PJ (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 296.

Welkie DG, Stevenson DM, Weimer PJ (2010). Analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. **Anaerobe**, London, v.16, n.2, p.94–100.

Wlodarski L, Maeda EM, Fluck AC, Gilioli D (2017). Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 11, p. 1-20.

Wu J, Zhang X, Wang R, Wang M, He Z, Tan Z, Jiao J (2020). Replacing corn grain with corn gluten feed: Effects on the rumen microbial protein synthesis, functional bacterial groups and epithelial amino acid chemosensing in growing goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114684.

Zeoula LM, Fereli F, Prado IND, Geron LJV, Caldas Neto SF, Prado OPPD, Maeda EM (2006). Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2179-2186.

Zhou Z, Meng Q, Li S, Jiang L., Wu H (2017). Effect of urea-supplemented diets on the ruminal bacterial and archaeal community composition of finishing bulls. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 6205-6216.

Zhuang H, Tang N, Yuan Y (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1810-1821.

CAPÍTULO 2 – Suplementação com nitrogênio não proteico ou proteína não-degradável no rúmen e seu efeito no metabolismo e diversidade microbiana ruminal em novilhos Nelore recriados em pastos de baixa qualidade

RESUMO: Este estudo avaliou a influência da suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) ou proteína não degradada no rúmen (PNDR) sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, metabolismo e microbiota ruminal de bovinos recriados a pasto no período das secas. Foram utilizados 8 novilhos Nelore com aproximadamente $263 \pm 48,69$ kg de peso corporal, canulados no rúmen e duodeno, alocados em piquetes de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés entre os meses de setembro e outubro de 2018, dispostos em quatro quadrados latinos 2×2 (2 tratamentos e 2 períodos) balanceados para efeitos residuais. Foram utilizados dois tipos de suplementação: sal mineral e ureia, onde esta foi fornecida para atender a 50% da PDR requerida (SMU); ou glúten de milho (0,3% do peso corporal) como fonte de PNDR (GLU) com adição de sal mineral. O consumo não foi influenciado pelo tipo de suplementação utilizada ($P > 0,05$). Exceto, o consumo de FDN, o qual foi menor nos animais que receberam GLU ($P = 0,0464$). O suplemento influenciou a proporção ruminal de *iso*Butirato, *iso*Valerato e Valerato; animais suplementados com GLU apresentaram maior proporção destes ácidos no ambiente ruminal ($P < 0,05$). O tempo influenciou todos os parâmetros de fermentação ruminal avaliados ($P < 0,05$). A fonte de PNDR no suplemento não influenciou os estimadores de diversidade, índices de riqueza e composição total de bactérias e Archaeas. Apenas o filo *Firmicutes* foi sendo mais abundante no rúmen de animais suplementados com SMU ($P = 0,0188$). O uso de PNDR estimulou uma mudança na abundância de bactérias como *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus.spp*, *Papillibacter*, e Christensenellaceae, aumentando *iso*Butirato, *iso*Valerato e Valerato no rúmen, e a funcionalidade, para utilização de aminoácidos como fonte de energia para manutenção dos microrganismos e fonte de N para produção de Pmic através da reciclagem. A suplementação com ureia resultou em aumento na abundância do filo *Firmicutes*.

Palavras chave: amônia, bactérias ruminais, glúten de milho, nitrogênio, ureia.

1. Introdução

As forragens de clima tropical são um desafio a produção de bovinos, sobretudo no período de estiagem, onde a qualidade da forragem é afetada, resultando em baixos teores de proteína bruta (PB) e maior fração indigestível (Lazzarini et al., 2009). Dietas que possuem níveis abaixo de 7% de PB afetam a atividade de microrganismos no ambiente ruminal (Poppi e McLennan, 1995; Lazzarini, 2007; Sampaio et al., 2009; Hoffmann et al., 2014), uma vez que os microrganismos dependem do N como substrato para seu crescimento, limitando a degradação da fibra ingerida, causando assim decréscimos no consumo de forragem pelos animais o qual é devido a menor taxa de passagem causada pela baixa degradação da forragem (Paulino et al., 2006) e redução na digestibilidade dos nutrientes (Lazzarini et al., 2009). Assim, estudos tem sugerido que introduzir compostos nitrogenados à dieta de ruminantes mantidos em pastagens de baixa qualidade, estimula a degradação da fibra ao proporcionar nitrogênio amoniacal no rúmen, composto fundamental para crescimento microbiano (Satter e Slyter, 1974; Brooks et al., 2012).

A riqueza e abundância da microbiota ruminal influencia a utilização de nutrientes pelos ruminantes, sendo que a composição da microbiota ruminal é influenciada pela dieta. Alves (2019) evidenciou maior reciclagem de N quando utilizou o glúten como fonte proteica, isso se deve a sua menor porção de PDR. Adicionalmente, este estudo demonstrou que a diversidade do microbioma é associada a eficiência de retenção de N, onde maior abundância relativa de *Anaerobaculum* spp., *Succinimonas* spp., *Endomicrobium* spp. e *Eubacterium* spp. foi observada em animais de alta retenção de N (Alves et al., 2020).

As mudanças na atividade metabólica no rúmen podem estar relacionadas com variações na abundância das populações de diferentes grupos bacterianos, neste sentido novilhos alimentados com feno de Tifton 85 e suplementados com proteína degradável no rúmen (PDR; caseína) apresentaram menor riqueza e diversidade de algumas espécies do filo Bacteroidetes devido ao aumento da população microbiana que contém menos espécies envolvidas no metabolismo de proteína (Bento et al., 2016). Outro grupo presente no ambiente ruminal é o de Archaeas metanogênicas, as quais utilizam H₂ presente no rúmen para produção de metano, em dietas com

proteína de baixa degradação ruminal a produção de metano é encontrada em menores quantidades se comparada a dietas com N altamente fermentado no rúmen, influenciando assim a abundância de Archaeas no rúmen (Vanegas et al., 2017).

Estudos que elucidem como a PNDR afeta o metabolismo dos animais no período das secas são necessários para criar estratégias de suplementação para animais de recria nesse período, entendendo o impacto da proteína utilizada sobre a microbiologia ruminal. Deste modo a hipótese do presente estudo foi que o uso de PNDR aumentaria a reciclagem de N para o rúmen suprimindo o N necessário para síntese de Pmic, além de alterar composição microbiana e parâmetros fermentativos ruminais. Objetivou-se avaliar a influência da suplementação com NNP ou PNDR sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes, metabolismo e microbiota ruminal de bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas.

2. Material e Métodos

Os procedimentos experimentais utilizados neste experimento, seguiram os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal/SP (protocolo 16.688/16).

2.1. Local, animais e duração do experimento

O experimento foi conduzido em área pertencente ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, entre os meses de setembro e outubro de 2018.

Tabela 1. Dados meteorológicos médios observados mensalmente durante o período experimental

Mês	Precipitação	Tmax	Tmin	Tmed
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)
Setembro	64,9	30,7	16,7	22,9
Outubro	157,0	31,1	19,5	24,4

Tmax: temperatura máxima; Tmin: temperatura mínima; Tmed: temperatura média; UR: umidade relativa do ar; ND: número de dias com chuva. Dados obtidos através da Estação Agroclimatológica – Unesp de Jaboticabal.

A área experimental consistia em 22 ha de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, dividida em 12 piquetes dos quais foram utilizados somente 8 piquetes de 1,8 hectares cada, com a altura de forragem média de 28,7 cm de altura). Foram utilizados 8 novilhos da raça Nelore com aproximadamente $263 \pm 48,69$ kg de peso corporal, canulados no rúmen e duodeno, dispostos em quatro quadrados latinos 2×2 (2 tratamentos e 2 períodos) balanceados para efeitos residuais. Foi mantido um animal em cada piquete experimental com bebedouro automático e cocho coberto para oferta de suplemento.

2.2. Dietas experimentais

Foram avaliados dois tipos de suplementação em pastagem de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés: suplementação com sal mineral e ureia, onde esta foi fornecida para atender a 50% da PDR requerida (SMU); ou suplementação com glúten de milho (0,3% do peso corporal) como fonte de PNDR (GLU) com adição de sal mineral (Tabela 2). Os suplementos foram fornecidos com o objetivo de um ganho médio diário (GMD) de 0,350 kg (Exigências (kg / dia): MS = 4,58 kg, NDT = 2,82 kg/MS, PB = 0,56 kg/MS, PDR = 67,86 % da PB, de acordo com Valadares Filho et al. (2016).

O pasto foi amostrado a cada 28 dias por meio de pastejo simulado. Amostras de cada suplemento foram retiradas a cada três dias. As amostras dos alimentos foram avaliadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método 934,01), matéria orgânica (MO; método 942,05), extrato etéreo (EE; método 954,02) de acordo com recomendações da AOAC (1995). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN)

foram determinados de acordo com Mertens (2002) e adaptado para Ankom200 Fiber Analyzer, corrigido para cinza e proteína posteriormente. A fração proteína bruta (PB) foi obtida através do nitrogênio pelo método *Kjeldahl* conforme procedimentos da AOAC (1995).

Tabela 2. Composição química da forragem e dos suplementos durante o período experimental.

	Forragem ¹		Suplemento	
	SMU	GLU	SMU	GLU
MS, %MN	74,68	76,51	59,00	91,21
MM, %MS	5,91	5,93	0,33	2,62
MO, %MS	94,10	94,07	99,67	97,38
PB, %MS	5,41	5,61	222,75	58,75
%PDR/PB	63,41	63,19	100	30,30
%PNDR/PB	36,59	36,81	-	69,70
EE, % MS	1,37	1,21	-	1,71
FDN, %MS	70,29	70,60	-	7,98
FDA, %MS	36,63	37,49	-	2,22
FDNi, %MS	29,77	30,75	-	1,71
FDNcp, %MS	65,12	65,83	-	-
FDNpd, %MS	40,51	39,85	-	-
CNF, %MS	17,03	16,66	-	28,94

¹ Composição médias da forragem, obtidas através da técnica de pastejo simulado em dois períodos; SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; MS = matéria seca, MM = matéria mineral, MO = matéria orgânica; PB = Proteína Bruta; FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = Fibra insolúvel em detergente ácido; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível; FDNcp = = Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDNpd = Fibra em detergente neutro potencialmente digestível; CNF = Carboidratos não-fibrosos: [100 - (PB+FDN+MM+EE)]. Os valores de proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável

no rúmen (PNDR) foram estimados segundo Santos et al. (2016), utilizando a degradabilidade da forragem.

2.3. Amostragem do pasto e do suplemento

A massa de forragem foi estimada a cada 28 dias, para isso mensurou-se a altura média do dossel, por meio da leitura de 80 pontos em cada piquete, com auxílio de bengala graduada. Sendo escolhidos cinco pontos com altura média que representavam o piquete, os quais foram colhidos, a 5 cm de altura, toda a forragem delimitada por uma moldura de 0,25 m². As amostras colhidas foram pesadas e separadas em: lâmina foliar e colmo+bainha. Na sequência, as diferentes frações foram secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas. O peso seco final foi multiplicado pela área do piquete para estimar a massa de forragem (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios das características quantitativas e altura em forragem de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés observadas durante o período experimental.

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	GLU		
Massa de forragem, kg/MS ha	5983,56	5302,91	416,920	0,1539
Massa de folhas, kg/MS ha	2848,28	2745,04	160,952	0,7872
Altura, cm	30,19	28,08	1,397	0,0517
Folha, % MS	50,55	53,51	3,765	0,3457
Colmo, % MS	49,45	46,49	3,765	0,3497

SMU= Sal mineral com uréia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; EPM = Erro padrão da média.

2.4. Consumo e digestibilidade

O consumo foi avaliado com base na utilização de dois indicadores, determinando a produção fecal e consumo de pasto. A estimativa da produção fecal foi realizada através do óxido de cromo (Cr₂O₃), que foi fornecido 8 gramas/animal por dia nos últimos 12 dias de cada período (7 dias para estabilização da excreção fecal do indicador e 5 dias para coletas de fezes). As fezes coletadas de cada animal (em

dias consecutivos em diferentes horários: dia 1, 9h00; dia 2, 13h00; dia 3, 17h00; dia 4, 21h00; dia 5, 6h00) foram pré-secas em estufa de 55 °C por 72 horas, sendo homogeneizadas e metade moídas à 1mm em moinho tipo Willey (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA), analisando-se a quantidade de Cr₂O₃ de acordo com a metodologia proposta por Kozloski et al. (2006) e o restante moídas a 2 mm onde foi avaliada a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi).

O consumo de pasto foi estimado com base nos dados de produção fecal utilizando a FDNi como marcador interno. A determinação do teor de FDNi nas fezes, nas amostras de pasto obtidas via simulação manual do pastejo e nos suplementos foram realizadas após pré-secagem das amostras em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, moagem à 2 mm e incubação *in situ* por 288 horas como sugerido por Valente et al. (2011). Posteriormente as amostras passaram por extração com detergente neutro com a utilização do analisador de fibra Ankom (Ankom Inc., Fairport, NY, EUA). O consumo de matéria seca total foi calculado somando-se o consumo de forragem e o de suplemento.

A digestibilidade dos nutrientes (DN) foi calculada pela seguinte equação:

$$DN (\%) = \frac{(MS \text{ ingerida} \times \% \text{ Nutrientes}) - MS \text{ excretada} \times \% \text{ Nutrientes}}{(MS \text{ ingerida} \times \% \text{ Nutrientes})} \times 100$$

A estimativa da digestibilidade e os fluxos de MS duodenal foram estimados utilizando a FDNi como indicador (Udén et al., 1980).

As amostras de digesta duodenal foram coletadas via cânula duodenal quatro vezes ao dia nos seguintes horários: dia 1, 2h00, 8h00, 14h00 e 20h00; dia 2, 5h00, 11h00, 17h00 e 23h00 e homogeneizadas por animal e período. Logo após coleta 50% da amostra foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas para as posteriores análises bromatológicas e de FDNi, e o 50% restante da amostra foi congelado a -15°C para posterior liofilização e estudo da eficiência de utilização de aminoácidos.

Foi realizada a coleta de urina *spot* para quantificação dos derivados de purina mediante o método colorimétrico (Fujihara et al., 1987), N total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990), creatinina e ureia utilizando o analisador bioquímico Labtest (modelo Labmax 100), para estimativa da eficiência de síntese microbiana (Zinn e Owens, 1986). Após a coleta foi realizada filtração com dupla camada de gaze da

amostra, uma alíquota pura foi imediatamente congelada, e em outra amostra 10 mL de urina foram diluídos com 40 mL de ácido sulfúrico 0.036 N.

2.5. Parâmetros ruminais

No 28º dia de cada período experimental, foram coletadas, manualmente através da cânula, amostras de líquido ruminal as 0, 6, 12, 18 e 24 horas após a suplementação dos animais, nas quais foram determinados pH, concentração de N-NH₃ e concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Cerca de 50 mL de líquido ruminal foram recolhidos após filtragem em tecido duplo de algodão e destinados à imediata determinação do pH em potenciômetro digital. Em seguida, 40 mL de líquido ruminal foi transferido para um recipiente plástico e armazenado a -15°C para a determinação das concentrações de N-NH₃ por destilação *Kjeldahl* (Fenner, 1965). Outra alíquota de 20 mL de líquido ruminal foi armazenada a -15°C para posterior determinação da concentração dos AGCC por cromatografia gasosa (Leventini et al., 1990).

2.6. Diversidade bacteriana ruminal

As coletas para diversidade bacteriana foram realizadas no 28º dia de cada período experimental, através da cânula ruminal, coletando a fração sólida + fração líquida da digesta antes da suplementação dos animais (8:00 h), sendo aproximadamente 50 g de conteúdo da região ventral. Esse material foi armazenado em tubos Falcon livres de DNA e RNA, e imediatamente transportado até o laboratório em caixas de isopor com gelo. No laboratório se adicionou 50 mL de solução de PBS (pH 7,4) a 4°C, em seguida, a amostra foi processada para a formação de um pellet microbiano (Granja-Salcedo et al., 2017).

A extração do DNA foi realizada utilizando 200 mg do pellet obtido e o Kit de extração Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Henderson et al., 2013), seguindo as instruções do fabricante e utilizando o FastPrep® para a etapa de lise celular. Logo após extração do material genômico, o rendimento do DNA extraído foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop® ND1000Spectrophotometer) e

fluorometria (Qubit® 3.0, kit Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit). A pureza do DNA total extraído foi avaliada por espectrofotometria a partir das relações $A_{260nm}/280nm$ e $A_{260nm}/230nm$. Finalmente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain.

A amplificação da região V4/V5 do gene 16S rRNA bacteriano foi realizada mediante uma reação de PCR utilizando-se o primer forward 515F (5'-GTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') e o reverse 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') descritos por Caporaso et al. (2011), utilizando-se 20 ng de DNA total de cada amostra, 1,25 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase; solução tampão para reação de PCR [1x]; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, e água ultra pura para um volume final de 20 µl. A PCR foi conduzida em duplicata nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 53,8°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. A pureza dos produtos da PCR, foi verificada em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos estimado por comparação com marcador 1 kb plus DNA ladder. Em seguida, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery, seguindo as instruções do fabricante e reunidos equimolarmente para minimizar o viés durante a reação. O sequenciamento foi realizado na facility do departamento de tecnologia da FCAV/UNESP no Illumina MiSeq (kit MiSeq Reagent v2 (2 x 250pb), Illumina, Inc., NY, USA).

Os dados obtidos do sequenciamento foram então processados por meio do QIIME software package (Bolyen et al., 2018). Foram selecionadas *reads* acima de 250 pb e com média > 25 na qualidade Phred usando o plugin q2-demux seguido por denoising com DADA2 (Callahan et al., 2016). A taxonomia foi atribuída a ASVs usando o classificador de características q2 (Bokulich et al., 2018) e agrupados em OTUs (operational taxonomic units) com mais de 97% de semelhança das sequências. Esses dados foram utilizados para análise de rarefação, número de OTUs e agrupados considerando 97% de semelhança para os diferentes níveis taxonômicos utilizando a base de dados SILVA 128 (Quast et al., 2012). Também foram calculados os estimadores de riqueza ACE e Chao 1, e os índices de alpha e beta diversidade (Faith, 1992; Lozupone e Knight, 2005).

O perfil funcional preditivo das comunidades microbianas foi obtido com PICRUST (Langille et al., 2013). As sequências representativas da OTU foram capturadas do banco de dados Greengenes usando q2 feature-classifier classify-sklearn (McDonald et al., 2012). Genes funcionais previstos foram categorizados em Clusters da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEGG) ortologia (KO).

2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com ajuda do Software R (versão 3.6.3). Inicialmente foram verificados os supostos matemáticos de distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Teste de Bartlett) dos dados.

Os dados de consumo e digestibilidade, foram analisados em delineamento quadrado latino (2×2) quadruplicado, balanceado para efeitos residuais. O modelo para análise incluiu o efeito fixo de tratamento, e como efeitos aleatórios o quadrado latino, animal, período e o erro do modelo.

Os dados de parâmetros ruminais foram analisados considerando um delineamento quadrado latino (2×2) quadruplicado balanceado para efeitos residuais, com medidas repetidas no tempo (horário de coleta). O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento, horário de coleta, e interação entre horário e tratamento, e como efeitos aleatórios o efeito do quadrado latino, animal, período e o erro do modelo. Quando a ANOVA mostrou diferenças as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey com significância 5%.

Os dados de riqueza, diversidade, abundância ruminal de bactérias e Archaeas, e vias KEGG de funcionalidade foram comparados entre NNP e PNDR pelo teste de Wilcoxon de amostras emparelhadas.

Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos, enquanto foram consideradas tendências quando $P > 0,05$ e $0,10$ para todos os testes.

3. Resultados

O consumo e digestibilidade de MS e nutrientes não foi influenciado pelo tipo de suplementação utilizada (Tabela 4; $P > 0,05$). Exceto, o consumo de FDN, o qual foi menor nos animais que receberam GLU ($P = 0,0464$).

Tabela 4. Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	GLU		
Consumo MS % PC	1,13	1,05	0,057	0,6185
Consumo, kg/dia				
Matéria seca	3,06	2,81	0,188	0,6874
Matéria orgânica	2,79	2,66	0,172	0,9876
Proteína bruta	0,42	0,36	0,045	0,8959
FDN	2,04 ^a	1,73 ^b	0,123	0,0464
EE	0,04	0,04	0,003	0,9363
Digestibilidade, %				
Matéria seca	26,29	29,65	2,789	0,5683
Matéria orgânica	31,85	35,64	2,837	0,5482
Proteína bruta	32,85	30,84	9,088	0,5916
FDN	39,98	38,42	2,135	0,9299
EE	-185,83	-159,69	19,888	0,6043

SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; FDN = Fibra em detergente neutro; EE = Extrato etéreo; EPM = Erro padrão da média

Não houve interação tempo $\times$ suplemento nos parâmetros de fermentação ruminal avaliados (Tabela 5; $P > 0,05$). Entretanto, o suplemento influenciou a proporção ruminal de *iso*Butirato, *iso*Valerato e Valerato; animais suplementados com GLU apresentaram maior proporção destes ácidos no ambiente ruminal ($P < 0,05$).

O tempo influenciou todos os parâmetros de fermentação ruminal avaliados ($P < 0,05$; Tabela 5). Sendo que as 6 e 12 horas após suplementação o pH e a proporção de acetato foram menores quando comparada aos outros tempos ($P < 0,001$). Contrariamente, a produção de AGCC e proporção de propionato foi maior

as 6 e 12 horas após suplementação quando comparado aos outros tempos ($P < 0,001$). Por outro lado, o $N-NH_3$ foi maior as 6h após suplementação quando comparado aos outros horários, e foi menor as 18h quando comparado aos tempos 0, 6 e 12 ($P < 0,001$). A proporção de butirato foi menor as 24 horas após suplementação quando comparado aos tempos 6 e 12 ($P < 0,001$).

A Pmic e a eficiência de proteína microbiana (EPBmic) foram similares nos animais alimentados com diferentes suplementos (Tabela 5; $P > 0,05$).

Tabela 5. Parâmetros de fermentação ruminal em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR.

	Suplemento		EPM	P-valor		
	SMU	GLU		Tempo	Suplemento	T × S
pH	6,89	6,93	0,214	<0,001	0,4423	0,4643
N-NH ₃ , mg/dL	24,41	23,09	0,331	<0,001	0,3267	0,6240
AGCC, mmol/L	95,91	93,02	3,413	<0,001	0,2205	0,9649
Acetato ¹	68,21	67,89	1,922	<0,001	0,3233	0,5559
Propionato ¹	17,60	17,43	0,510	<0,001	0,4885	0,7211
isoButirato ¹	1,31	1,48	0,049	<0,001	<0,001	0,1439
Butirato ¹	10,46	10,46	0,315	0,0364	0,6401	0,4777
isoValerato ¹	1,56	1,73	0,063	<0,001	<0,001	0,2279
Valerato ¹	0,83	0,88	0,028	<0,001	0,0415	0,2457
A:P	3,90	3,95	0,127	<0,001	0,4816	0,6791
Pmic, g/dia	112,36	83,32	13,754	-	0,6786	-
EPBmic, g de Pmic/kg MODR	161,37	115,89	52,643	-	0,1502	-

¹ = mmol/100mol do total de AGCC; SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal ruminal; A:P = relação acetato:propionato; Pmic = Proteína microbiana; EPBmic = Eficiência de síntese de PB microbiana; EPM = Erro padrão da média.

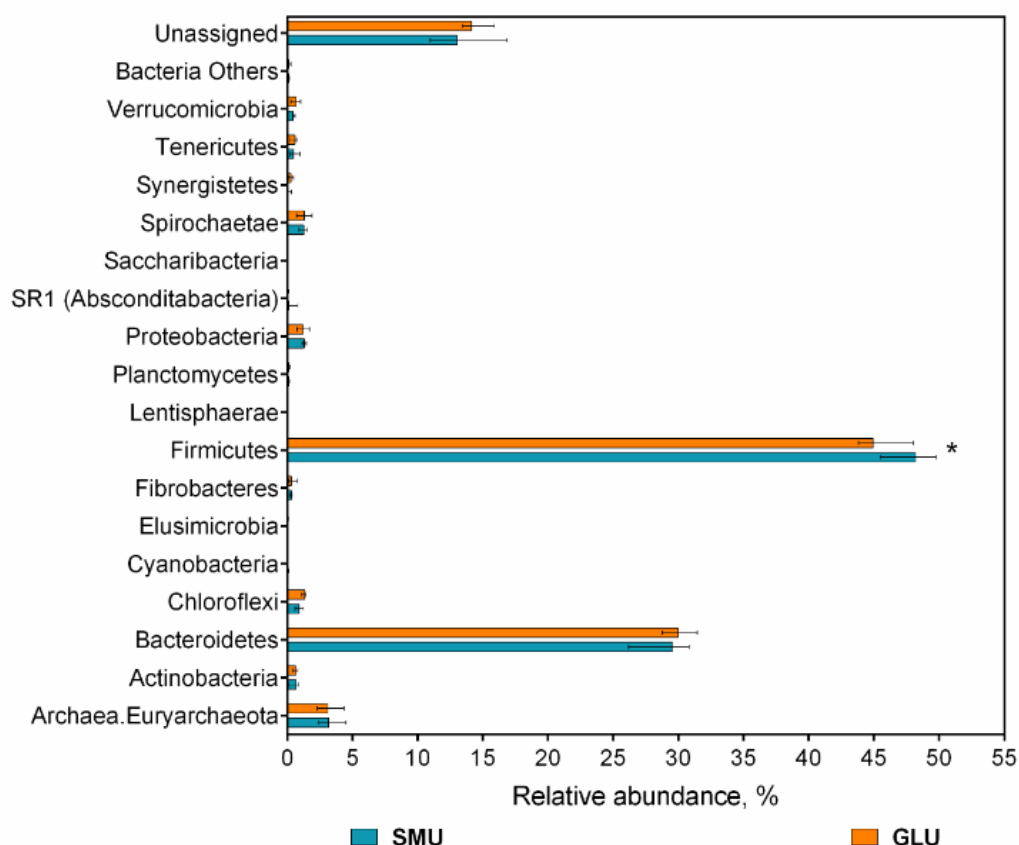
Os dados obtidos através do sequenciamento e processados geraram em média 32,298 sequencias por amostras. A fonte de PNDR no suplemento não influenciou os estimadores de diversidade, índices de riqueza e composição total de bactérias e Archaeas (Tabela 6).

Tabela 6. Mediana $\pm$ rango interquartil dos estimadores de diversidade e índices de riqueza em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		P-valor
	SMU	GLU	
Riqueza			
ACE	98,99 ± 11,30	98,18 ± 12,83	0,8125
Chao1	96,00 ± 11,00	96,00 ± 13,00	0,7995
Diversidade			
Shannon-Weiner	3,57 ± 0,15	5,54 ± 0,11	0,9375
Simpson	9,51 ± 0,12	9,45 ± 0,04	0,6875
Fisher	12,52 ± 1,11	12,96 ± 1,29	0,8125
Composição, %			
Archaeas	3,18 ± 1,90	3,02 ± 1,73	0,8125
Bactérias	81,74 ± 3,11	81,96 ± 1,69	0,8125
Unassigned	13,04 ± 3,11	14,13 ± 1,69	0,5781

SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral

Foi possível a identificação de 17 filos bacterianos e 1 filo de Archaeas (Figura 1). Apenas o filo *Firmicutes* apresentou diferença estatística entre os tratamentos (P = 0,0188), sendo mais abundante no rúmen de animais suplementados com SMU.



SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral

Figura 1. Abundância dos filos em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

Além dos filos também foram identificadas 38 classes, 64 ordens, 105 famílias, 237 gêneros e 407 espécies no total.

Foi identificada maior abundância no rúmen dos animais (Figura 2) suplementados com ureia e sal mineral (SMU) das seguintes bactérias: *Eubacterium saphenum* ($P = 0,028$, foldchange: -0,059), Prevotellaceae UCG-004 ($P = 0,028$, foldchange: -0,117), Anaerolineaceae (URB) ($P = 0,028$, foldchange: -0,704), *Eubacterium nodatum* ($P = 0,043$, foldchange: -0,216), SR1 (Absconditabacteria) ($P = 0,043$, foldchange: -0,066), Ruminococcaceae NK4A214 ($P = 0,068$, foldchange: -0,083), Verrucomicrobia LD1-PB (URB) ($P = 0,068$, foldchange: -0,391), Ruminococcaceae UCG-002 ($P = 0,068$, foldchange: -0,391), *Eubacterium coprostanoligenes* ($P = 0,080$, foldchange: -0,0234), Lachnospiraceae NK3A20 ($P =$

0,080, foldchange: -0,023), Coriobacteriaceae (URB) (P = 0,091, foldchange: -0,376), Lachnospiraceae_other (URB) (P = 0,091, foldchange: -0,209).

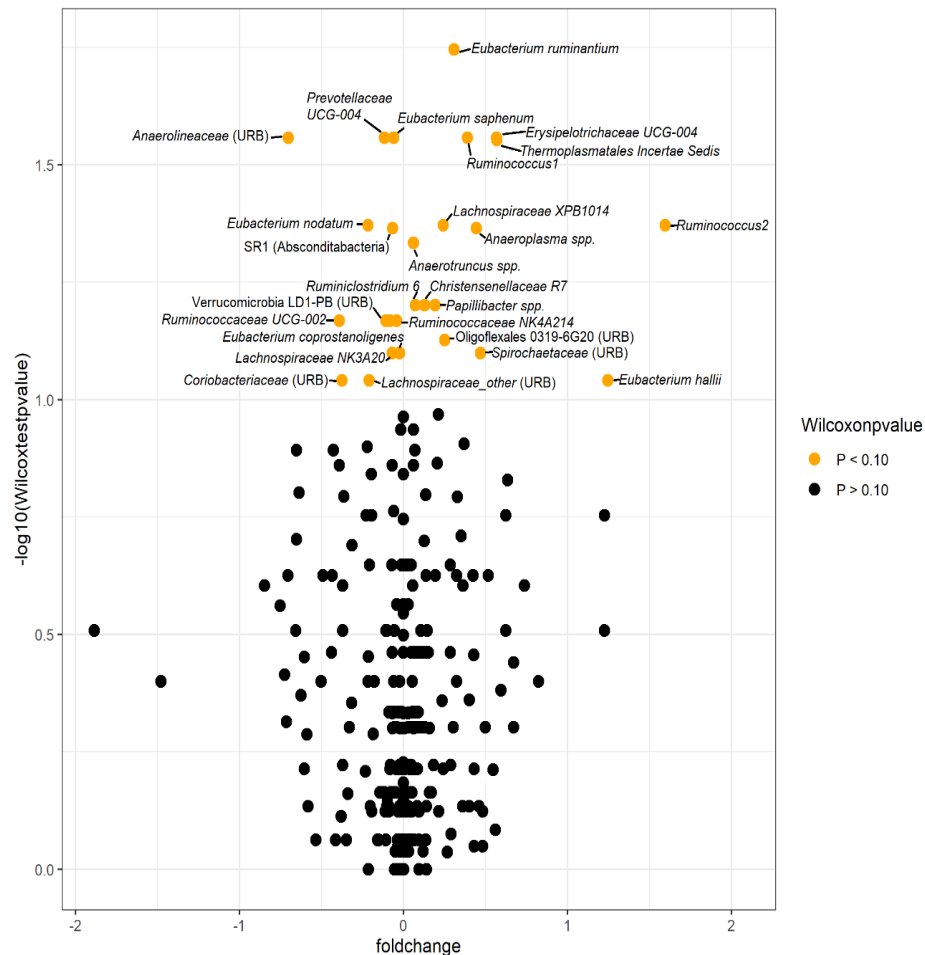


Figura 2. Espécies bacterianas com mudanças na sua abundância ruminal em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR.

Já na microbiota dos animais suplementados com GLU foi identificado maior abundância das bactérias (Figura 2): *Ruminococcus* 1 (P = 0,028, foldchange: 0,390), *Erysipelotrichaceae* UCG-004 (P = 0,028, foldchange: 0,567), *Thermoplasmatales Incertae Sedis* (P = 0,028, foldchange: 0,570), *Lachnospiraceae* XPB1014 (P = 0,043, foldchange: 0,242), *Anaeroplasm spp.* (P = 0,043, foldchange: 0,445), *Ruminococcus* 2 (P = 0,043, foldchange: 1.595.343.982), *Ruminiclostridium* 6 (P = 0,063, foldchange: 0,072), *Christensenellaceae* (P = 0,063, foldchange: 0,128), *Papillibacter spp.* (P =

0,063, foldchange: 0,192), Oligoflexales 0319-6G20 (URB) ($P = 0,075$, foldchange: 0,250), Spirochaetaceae (URB) ($P = 0,080$, foldchange: 0,470), *Eubacterium halli* ($P = 0,091$, foldchange: 12.467), *Anaerotruncus spp.* ($P = 0,046$, foldchange: 0,061), *Eubacterium ruminantium* ($P = 0,018$, foldchange: 0,309).

Além da composição microbiana a funcionalidade das bactérias presentes no rúmen foi analisada, e os animais recebendo GLU obtiveram maior mediana nas funções do sistema excretor, biossíntese e metabolismo de glicano, replicação e reparo, tradução, transporte e catabolismo, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, metabolismo da biotina, vias de fixação de carbono em procariotos, divisão celular, metabolismo de d-glutamina e d-glutamato, replicação de DNA, metabolismo da glutathione, biossíntese e metabolismo de glicano, degradação de glicosaminoglicano, biossíntese de glicosfingolipídios, proteínas de biossíntese de lipopolissacarídeos, lisossoma, reparo de excisão de nucleotídeo, outra degradação de glicano, peroxissomo, recuperação de bicarbonato do túbulo proximal, metabolismo de taurina e hipotaurina, fatores de tradução e proteínas de tradução (Tabela 7, $P < 0,05$).

Já as funcionalidades de processamento de informação ambiental, metabolismo de carboidratos, transporte de membrana, metabolismo de açúcar amino e açúcar nucleotídeo, degradação de bisfenol, metabolismo de D-arginina e D-ornitina, metabolismo de frutose e manose, via da pentose fosfato, sistema de fosfotransferase, metabolismo de porfirina e clorofila, biossíntese de estilbenóide, diarilheptanoide e gingerol, fatores de transcrição e transportadores apresentaram maior mediana nos animais que receberam a suplementação com SMU (Tabela 7, $P < 0,05$).

Tabela 7. Funcionalidade das bactérias ruminais presentes em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	SMU		GLU		P-valor
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	
Caminhos totais KEGG	41.310.947,0	15.815.100,5	40.190.488,0	18.533.826,5	0,7353
L1, % caminhos totais					
Processamento de Informação Ambiental	12,530	0,45	12,235	0,32	0,0280
Processamento de Informação Genética	20,756	0,17	20,849	0,16	0,0630
Sistemas Organismais	0,740	0,02	0,756	0,02	0,0515
L2, % caminhos totais					
Metabolismo de carboidratos	10,154	0,09	9,994	0,13	0,0425
Sistema Excretor	0,023	0,00	0,027	0,01	0,0422
Dobramento, classificação e degradação	2,502	0,04	2,518	0,03	0,0747
Biossíntese e metabolismo de glicano	2,328	0,11	2,357	0,06	0,0280
Transporte de Membrana	10,896	0,45	10,549	0,38	0,0277
Metabolismo de Nucleotídeo	4,297	0,06	4,321	0,04	0,0910
Replicação e Reparo	9,336	0,14	9,436	0,10	0,0425
Tradução	6,133	0,06	6,211	0,04	0,0280
Transporte e catabolismo	0,285	0,03	0,305	0,02	0,0180
L3, % caminhos totais					
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	1,115	0,01	1,119	0,02	0,0280
Metabolismo de açúcar amino e açúcar nucleotídeo	1,390	0,02	1,375	0,02	0,0277
Metabolismo de ascorbato e aldarato	0,084	0,00	0,082	0,01	0,0796
Metabolismo da biotina	0,156	0,01	0,162	0,01	0,0273
Degradação de bisfenol	0,074	0,00	0,07	0,01	0,0277
Vias de fixação de carbono em procariotos	1,051	0,03	1,085	0,02	0,0280
Biossíntese de carotenoides	0,004	0,00	0,002	0,01	0,0829

Divisão celular	0,073	0,00	0,076	0,01	0,0343
Mobilidade celular e secreção	0,176	0,00	0,182	0,01	0,0625
Chaperonas e catalisadores dobráveis	1,006	0,03	1,01	0,01	0,0910
Ciclo de citrato (ciclo TCA)	0,631	0,02	0,658	0,01	0,0754
Metabolismo de D-Arginina e D-ornitina	0,002	0,00	0,001	0,01	0,0455
Metabolismo de D-Glutamina e D-glutamato	0,165	0,01	0,171	0,01	0,0277
Replicação de DNA	0,708	0,01	0,715	0,01	0,0277
Proteínas de replicação de DNA	1,336	0,02	1,347	0,01	0,0910
Metabolismo de frutose e manose	0,853	0,02	0,808	0,03	0,0180
Metabolismo da glutatona	0,166	0,01	0,17	0,01	0,0277
Biossíntese e metabolismo de glicano	0,035	0,00	0,038	0,01	0,0280
Degradação de glicosaminoglicano	0,07	0,01	0,076	0,01	0,0280
Biossíntese de glicosfingolipídios - série gânglio	0,056	0,01	0,062	0,01	0,0422
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	0,495	0,01	0,488	0,01	0,0904
Metabolismo de histidina	0,657	0,005	0,665	0,01	0,0625
Recombinação homóloga	1,002	0,02	1,004	0,02	0,0630
Metabolismo lipídico	0,135	0,01	0,133	0,01	0,0679
Metabolismo do ácido lipóico	0,027	0,01	0,03	0,01	0,0749
Biossíntese de lipopolissacarídeo	0,246	0,03	0,247	0,02	0,0910
Proteínas de biossíntese de lipopolissacarídeos	0,336	0,02	0,344	0,02	0,0425
Lisossoma	0,101	0,01	0,109	0,01	0,0178
Reparo incompatível	0,884	0,01	0,891	0,01	0,0898
Reparo de excisão de nucleotídeo	0,429	0,00	0,43	0,01	0,0269
Outra degradação de glicano	0,275	0,03	0,285	0,01	0,0425
Via da pentose fosfato	0,805	0,01	0,769	0,03	0,0425
Peroxisomo	0,187	0,01	0,195	0,01	0,0260
Sistema de fosfotransferase	0,281	0,05	0,214	0,04	0,0180

Biossíntese de unidade de açúcar policetídeo	0,223	0,01	0,228	0,01	0,0904
Metabolismo de porfirina e clorofila	0,831	0,03	0,82	0,01	0,0280
Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	0,084	0,00	0,087	0,01	0,0796
Recuperação de bicarbonato do túbulo proximal	0,022	0,00	0,026	0,01	0,0431
Metabolismo de pirimidina	2,016	0,03	2,028	0,02	0,0625
Ribossomo	2,623	0,04	2,656	0,03	0,0630
Biogênese do ribossomo	1,455	0,02	1,473	0,02	0,0630
Esporulação	0,691	0,08	0,679	0,08	0,0754
Biossíntese de estilbenóide, diarilheptanoide e gingerol	0,002	0,00	0,001	0,01	0,0455
Metabolismo de taurina e hipotaurina	0,111	0,00	0,113	0,01	0,0277
Fatores de transcrição	1,479	0,05	1,452	0,03	0,0280
Fatores de tradução	0,602	0,01	0,609	0,01	0,0277
Proteínas de tradução	0,985	0,01	0,995	0,01	0,0274
Transportadores	5,853	0,30	5,662	0,26	0,0280
Metabolismo de tirosina	0,315	0,00	0,317	0,01	0,0656

SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral

4. Discussão

Como o esperado os valores de PB da forrageira no período experimental estiveram abaixo de 7%PB, que é o limite mínimo para o desenvolvimento microbiano (Ørskov, 2000), mas com boa massa de forragem (5,98 t/MS ha e 5,30 t/MS há, para o SMU e GLU, respectivamente). A composição da forrageira nos diferentes tratamentos foi semelhante química e quantitativamente. E apesar das diferentes fontes de proteína suplementar fornecida, com exceção do consumo de FDN, o consumo e digestibilidade dos nutrientes não foram influenciados. Detmann et al. (2009) sugerem que a suplementação proteica de animais em gramíneas de baixa qualidade pode resultar no incremento no consumo de matéria seca da forragem e em consequência melhora o balanço energético devido ao crescimento das bactérias fibrolíticas, como as dos gênero *Ruminococcus*, pertencentes a família Ruminococcaceae, pois esses microrganismos também utilizam amônia como fonte de N no ambiente ruminal para síntese de Pmic mediante a degradação de carboidratos da forragem (Costa et al., 2015). Entretanto, esse efeito não foi observado possivelmente devido a elevada fração indigestível.

O aproveitamento de N pelos microrganismos depende da degradação e quantia de energia disponibilizada através dos carboidratos ingeridos e da qualidade destes (Alves et al., 2010). Apesar de ser suplementado proteína ou NNP com o intuito de estimular a obtenção de energia mediante a degradação do pasto, houve limitações, uma vez que a *Urochloa brizantha* cv. Xaraés no período do estudo continha uma fração indigestível elevada, o que prejudicou a degradação da parede celular da forragem para o seu aproveitamento e fornecimento de energia ao crescimento dos microrganismos, prejudicando também o consumo em relação ao peso corporal devido a uma limitação física (enchimento ruminal). A baixa digestibilidade observada é decorrente da alta excreção fecal em relação ao consumo dos animais, e que pode ter sido influenciada pelo alto teor de FDN que têm uma taxa de passagem lenta no trato digestivo do animal, já que a forragem colhida durante o pastejo era de material seco e com fibra de baixa qualidade. Akin et al. (1987) estudando forrageiras de ambiente com alta temperatura encontrou valores de lignina elevado na parede das células parenquimáticas, o que causou menor digestibilidade

da forrageira, assim como o verificado neste estudo e com os estudos de características morfológicas da *Urochloa brizantha* cv Xaraés de Lempp (2013), que identificou que diferente das outras cultivares do mesmo gênero ela possui mais sítios de lignificação, o qual limita a degradação pelos microrganismos ruminais, afetando sua qualidade (Brito e Rodella, 2001).

Houve menor ingestão de FDN nos animais que receberam GLU, sem afetar a digestibilidade, isso se deve a um menor consumo de pasto desses animais, resultado de um efeito substitutivo da suplementação (Goes et al., 2005). Esse efeito, corrobora com o afirmado por Silva et al. (2009) de que em suplementações a níveis de 0,2-0,3% do peso corporal haja redução de consumo de forragem pelo aumento da ingestão de suplemento.

Animais suplementados com GLU apresentaram maior proporção de *iso*Butirato, *iso*Valerato e Valerato no ambiente ruminal, isto pode ser decorrente ao processo de desaminação de valina, leucina e prolina presente no GLU ofertado, um estudo similar realizado com bovinos Nelore na época das águas suplementados com GLU encontrou resultados semelhantes (Camargo, 2020). A família Lachnospiraceae foi correlacionada positivamente com os animais suplementados com SMU, porém alguns grupos desta mesma família são também associados positivamente ao GLU, essa família é de grande importância na degradação de xilanas (Krause et al., 2003) que são associadas a microrganismos degradadores de celulose (Flint et al., 2008), sendo associada assim a fermentação em bovinos (Hernandez-Sanabria et al., 2010) que gera aumento nos ácidos graxos, que são os produtos finais da fermentação microbiana de carboidratos. O aumento de *iso*Butirato e *iso*Valerato pode estar associado a maior presença de *Eubacterium* que desaminam os aminoácidos presentes no glúten (Russel e Mantovani, 2002). A maior proporção principalmente de *iso*Butirato e *iso*Valerato favoreceu o aumento de bactérias da família Ruminococcaceae, como *Ruminococcus.spp*, no ambiente ruminal, devido ao requerimento desses ácidos graxos para crescimento desse grupo de microrganismos (Slyter e Weaver, 1969). O enriquecimento de rotas metabólicas relacionadas ao metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, biossíntese e metabolismo do glicano e rotas de metabolismo de D-glutamina e D-glutamato nos animais suplementados com GLU sugere um aumento no metabolismo de aminoácidos no microbioma ruminal

em função dos substratos presentes no suplemento, gerando ATP para atender à necessidade energética dos microrganismos (Ørskov, 1992). O aumento das rotas de divisão celular dos microrganismos indica o crescimento microbiano na suplementação de GLU, indicando um estímulo da PNDR para a digestão da fibra consumida (Nocek e Russell, 1988). Entretanto, este estímulo ao nível ruminal não foi suficiente para encontrar diferenças significativas na digestibilidade nos animais.

O tempo influenciou todos os parâmetros, sendo que o N-NH₃ maior as 6h após suplementação, o que foi semelhante ao encontrado em estudos com infusão de caseína no rúmen, esse fato se deve ao processo de desaminação no GLU (Bento et al., 2016) e no caso do SMU devido ao N advindo do NNP suplementar. Estudos em condições tropicais de Leng (1990) delimitaram que 10 mg/dL de N-NH₃ no líquido ruminal são necessários para não prejudicar o crescimento microbiano. Assim, os dois suplementos deste estudo forneceram suprimento adequado de amônia no ambiente ruminal, os animais recebendo SMU devido a ureia ser rapidamente transformada em amônia e os animais recebendo GLU devido a fração degradável no rúmen do suplemento fornecer aminoácidos que puderam ser degradados e também pela possível reciclagem de N da alta PNDR que chega ao intestino (Brake et al., 2010), retornando ao rúmen na forma de ureia. As bactérias *Papillibacter* são da família Ruminococcaceae, ficam aderidas a parede ruminal, são associadas a reciclagem de N do sangue para o ambiente ruminal (Cheng e Wallace, 1979), e nos animais recebendo GLU elas tenderam estar em maior abundância devido à alta PNDR que possivelmente causou maior reciclagem de N absorvido no intestino na forma de aminoácidos.

O crescimento microbiano e produção de energia são resultado da junção entre a composição química e o potencial de degradação do alimento ingerido pelos animais (Church, 1990). Sincronizar a degradação proteica e a fermentação de energia é fundamental para a degradação da dieta e produção de Pmic, pelos microrganismos (Ekinci e Broderick, 1997). Animais mantidos em pastejo de forragens de baixa qualidade podem incrementar a síntese de Pmic através da ingestão de PDR ou aumento da ingestão de PB na dieta (Bento et al., 2016). Neste estudo não foram verificadas mudanças significativas na síntese de Pmic utilizando diferentes fontes

proteicas, ureia ou glúten. Isto possivelmente pela limitação na qualidade da forragem, como discutido anteriormente.

A eficiência de produção de Pmic muitas vezes é ineficiente devido a utilização de energia para outras funções nos microrganismos como manutenção, acúmulo de carboidratos de reserva e energia (Hackmann e Firkins, 2015). Além disso os animais alimentados com GLU tiveram mais rotas de degradação de glicano, o que gera um maior gasto de ATP, que prejudica a eficiência de síntese de Pmic (Hackmann e Firkins, 2015) dos animais recebendo este suplemento. Os animais alimentados com SMU apresentaram mais rotas do metabolismo de carboidratos no rúmen e rotas de metabolismo de frutose e manose que são carboidratos presente nas forrageiras (McIlroy, 1967), pelo consumo de pasto e devido ao outro grupo obter efeito substitutivo da suplementação com GLU.

A diversidade, índices de riqueza e composição total de bactérias e Archaeas não foram influenciadas pelos tratamentos. O filo *Firmicutes* foi o que obteve maior abundância nos animais recebendo SMU, pois este filo abrange as bactérias produtoras de amônia (Bento et al., 2016; Cholewińska et al., 2020) que possivelmente foram estimuladas pela maior disponibilidade de ureia no ambiente ruminal após o consumo do suplemento. A mudança na abundância de Firmicutes pode afetar a eficiência alimentar e de extração de energia (Turnbaugh et al., 2006), sugerindo melhora da microbiota para o aproveitamento dos carboidratos fibrosos. De Jesus et al. (2019) avaliando novilhos Nelore mantidos a pasto encontraram maior abundância do filo *Firmicutes*, isto se deve ao fato que as bactérias presentes nesse filo podem utilizar carboidratos (xilana, celulose e hemicelulose) como fonte de energética (Morrison e Miron, 2000; Dassa et al., 2014).

Nos animais suplementados com GLU foi identificada maior abundância de um grupo de Archaeas metanogênicas, Thermoplasmatales, esse grupo pode ser associado ao metabolismo de enxofre (Arce-Rodríguez et al., 2019), sendo que o glúten de milho é rico em enxofre devido a adição do mesmo no processamento para produção do amido, este resultado sugere um estímulo neste grupo de metanogênicas no ambiente ruminal pela maior disponibilidade desse mineral. Entretanto, estudos realizados em novilhos Nelore suplementados com fontes de PNDR não encontraram

diferenças significativas na produção de metano entérico nestes animais durante a terminação intensiva a pasto (Colovate, 2020).

As bactérias Christensenellaceae em alguns estudos podem ser encontradas associadas a metanogênicas, pois um dos produtos de sua fermentação é o H₂ que é substrato a produção de metano (Goodrich et al., 2016), o encontrado neste estudo corrobora com isto, pois os animais do GLU foram os que obtiveram uma tendência a maior abundância dessa família de bactérias e do grupo de Archaeas Thermoplasmatales. Por outro lado, as Christensenellaceae foram correlacionadas a melhora da digestibilidade de N em animais recebendo proteína de baixa degradabilidade ruminal além de possuírem um papel na regulação do microbioma (Ribeiro et al., 2017), o que pode ter auxiliado na disponibilidade de N amoniacal, devido a maior reciclagem de N nestes animais já que este é um mecanismo de prioridade no metabolismo do nitrogênio nos ruminantes (Batista et al., 2016), para complementar o suprimento de PDR para os microrganismos ruminais.

5. Conclusão

O uso de PNDR estimulou uma mudança na abundância de bactérias como *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus.spp*, *Papillibacter.spp*, e a família Christensenellaceae, aumentando a proporção de *iso*Butirato, *iso*Valerato e Valerato no rúmen, e a funcionalidade, para utilização de aminoácidos como fonte de energia para manutenção dos microrganismos e fonte de N para produção de Pmic possivelmente através da reciclagem.

6. Referências

Akin DE, Rigsby LL, Barton II FE, Gelfand DS, Himmelsbach WR (1987). Influence of delignifying agents on tissue structure in bermudagrass stems. **Food Microstructure**, Windham, v. 6, n.1, p.103-113.

Alves EM, dos Santos Pedreira M, de Oliveira CAS, Ferreira DN, Moreira BS, Freire LDR (2010). Importância da sincronização do complexo proteína/energia na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 844-849.

Alves KLGC (2019). **Diversidade bacteriana ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Alves KLGC, Granja-Salcedo YT, Messana JD, Souza VC, Ganga MJG, Colovate PHD, Kishi LT, Berchielli TT (2020). Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle. **Anaerobe**, p. 102316.

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. (1990). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 15th ed. Washington DC.

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. (1995). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington.

Arce-Rodríguez A, Puente-Sánchez F, Avendaño R, Martínez-Cruz M, de Moor JM, Pieper DH, Chavarría M (2019). Thermoplasmatales and sulfur-oxidizing bacteria dominate the microbial community at the surface water of a CO₂-rich hydrothermal spring located in Tenorio Volcano National Park, Costa Rica. **Extremophiles**, v. 23, n. 2, p. 177-187.

Batista ED, Detmann E, Titgemeyer EC, Valadares Filho SC, Valadares RFD, Prates LL, Rennó LN, Paulino MF (2016). Effects of varying ruminally undegradable protein supplementation on forage digestion, nitrogen metabolism, and urea kinetics in Nellore cattle fed low-quality tropical forage. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 201-216.

Bento CBP, Azevedo AC, Gomes DI, Batista ED, Rufino LMA, Detmann E, Mantovani HC (2016). Effect of protein supplementation on ruminal parameters and microbial community fingerprint of Nellore steers fed tropical forages. **Animal**, v. 10, n. 1, p. 44-54.

Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, ... & Caporaso JG (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90.

Bolyen E, Rideout JR et al (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, v. 6, p. e27295v2.

Brake DW, Titgemeyer EC, Jones ML, Anderson DE (2010). Effect of nitrogen supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming corn-based diets. *Journal of Animal science*, v. 88, n. 8, p. 2729-2740.

Brito CJFA, Rodella RA (2001). Breve histórico das relações entre anatomia vegetal e qualidade de gramíneas forrageiras com ênfase para o gênero *Brachiaria*. **Rev Agric**, v. 76, p. 19-36.

Brooks MA, Harvey RM, Johnson NF, Kerley MS (2012). Rumen degradable protein supply affects microbial efficiency in continuous culture and growth in steers. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 9, p. 4985-4994.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583.

Camargo KDV (2020). **Influência da suplementação com proteína não-degradável no rúmen sobre o consumo, metabolismo e desempenho na recria de bovinos Nelore em pasto**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer J, Knight R (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**. 2011; 108: supl. 1 4516±4522.

Cheng KJ, Wallace RJ (1979). The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. **British Journal of Nutrition**, v. 42, n. 3, p. 553-557.

Cholewińska P, Czyż K, Nowakowski P, Wrostek A (2020). The microbiome of the digestive system of ruminants—a review. **Animal Health Research Reviews**, p. 1-12.

Church DC (1990). The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. **Englewood Cliffs: Waveland Press**. 563 p.

Colovate PH (2020). Influência de diferentes fontes de proteína não degradável no rúmen sobre Archaeas metanogênicas e emissão de metano entérico em bovinos Nelore terminados em pastagens. Trabalho de conclusão de curso. Unesp - Campus Jaboticabal.

Costa NDL, Monteiro ALG, Silva ALP, De Moraes A, Giostri AF, Stivari TSS, Gilaverte S, Baldissera TC, Pin EA (2015). Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 247, p. 31-41.

Dassa B, Borovok I, Ruimy-Israeli V, Lamed R, Flint HJ, Duncan SH, ... Bayer EA (2014). Rumen cellulosomics: divergent fiber-degrading strategies revealed by comparative genome-wide analysis of six ruminococcal strains. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e99221.

De Jesus RB, Granja-Salcedo YT, Messana JD, Kishi LT, Lemos EG, de Souza JAM, Berchielli, TT (2019). Characterization of ruminal bacteria in grazing Nellore steers. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 32, n. 4.

Detmann E, Paulino, MF, Mantovani, HC, Valadares Filho, SDC, Sampaio, CB, De Souza MA, Lazzarini I, Detmann KS (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**, v. 126, n. 1-3, p. 136-146.

Ekinci C, Broderick GA (1997). Effect of processing high moisture ear corn on ruminal fermentation and milk yield. **Journal Dairy Science**, 80:3298-3307.

Faith DP (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10.

Fenner H (1965). Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 249–251.

Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 121-131.

Fujihara T, Ørskov ER, Reedsa PJ, Kylea DJ (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.109, p.7-12.

Granja-Salcedo YT, Messana JD, Souza VC, Dias AVL, Kishi LT, Rebelo LR, Berchielli TT (2017). Effects of partial replacement of maize in the diet with crude glycerin and/or soyabean oil on ruminal fermentation and microbial population in Nellore steers. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 9, p. 651-660.

Goes RHDT, Mancio AB, Lana RDP, Leão MI, Alves DD, Silva ATS (2005). Effects of different supplementation levels on intake and ruminal parameters of post weaning steers grazing *Brachiaria brizantha*, in the Amazonian area. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1730-1739.

Goodrich JK, Davenport ER, Waters JL, Clark AG, Ley RE (2016). Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 532-535.

Hackmann TJ, Firkins JL (2015). Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 465.

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

Hernandez-Sanabria E, Goonewardene LA, Li M, Mujibi DF, Stothard P, Moore SS, Leon-Quintero MC (2010). Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6338-6350.

Hoffmann A, de MORAES EHBK, Mousquer CJ, Simioni TA, Gomer FJ, Ferreira VB, da SILVA HM (2014). Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período da seca. **Nativa**, v. 2, n. 2, p. 119-130.

Kozloski GV, Netto DP, de Oliveira L, Maixner AR, Leite, DT, Maccari M, ... de Quadros FLF (2006). Chromium oxide use as a marker for measuring fecal production of grazing cattle: estimative variations due to sampling schedule.

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 5, p. 663-693.

Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814-821.

Lazzarini I (2007). Consumo, digestibilidade e dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados.

Lazzarini I, Detmann E, Sampaio CB, Paulino M F, Valadares Filho SC, Souza MA, Oliveira FA (2009). Transit and degradation dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and nitrogenous compounds. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 635-647.

Lempp B (2013). Anatomia de Plantas forrageiras. In: Reis RA, Bernardes TF, Siqueira GR. **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticabal: Gráfica Multipress.

Leng RA (1990). Factors affecting the utilization of quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 277-303.

Leventini MW, Hunt CW, Roffler RE, Casebolt DG (1990). Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. **Journal Animal Science**, v.68, p. 4334-4344.

Lozupone C, Knight R (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235.

McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME journal**, v. 6, n. 3, p. 610-618.

McIlroy RJ (1967). Carbohydrates of grassland herbage. In: **Herbage Abstracts**.

Mertens DR (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217-1240.

Morrison M, Miron J (2000). Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins?. **FEMS microbiology letters**, v. 185, n. 2, p. 109-115.

Nocek JE, Russell JB (1988). Protein and energy as a integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107.

ØRSKOV ER (1992). Protein Nutrition in Ruminants. 2º E.

Ørskov ER (2000). The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: Given, D.I., Owens, E., Axford, R.F.E. et al. (Eds.). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB International. p.175-188.

Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC (2006). Suplementação animal em pasto: energética ou protéica. **Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem**, v. 3, p. 359-392.

Poppi DP, Mclennan SR (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.1, p.278-290.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research** 41(D1):D590-D596.

Ribeiro GO, Oss DB, He Z, Gruninger RJ, Elekwachi C, Forster RJ, ... McAllister TA (2017). Repeated inoculation of cattle rumen with bison rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16.

Russell JB, Mantovani HC (2002). The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 347-355.

Sampaio CB, Detmann E, Lazzarini I, Souza MAD, Paulino MF, Valadares Filho SDC (2009). Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 560-569.

Satter LD, Slyter LL (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British journal of nutrition**, v. 32, n. 2, p. 199-208.

Silva FFD, Sá JFD, Schio AR, Ítavo LCV, Silva RR, Mateus RG (2009). Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 371-389.

Slyter LL, Weaver JM (1969). Growth factor requirements of *Ruminococcus flavefaciens* isolated from the rumen of cattle fed purified diets. **Applied microbiology**, v. 17, n. 5, p. 737-741.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031.

Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal Science Food Agricultural**, v.31, n.7, p.625-632.

Valadares Filho SC, Costa e Silva, LF et al. (2016). Cálculo de exigências nutricionais, formulação de dietas e predição de desempenho de zebuínos puros e cruzados. **Retrieved April**, v. 24, p. 2017.

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

Vanegas JL, González J., Carro MD (2017). Influence of protein fermentation and carbohydrate source on in vitro methane production. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 101, n. 5, p. e288-e296.

Zinn RA, Owens FN (1986). A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. **Canadian Journal of Animal Science**, 66 (1):157-166.

CAPÍTULO 3 - Eficiência do uso de aminoácidos em bovinos suplementados com diferentes fontes de N em pasto de baixa qualidade

RESUMO – Este estudo avaliou a influência da suplementação com NNP ou PNDR sobre o consumo, fluxo, digestibilidade e eficiência de utilização de aminoácidos em bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas. Foram utilizados 8 novilhos Nelore com $263 \pm 48,69$ kg de peso corporal, alocados em piquetes de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, dispostos em quatro quadrados latinos 2×2 (2 tratamentos e 2 períodos) balanceados para efeitos residuais. Os animais foram suplementados com sal mineral e ureia, onde esta foi fornecida para atender a 50% da PDR requerida (SMU); ou glúten de milho (0,3% do peso corporal) como fonte de PNDR (SGM) com adição de sal mineral. O consumo de aminoácidos diferiu entre os suplementos, animais do SGM apresentaram maior consumo de aminoácidos totais, AAE, além de maior consumo de cada aminoácido individual ($P < 0,05$). O fluxo duodenal de AA não foi influenciado pelo suplemento utilizado no experimento ($P > 0,05$). O fluxo de AA de origem microbiana e o fluxo de AA provenientes da PNDR também não foram influenciados pelo suplemento ($P > 0,05$), da mesma forma que a digestibilidade não obteve diferença significativa ($P > 0,05$). A concentração dos AAs isoleucina, treonina e cistina foi maior ($P < 0,05$) no sangue de animais suplementados com SGM. A lisina e fenilalanina não foram observadas nas amostras de sangue. Animais suplementados com SMU apresentaram menor concentração de albumina ($P < 0,05$) no soro sanguíneo. A suplementação com PNDR neste estudo, não resultou em maior fluxo de aminoácidos para o duodeno, mas resultou em maior teor de isoleucina, treonina e cistina no sangue dos animais que receberam a dieta com SGM. Embora tenha sido observada essa maior concentração sanguínea desses AA, a suplementação com PNDR não aumentou a eficiência de utilização do N. Assim como a suplementação com NNP não resultou em aumento de AA proveniente da Pmic no duodeno.

Palavras chave: aminoácidos, glúten de milho, nitrogênio, ureia.

1. Introdução

A pecuária mundial enfrenta alguns desafios para seu futuro desenvolvimento, sendo um dos principais deles o aumento da eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) e a redução da excreção de N em bovinos (Calsamiglia et al., 2010). Vários aspectos da nutrição de ruminantes podem estar diretamente relacionados à utilização ineficiente de N alimentar, dentre elas pode estar um desbalanço da dieta basal (Abbassi et al., 2018).

Forragens tropicais são particularmente importantes na dieta basal de bovinos de corte no sistema produtivo brasileiro. No entanto, no período seco as forragens tropicais disponíveis para o animal apresentam elevada fibra e lignina na sua composição, e teor de proteína bruta (PB) abaixo de 7%, o qual limita os microrganismos para síntese de proteína microbiana (Lazzarini et al., 2009; Figueiras et al., 2010).

A suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) tem sido preconizada com objetivo de corrigir este desbalanço de N em forragens tropicais e proporcionar aumento na eficiência de síntese de proteína microbiana o que resulta em aumento do suprimento de AA para o intestino delgado e diminui a concentração de N-amoniaco no rúmen, desde que se tenha energia disponível para manter o balanço energia e N (Figueiras et al., 2010, Calsamiglia et al., 2010, Dijkstra et al., 2007, Abbassi et al., 2018). Por outro lado, a suplementação com proteína não degradada no rumen (PNDR) pode aumentar o fluxo de AA para o intestino e contribuir com maior desempenho animal, aumenta a retenção de N, e pode contribuir com a reciclagem de N quando o nível de PDR na dieta é baixo (Leonardi et al. 2003, Batista et al., 2016, Souza et al., 2020).

O suprimento de AA para os ruminantes é dependente da proteína microbiana produzida no rúmen, da proteína que escapa da degradação ruminal (PNDR) que chegam ao intestino, do perfil e digestibilidade de AA (Clark et al., 1992, Li et al., 2013). A proteína microbiana pode contribuir com 34 a 89% (média 59%) do fluxo de proteína no duodeno (Clark et al., 1992; NRC, 2001); e a PNDR fornecida pode aumentar a absorção intestinal de AA essenciais (AAE) e não essenciais (AANE). Entretanto, a eficiência de utilização de N é dependente do perfil e digestibilidade de AA no intestino,

o qual é afetado pela dieta. A suplementação com fontes de PNDR rica no AA leucina em animais com baixa síntese de proteína microbiana pode melhorar o desempenho dos animais, logo que este é um dos aminoácidos principais presentes na proteína microbiana (Allison e Garnsworthy, 2002 e Garnsworthy et al. 2008).

O glúten de milho é um exemplo de fonte proteica que possui alta fração não degradável no rúmen, porém este alimento possui um perfil de aminoácidos desequilibrado (Zhuang et al., 2013), assim como o milho. No entanto, o perfil de AA fornecido pela fração PNDR da fonte proteica pode ser diferente do alimento original (Harstad e Prestløkken, 2001). Existe também uma diferença notável entre a quantidade e digestibilidade dos AA da proteína microbiana e das fontes de PNDR (Titgemeyer, 2003). Assim, conhecer o suprimento AA pela fonte de PNDR, pela proteína de origem microbiana, além de saber o fluxo e digestibilidade de cada AA é de suma importância para se atender os requerimentos do animal (Zhao et al., 2020), e melhorar a eficiência do uso de proteínas (Schwab, 2010).

Os modelos utilizados na nutrição de ruminante, NRC (2016), BR-Corte (Valadares Filho et al., 2016), NASEM (2016), assumem similar perfil de AA da PNDR e dos alimentos, assim como similar digestibilidade dos AA individuais, o que não é verdadeiro. Estes modelos precisam de dados refinados sobre o suprimento de aminoácidos de fontes presente na PNDR e da proteína microbiana do rúmen para melhorar a predição da eficiência de utilização de N, os quais são escassos em bovinos de corte a pasto de baixa qualidade. Deste modo, este estudo objetivou avaliar a influência da suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) ou PNDR sobre o consumo, digestibilidade e utilização de aminoácidos em bovinos Nelore recriados a pasto no período das secas. Sendo nossa hipótese que a suplementação de bovinos em pastagens de baixa qualidade com uma fonte de PNDR permitiria o maior aporte de aminoácidos para absorção no intestino e o NNP aumentaria a síntese de Pmic para o fornecimento de aminoácidos.

2. Material e Métodos

Os procedimentos experimentais utilizados neste experimento seguiram os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal/SP (protocolo 16.688/16). O experimento foi conduzido em área pertencente ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, entre os meses de setembro e outubro de 2018, com precipitação de 64,9 e 157,0 mm, respectivamente (Estação Agroclimatológica – Unesp de Jaboticabal).

A área experimental consistia em 8 piquetes de 1,8 hectares formados com *Urochloa brizantha* cv. Xaraés (altura média de 28,7 cm durante o experimento).

2.1. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 8 novilhos da raça Nelore com aproximadamente $263 \pm 48,69$ kg de peso corporal, canulados no rúmen e duodeno, dispostos em quatro quadrados latinos 2×2 (2 tratamentos e 2 períodos) balanceados para efeitos residuais. O experimento teve duração de 56 dias, com 2 períodos de 28 dias cada. Os animais foram adaptados a dieta por 13 dias, 7 dias para estabilização da excreção fecal do indicador externos e 8 dias foram utilizados para coleta de dados. Cada animal foi mantido em um piquete experimental com bebedouro automático e cocho coberto para oferta de suplemento.

2.2. Dietas experimentais

As suplementações avaliadas em pastagem de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés foram: suplementação com sal mineral e ureia, onde esta foi fornecida para atender a 50% da PDR requerida (SMU); ou suplementação com glúten de milho (0,3% do peso corporal) como fonte de PNDR (SGM) com adição de sal mineral (níveis de garantia: Ca, 160g; P, 40g; Mg, 5g; S, 40g; Na, 160g; Cu, 945mg; Mn, 730mg; Zn, 3500mg; I, 70mg; Co, 56mg; Se, 18mg; F (máx) 400mg), Tabela 1). Os suplementos foram fornecidos diariamente às 09h00min da manhã.

Tabela 1. Composição química da forragem e dos suplementos durante o período experimental.

	Forragem ¹		Suplemento	
	SMU	SGM	SMU	SGM
Composição química, %MS				
Matéria Seca, %	74,68	76,51	59,00	91,21
Matéria orgânica	94,10	94,07	99,67	97,38
Extrato etéreo	1,37	1,21	-	1,71
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	70,29	70,60	-	7,98
Fibra em Detergente Ácido	36,63	37,49	-	2,22
FDNindigestível (FDNi)	29,77	30,75	-	1,71
FDNcp	65,12	65,83	-	-
FDNpotencialmente digestível (FDNpd)	40,51	39,85	-	-
Carboidratos Não Fibrosos	17,03	16,66	-	28,94
Proteína Bruta (PB)	5,41	5,61	222,75	58,75
Proteína degradada rumen, %PB	63,41	63,19	100	30,30
Proteína não degradada no rumen, %PB	36,59	36,81	-	69,70
Aminoácidos essenciais, %MS				
Arginina	0,16	0,16	-	2,17
Histidina	0,06	0,06	-	1,49
Isoleucina	0,15	0,15	-	2,82
Leucina	0,28	0,29	-	10,91
Lisina	0,19	0,19	-	1,41
Metionina	0,02	0,02	-	1,32
Fenilalanina	0,16	0,16	-	3,98
Treonina	0,18	0,18	-	2,40
Valina	0,20	0,21	-	3,19
Aminoácidos não essenciais, %MS				
Alanina	0,26	0,27	-	6,03
Ácido Aspártico	0,40	0,38	-	5,33
Cistina	0,03	0,03	-	1,14

Ácido Glutâmico	0,47	0,47	-	15,70
Glicina	0,22	0,23	-	1,95
Prolina	0,27	0,28	-	6,21
Serina	0,21	0,21	-	3,95
Tirosina	0,08	0,08	-	3,37

¹ Composição médias da forragem, obtidas através da técnica de pastejo simulado em dois períodos; SMU= Sal mineral com ureia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; Carboidratos não-fibrosos: $[100 - (PB+FDN+MM+EE)]$. Os valores de proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR) foram estimados segundo Santos et al. (2016), utilizando a degradabilidade da forragem.

O pasto foi amostrado a cada 28 dias por meio de pastejo simulado. Amostras de cada suplemento foram retiradas a cada três dias. As amostras dos alimentos foram avaliadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método 934,01), matéria orgânica (MO; método 942,05), extrato etéreo (EE; método 954,02) de acordo com recomendações da AOAC (1995). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinados de acordo com Mertens (2002) e adaptado para Ankom200 Fiber Analyzer, corrigido para cinza e proteína posteriormente. A fração proteína bruta (PB) foi obtida através do nitrogênio pelo método *Kjeldahl* conforme procedimentos da AOAC (1995).

Os suplementos foram fornecidos com o objetivo de um ganho médio diário (GMD) de 0,350 kg (Exigências (kg / dia): MS = 4,58 kg, NDT = 2,82 kg/MS, PB = 0,56 kg/MS, PDR = 67,86 % da PB, de acordo com Valadares Filho et al. (2016).

A massa de forragem foi estimada a cada 28 dias, para isso mensurou-se a altura média do dossel, por meio da leitura de 80 pontos em cada piquete, com auxílio de bengala graduada. Sendo escolhidos cinco pontos com altura média que representavam o piquete, os quais foram colhidos, a 5 cm de altura, toda a forragem delimitada por uma moldura de 0,25 m². As amostras colhidas foram pesadas e separadas em: lâmina foliar e colmo+bainha. Na sequência, as diferentes frações foram secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas. O peso seco final foi multiplicado pela área do piquete para estimar a massa de forragem (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios das características quantitativas e altura em forragem de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés observadas durante o período experimental.

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	GLU		
Massa de forragem, kg/MS ha	5983,56	5302,91	416,920	0,1539
Massa de folhas, kg/MS ha	2848,28	2745,04	160,952	0,7872
Altura, cm	30,19	28,08	1,397	0,0517
Folha, % MS	50,55	53,51	3,765	0,3457
Colmo, % MS	49,45	46,49	3,765	0,3497

SMU= Sal mineral com uréia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; EPM = Erro padrão da média.

2.3. Consumo, digestibilidade e fluxo

O consumo foi estimado com base em dois indicadores utilizados na determinação da produção fecal e consumo de pasto. A estimativa da produção fecal foi realizada através do óxido de cromo (Cr_2O_3), que foi fornecido 8 gramas/animal por dia nos últimos 12 dias de cada período (7 dias para estabilização da excreção fecal do indicador e 5 dias para coletas de fezes). As fezes coletadas de cada animal (em dias consecutivos em diferentes horários: dia 1, 9h00; dia 2, 13h00; dia 3, 17h00; dia 4, 21h00; dia 5, 6h00) foram pré-secas em estufa de 55 °C por 72 horas, sendo homogeneizadas e metade moídas à 1mm em moinho tipo Willey (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) e o restante moídas a 2 mm onde foi avaliada a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). O teor de Cr_2O_3 das amostras foi analisado de acordo com a metodologia proposta por Kozloski et al. (2006).

O consumo de pasto foi estimado com base nos dados de produção fecal utilizando a FDNi como marcador interno. A determinação do teor de FDNi nas fezes, nas amostras de pasto obtidas via simulação manual do pastejo e nos suplementos foram realizadas após pré-secagem das amostras em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, moagem à 2 mm e incubação *in situ* por 288 horas como sugerido por Valente et al. (2011). Posteriormente as amostras passaram por extração com detergente neutro com a utilização do analisador de fibra Ankom (Ankom Inc.,

Fairport, NY, EUA). O consumo de matéria seca total foi calculado somando-se o consumo de forragem e o de suplemento.

O fluxo de MS duodenal foi estimado utilizando a FDNi como indicador (Udén et al., 1980).

As amostras de digesta duodenal foram coletadas via cânula duodenal quatro vezes ao dia nos seguintes horários: dia 1, 2h00, 8h00, 14h00 e 20h00; dia 2, 5h00, 11h00, 17h00 e 23h00 e homogeneizadas por animal e período. Logo após coleta 50% da amostra foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas para as posteriores análises bromatológicas e de FDNi, para estimar o fluxo da digesta e o 50% restante da amostra foi congelado a -15°C para o isolamento microbiano.

O isolamento bacteriano da digesta duodenal foi realizado seguindo a metodologia descrita por Cecava et al. (1990). As amostras compostas da digesta foram filtradas em um filtro de náilon de 100 µm (44% da área de superfície dos poros; Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Suíça) e o material retido foi lavado com solução salina (800 mL a 0,9% (peso / vol) NaCl). Em seguida, os microrganismos foram isolados da amostra filtrada. Após centrifugação (2000 RPM por 20 min a 5 °C). O sobrenadante foi centrifugado a 12.340 RPM por 20 min a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e 100 mL de solução salina 0,9% foram adicionados ao pellet. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.340 RPM por 20 min a 5 °C e o pellet resultante composto foi congelado (-80 °C) e liofilizado (72-h). Foi realizada uma amostra composta de cada animal da digesta do duodeno após a liofilização para análise do perfil de AA.

Foi realizada a coleta de urina *spot* para quantificação dos derivados de purina mediante o método colorimétrico (Fujihara et al., 1987), N total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), creatinina e ureia utilizando o analisador bioquímico Labtest (modelo Labmax 100), para estimativa da eficiência de síntese microbiana (Zinn e Owens, 1986). Após a coleta foi realizada filtração com dupla camada de gaze da amostra, uma alíquota pura foi imediatamente congelada, e em outra amostra 10 mL de urina foram diluídos com 40 mL de ácido sulfúrico 0.036 N.

No 28º dia de cada período experimental, foram coletadas, manualmente através da cânula, amostras de líquido ruminal as 0, 6, 12, 18 e 24 horas após a suplementação dos animais, para determinação da concentração de N-NH₃. Cerca de

40 mL de líquido ruminal foi transferido para um recipiente plástico e armazenado a -15°C para a determinação das concentrações de N-NH₃ por destilação *Kjeldahl* (Fenner, 1965).

2.4. Parâmetros sanguíneos

Durante o 26º dia do período experimental foram obtidas amostras de sangue (10mL) às 08:00 e, 16:00 h da jugular de cada animal, em seguida metade das amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo heparina (143 UI) e centrifugadas (1000 × g por 20 min a 4 ° C) para separação de plasma. Após a centrifugação, o plasma foi transferido para microtubos do tipo eppendorf e congelado a -15 ° C até o momento de análise dos AA essenciais e não essenciais. Outra alíquota das amostras de sangue foi coletada em tubo contendo gel separador e acelerador de coagulação e centrifugadas a 4.000 rpm, a 4° C durante 20 minutos para separação do soro (Matsuzaki et al., 1997), que foi acondicionado a -15° C até o momento das análises de proteína total, albumina, ureia. A ureia foi estimada por espectrofotometria colorimétrica utilizando analisador Labtest (modelo Labmax 100).

2.5. Análise de aminoácidos

A composição de aminoácidos das amostras de alimentos, sangue, fezes e pellet microbiano foram determinadas de acordo com Hagen et al. (1993) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um analisador de aminoácidos SPC 1000 adaptado com um sistema de derivatização pré-coluna com isotiocianato de fenil (PITC), LUNA C18 100 Å 5 u, 250 × 4,6 mm 00G-4252-EQ coluna de fase reversa de sílica e detecção de UV a 254 nm. A hidrólise das amostras (200 mg) foi realizada em 9 mL de HCl 6 N com 3% (peso / vol) de fenol em um tubo selado a vácuo em um bloco de reação térmica por 24 h a 110 °C. Em seguida, foi adicionada uma alíquota do padrão interno do ácido α-aminobutírico. As amostras foram então secas a 70 militorr em sistema de armadilha de nitrogênio criogênico e neutralizadas com uma solução 4: 4: 2 de 0,2 N de acetato de sódio tri-hidratado, metanol grau HPLC e trietilamina. Em seguida, as amostras foram secas novamente conforme

descrito anteriormente. Nesta etapa, PITC foi adicionado para derivatizar os aminoácidos liberados por hidrólise para formar o aminoácido PITC. Ao tubo contendo os cristais de aminoácidos derivatizados, 500 μ L de fase móvel A foram adicionados como diluente. A detecção de ultravioleta foi realizada a 254 nm após cromatografia de fase reversa (loop de injeção de 30 μ L, pH 6,40, gradiente linear binário com fluxo de 1 mL / min e temperatura de coluna de 58 °C). A fase móvel A composta por um tampão 0,14 N de acetato de sódio, acetonitrila (240 mL / 2.000 mL de acetato de sódio 0,14 N) e trietilamina (1 mL / 2.000 mL de acetato de sódio 0,14 N). A fase móvel B composta por uma solução 6: 4 de acetonitrila (grau para HPLC) e água milli-Q. A análise de AA no plasma foi realizada através da mistura de plasma (200 μ L) com 50 μ L de uma solução de HCl 0,1 N contendo ácido alfa-aminobutírico como padrão interno e 250 μ L de metanol 99%. As amostras foram agitadas por 10 s, centrifugadas ($13.000 \times g$ por 10 min a 4 °C) e secas na estação de vácuo, até 70 militorr. Em seguida, 20 μ L de solução de derivatização contendo PITC foram adicionados, agitados em vórtex por 10 segundos, descansados por 20 minutos e secos novamente. Em seguida, 500 μ L de diluente foram adicionados aos cristais de aminoácidos derivatizados e deixados em ultrassom por 10 min, homogeneizados por vórtex por 15 s e filtrados através de 0,45 μ m Millex para o frasco.

2.6. Cálculos

O fluxo da digesta foi estimado com base em um único marcador interno (FDNi) de acordo com Udén (1980). O fluxo duodenal total (g / dia) de cada AA individual foi calculado multiplicando a respectiva concentração (g / kg) na amostra da digesta pelo fluxo de MS. O fluxo duodenal (g / dia) de cada AA microbiano individual foi calculado multiplicando a respectiva concentração (g / kg, base de PB) de cada AA na bactéria isolada pelo fluxo de PB microbiana. O fluxo duodenal (g / dia) de cada AA da PNDR individual foi calculado subtraindo o fluxo duodenal de cada AA microbiano do fluxo total de cada AA.

A digestibilidade de cada AA (g/ kg de MS) foi calculada através da subtração dos aminoácidos excretados do fluxo duodenal total de aminoácidos, isto dividindo pelo fluxo duodenal total de aminoácidos multiplicado por 1000.

2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Software R (versão 3.6.3). Inicialmente foram verificados os supostos matemáticos de distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Teste de Bartlett) dos dados.

Os dados de consumo, fluxo e digestibilidade dos aminoácidos foram analisados em delineamento quadrado latino (2×2) quadruplicado, balanceado para efeitos residuais. O modelo para análise incluiu o efeito fixo de tratamento, e como efeitos aleatórios o quadrado latino, animal, período e o erro do modelo.

Os dados de parâmetros sanguíneos foram analisados considerando um delineamento quadrado latino (2×2) quadruplicado balanceado para efeitos residuais, com medidas repetidas no tempo (horário de coleta). O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento, horário de coleta, e interação entre horário e tratamento, e como efeitos aleatórios o efeito do quadrado latino, animal, período e o erro do modelo. Quando a ANOVA mostrou diferenças as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey com significância 5%.

3. Resultados

O consumo de MS e PB não foram influenciados pelo suplemento utilizado no experimento (Tabela 3). Animais suplementados com SGM apresentaram maior consumo de aminoácidos totais, AAE, além de maior consumo de cada aminoácido individual (Tabela 3, $P < 0,05$).

Tabela 3. Consumo de matéria seca (CMS), proteína bruta (CPB) e de aminoácidos de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	SGM		
CMS, kg/dia	3,06	2,81	0,188	0,6874
CPB, g/dia	421,34	357,59	44,551	0,9553
Consumo (g/dia)				

AA totais	145,07 ^b	383,28 ^a	56,929	0,0198
AAE	60,28 ^b	156,51 ^a	23,128	0,0199
AANE	84,74	220,98	42,000	0,0694
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g/dia)</i>				
Arginina	6,07 ^b	12,77 ^a	1,734	0,0215
Histidina	2,81 ^b	7,70 ^a	1,163	0,0179
Isoleucina	6,29 ^b	15,29 ^a	2,222	0,0211
Leucina	14,93 ^b	51,89 ^a	8,366	0,0175
Lisina	6,47 ^b	10,30 ^a	1,216	0,0343
Metionina	2,58 ^b	6,33 ^a	0,887	0,0140
Fenilalanina	7,16 ^b	20,30 ^a	3,078	0,0187
Treonina	7,08 ^b	14,28 ^a	1,911	0,0248
Valina	8,12 ^b	18,08 ^a	2,518	0,0226
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g/dia)</i>				
Alanina	11,54 ^b	31,248 ^a	4,681	0,0199
Ácido Aspártico	15,01 ^b	30,85 ^a	4,124	0,0293
Cistina	1,51 ^b	5,44 ^a	0,869	0,0155
Ácido Glutâmico	23,66 ^b	76,21 ^a	12,086	0,0184
Glicina	8,01 ^b	13,48 ^a	1,642	0,0323
Prolina	11,66 ^b	32,23 ^a	4,821	0,0157
Serina	8,84 ^b	21,38 ^a	3,072	0,0214
Tirosina	4,52 ^b	15,91 ^a	2,587	0,0170

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

SMU= Sal mineral com ureia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; CMS = consumo de matéria seca; CPB = consumo de proteína bruta; EPM = Erro padrão da média.

O fluxo duodenal de cada aminoácido, do total de aminoácidos, dos aminoácidos microbianos e dos aminoácidos da PNDR não foram influenciados pelo suplemento utilizado no experimento (Tabela 4).

Tabela 4. Fluxo duodenal de aminoácidos de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	SGM		
Aminoácidos essenciais (AAE, g/dia)				
Arginina	28,13	27,65	2,702	0,7990
Histidina	12,70	13,24	1,348	0,9374
Isoleucina	31,47	31,51	3,070	0,9168
Leucina	58,10	63,17	6,518	0,8336
Lisina	42,73	41,13	3,860	0,7765
Metionina	14,64	14,44	1,366	0,8148
Fenilalanina	34,32	35,52	3,399	0,9811
Treonina	35,19	34,74	3,268	0,8722
Valina	37,38	37,45	3,609	0,9244
Aminoácidos não essenciais (AANE, g/dia)				
Alanina	49,25	51,23	4,981	0,9075
Ácido Aspártico	66,18	65,93	5,903	0,8452
Cistina	9,10	9,86	1,366	0,8150
Ácido Glutâmico	82,20	90,46	9,459	0,8017
Glicina	40,58	38,14	3,825	0,7488
Prolina	30,91	34,63	3,802	0,7533
Serina	32,69	33,55	3,189	0,9969
Tirosina	28,33	29,13	2,897	0,9561
AA totais	636,84	656,08	63,288	0,9886
AAE	294,66	298,84	28,718	0,9561
AANE	339,25	352,93	34,384	0,9544
Aminoácidos microbianos (g/dia)				
AA totais	107,18	85,82	11,712	0,6099
AAE	47,73	38,03	9,965	0,6011
AANE	55,94	44,72	6,227	0,6130
Aminoácidos da PNDR (g/dia)				
AA totais	529,67	570,26	62,824	0,8986
AAE	243,65	258,06	28,477	0,9539
AANE	283,31	308,21	34,177	0,8674

SMU= Sal mineral com ureia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; EPM = Erro padrão da média.

A concentração de amônia ruminal, proteína microbiana e eficiência de síntese de proteína microbiana por kg de matéria orgânica degradada no rumen, assim como a retenção de nitrogênio não foram influenciados pelo suplemento utilizado no experimento (Tabela 5). A digestibilidade dos aminoácidos não diferiu entre as suplementações utilizadas (Tabela 5).

Tabela 5. Balanço de nitrogênio e digestibilidade de aminoácidos de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento			P-valor		
	SMU	SGM	EPM	Tempo	Suplemento	T x S
N-NH ₃ , mg/dL	24,41	23,09	0,331	<0,001	0,3267	0,6240
Pmic, g/dia	112,36	83,32	13,754	-	0,6786	-
EPBmic, g de Pmic/kg				-		-
MODR	161,37	115,89	52,643	-	0,1502	-
NEU, %	39,09	41,77	14,288	-	0,7827	-
NEF, %	55,17	50,75	15,692	-	0,7876	-
NRE, %	5,73	7,57	9,963	-	0,9361	-
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g/kg de MS)</i>						
Arginina	766,92	787,55	16,995	-	0,9721	-
Histidina	773,47	791,90	17,455	-	0,8401	-
Isoleucina	765,53	781,42	17,995	-	0,8182	-
Leucina	772,70	806,35	19,989	-	0,6433	-
Lisina	813,38	820,56	12,853	-	0,9708	-
Metionina	829,54	839,58	13,804	-	0,5329	-
Fenilalanina	762,23	793,28	18,582	-	0,7115	-
Treonina	751,23	765,69	19,273	-	0,9824	-
Valina	754,45	776,58	19,011	-	0,8193	-

Aminoácidos não essenciais (AANE, g/kg de MS)

Alanina	731,57	764,87	23,380	-	0,6236	-
Ácido Aspártico	826,81	833,15	16,193	-	0,8217	-
Cistina	800,41	831,80	16,698	-	0,6947	-
Ácido Glutâmico	772,57	794,83	20,896	-	0,7767	-
Glicina	745,59	756,04	21,561	-	0,8718	-
Prolina	734,96	773,70	24,292	-	0,7193	-
Serina	736,40	759,11	22,013	-	0,7690	-
Tirosina	799,43	822,98	15,810	-	0,8431	-
AA totais (g/kg de MS)	773,37	795,31	18,408	-	0,7870	-
AAE (g/kg de MS)	774,49	795,46	17,317	-	0,8556	-
AANE (g/kg de MS)	770,74	792,21	19,496	-	0,7623	-

SMU= Sal mineral com uréia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal ruminal; Pmic = Proteína microbiana; EPBmic = Eficiência de síntese de PB microbiana; NEU = Nitrogênio excretado na urina; NEF = Nitrogênio excretado nas fezes; NRE = Nitrogênio retido; EPM = Erro padrão da média.

A digestibilidade de aminoácidos individuais, AAE e AANE provenientes da PNDR não foram influenciados pelo suplemento utilizado no experimento (Tabela 6).

Tabela 6. Digestibilidade de aminoácidos da PNDR mais fontes endógenas de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		EPM	P-valor
	SMU	SGM		
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g/kg de MS)</i>				
Arginina	680,02	734,73	26,447	0,9217
Histidina	710,05	745,96	25,401	0,7909
Isoleucina	692,81	728,85	27,132	0,7565
Leucina	716,79	768,67	27,892	0,6255
Lisina	761,14	782,44	18,902	0,8706
Metionina	774,09	799,65	20,964	0,5801
Fenilalanina	695,30	746,79	27,143	0,6700

Treonina	685,27	714,39	27,390	0,9432
Valina	685,94	727,17	27,597	0,7682
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g/kg de MS)</i>				
Alanina	663,19	715,96	32,649	0,6365
Ácido Aspártico	779,07	796,70	21,474	0,7064
Cistina	755,60	801,37	22,331	0,6639
Ácido Glutâmico	712,18	754,87	29,353	0,7174
Glicina	678,75	703,54	30,942	0,7892
Prolina	680,49	733,01	32,570	0,7406
Serina	675,04	714,60	29,530	0,7330
Tirosina	734,28	779,19	24,235	0,7704
AA totais (g/kg de MS)	712,50	752,69	26,084	0,7352
AAE (g/kg de MS)	711,32	750,81	25,164	0,7939
AANE (g/kg de MS)	711,32	750,07	27,113	0,7251

SMU= Sal mineral com ureia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; EPM = Erro padrão da média.

As proteínas totais no sangue não diferiram em função dos tempos de coleta e suplemento utilizado. Entretanto, animais recebendo SMU apresentaram menor concentração de albumina no soro sanguíneo que animais suplementados com SGM (Tabela 7; $P > 0,05$). A concentração de ureia menor no tempo 8 que no tempo 20 horas, com médias de 43 e 51,5 mg/dL, respectivamente. O sangue de animais suplementados com SGM apresentaram maior quantidade dos AAs isoleucina, treonina e cistina que animais suplementados com SMU (Tabela 7, $P < 0,05$). A lisina e fenilalanina não foram observadas nas amostras de sangue. Já os demais AAE e AANE não foram afetados pelo tipo de suplemento fornecido aos animais ($P > 0,05$).

Tabela 7. Parâmetros sanguíneos e composição de aminoácidos no plasma sanguíneo de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das secas e suplementados ou não com fonte de PNDR

	Suplemento		EPM	P-valor		
	SMU	SGM		Tempo	Suplemento	T x S
Proteínas totais, g/dL	7,28	7,05	0,148	0,1382	0,2871	0,3663
Albumina, g/dL	2,41 ^b	2,52 ^a	0,052	0,6376	0,0168	0,8199
Uréia, mg/dL	46,21	48,29	1,978	<0,001	0,2371	0,2691
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, $\mu\text{mol/L}$)</i>						
Arginina	0,008	0,009	0,0004	-	0,4873	-
Histidina	0,006	0,008	0,0005	-	0,5905	-
Isoleucina	0,005 ^b	0,007 ^a	0,0003	-	0,0486	-
Leucina	0,006	0,007	0,0006	-	0,5941	-
Metionina	0,006	0,007	0,0004	-	0,2696	-
Treonina	0,005 ^b	0,007 ^a	0,0003	-	0,0472	-
Valina	0,002	0,002	0,0001	-	0,9075	-
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, $\mu\text{mol/L}$)</i>						
Alanina	0,008	0,011	0,0006	-	0,0739	-
Ácido Aspártico	0,004	0,005	0,0002	-	0,2712	-
Cistina	0,004 ^b	0,007 ^a	0,0004	-	0,0146	-
Ácido Glutâmico	0,007	0,008	0,0003	-	0,7613	-
Glicina	0,001	0,002	0,0001	-	0,0954	-
Prolina	0,016	0,020	0,0010	-	0,3381	-
Serina	0,004	0,005	0,0002	-	0,1212	-
Tirosina	0,001	0,001	0,0001	-	0,1346	-

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. SMU= Sal mineral com ureia; SGM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; EPM = Erro padrão da média.

4. Discussão

A quantia de cada AA disponível para o animal varia de acordo com a ingestão de MS, composição da PNDR, proteína microbiana (Pmic) e digestibilidade intestinal

de cada AA (Rulquin e Vérité, 1996, Brito et al., 2014), além das diferenças do metabolismo intermediário do ruminante, transformação dos alimentos devido a fermentação ruminal (Rodriguez, 1996). Neste estudo não houve diferença no consumo de MS (CMS) e proteína bruta (CPB), porém apesar do CPB não apresentar diferença estatística, o consumo de aminoácidos diferiu entre as suplementações como esperado, graças ao perfil aminoácídico do SGM. Embora a ingestão de AA não indica suprimento deste a nível intestinal devido a transformações a nível ruminal, a diferença no perfil de AA da PB consumida é um dos maiores responsáveis pelo aporte de N para síntese de Pmic no rúmen. .

Os animais foram alimentados com forrageiras tropicais, as quais possuem alto potencial produtivo, mas no período seco do ano possuem baixa eficiência de utilização, graças ao aumento da lignificação da parede celular neste período, diminuindo sua digestibilidade e consumo (Capítulo 2, Dias (2021)), consequentemente podendo limitar a síntese de Pmic e o fluxo de AA. Quando o consumo de proteína é baixo a síntese de Pmic será restringida devido à escassez de PDR para o crescimento microbiano o que reduz a fermentação ruminal e a ingestão de matéria seca (Firkins et al., 2007; Li et al., 2013). Embora neste estudo se tenha fornecido ureia como fonte de NNP para que não houvesse limitação da síntese de Pmic, fato que fica evidenciado na concentração de amônia disponível no rúmen, os resultados evidenciaram que esta não foi efetiva em promover o aumento da síntese de Pmic devido composição da forrageira que possuía digestibilidade potencial extremamente baixa, prejudicando a disponibilidade energética.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa na síntese de Pmic entre animais suplementados com NNP (SMU) e PNDR (SGM), não alterando o fluxo de AA de origem microbiana, podemos observar que Pmic, em animais suplementados com SMU contribuiu com 16,83% do fluxo de AA totais para o duodeno, enquanto a Pmic de animais suplementados com SMG contribuiu com 13,08%. Zhao et al. (2020) evidencia que dietas a base de forrageiras o fluxo de AA para o duodeno é diminuto por conta da diminuição do fluxo de AA microbiano causado pela alta fibra alimentar lignificada, que causa diminuição do aproveitamento do N disponível para o crescimento microbiano.

Os resultados obtidos divergem do encontrado por Zhao et al. (2020) que observou diferença no fluxo de AA, quando estudou o fluxo duodenal e digestibilidade de AA de vacas em lactação recebendo dietas com diferentes tamanhos de partícula da silagem e relação volumoso : concentrado com similar energia e proteína, identificando que a relação volumoso : concentrado da dieta obteve efeito no fluxo de PB e de AA para o duodeno graças a diferença no CMS, onde a alta fibra obteve menores fluxos. Estes resultados diferem do presente estudo, pois nossos animais receberam a mesma dieta basal e com teores de proteína semelhantes, não inferindo diferença também no CMS.

Esperava-se que a SGM resultasse em maior fluxo de AA de origem PNDR para o intestino, fato que não ocorreu provavelmente devido ao baixo consumo de N (Batista et al., 2016). A PNDR em animais suplementados com SGM contribuiu com 86,95% do fluxo total de AA no duodeno, enquanto os suplementados com SMU contribuiu com 83,17% do fluxo total de AA no duodeno advindo da PNDR, estes últimos tem esses AA da PNDR oriunda da forragem somente.

A digestibilidade dos AA não é constante em diferentes dietas com variações proteicas e energéticas (Yang e Beauchemin, 2004; Huang et al., 2019). Alta degradação ruminal proteica altera a síntese de Pmic (Broderick, 1995) e proteína menos degradáveis no rúmen podem aumentar a disponibilidade de aminoácidos no intestino delgado (Henson et al., 1997), gerando diferenças nas digestibilidades porém a falta de energia digestível afeta essas mudanças na degradação ruminal (Ladeira et al., 2002). Assim a digestibilidade dos AA neste estudo foi semelhante devido ao aporte de aminoácidos que chegou ao intestino para ser digerido ter sido o mesmo nos dois tratamentos, graças a síntese de proteína microbiana no rúmen e os aminoácidos advindos da PNDR.

Os resultados encontrados neste estudo diferem do observado por Souza et al. (2020), o qual evidenciou que alimentação de bovinos com diferentes fontes proteicas leva a um perfil distinto de AA na Pmic. O NNP devido a sua disponibilidade tende a aumentar a síntese de Pmic, melhorando a quantia de AA de origem microbiana que chega ao intestino, enquanto a PNDR fornece AA que não são degradados no rúmen e vão para o intestino sem alteração. O NNP neste estudo não foi efetivo em

proporcionar maior aporte de AA de origem microbiana do que a PNDR, pois a síntese microbiana depende do CPB, como já evidenciado anteriormente.

Os resultados de composição de AA no sangue são de difícil interpretação (Batista et al., 2016). Porém, Richardson e Hatfield (1978) indicaram que os três primeiros aminoácidos limitantes para bovinos em fase de crescimento são a metionina, lisina e treonina. Gibb et al. (1992) consideram que a diminuição da composição de algum AA no sangue indicaria que eles são limitantes, assim neste estudo a lisina e fenilalanina que não foram observados no sangue são os maiores limitantes em ambas as suplementações, indicando sua limitação.

Embora não tenha ocorrido diferença entre as fontes suplementares de N no fluxo de AA, observou-se maior concentração dos AA isoleucina, treonina e cistina no sangue de animais suplementados com SGM. Indicando efeitos positivos na absorção destes AAs, comparando SMU e SGM. A redução destes AAs no plasma de animais recebendo SMU indica uma maior utilização destes provavelmente por serem limitantes para a síntese de proteínas nos tecidos corporais (Gibb et al., 1992).

Os metabólitos sanguíneos são usados para se avaliar a nutrição do animal, as proteínas totais, albumina e ureia indicam o status proteico do animal. A quantia de albumina é um indicador do conteúdo proteico da dieta a longo prazo, além de ser uma reserva proteica e transportador de aminoácidos (González e Scheffer, 2003). Neste estudo a albumina foi maior nos animais do SGM possivelmente pela composição de aminoácidos deste suplemento. A ureia sanguínea é um indicador do metabolismo proteico, sendo sintetizada em quantidade proporcional a amônia produzida no rúmen e associada a proteína e a relação proteína/energia dietética (Wittwer et al., 1993), além disso concentrações de ureia sanguínea variando entre 13 a 15 mg/dL representa limite para perda proteica (Oliveira et al., 2001), assim os resultados encontrados neste estudo indicam alta perda de N. No caso de altos níveis de ureia no sangue em animais com déficit energético, isso pode indicar um balanço energético negativo, levando a um aproveitamento de AA para obtenção de energia (Church, 1993), assim como um déficit de AA devido a AA limitantes ao uso dos demais. O que pode explicar o ocorrido neste estudo, pois o valor da ureia no sangue dos animais foi elevado, no entanto houve baixa retenção de N, sendo este

um indicativo de que AAs estavam sendo catabolizados para atender a demanda energética, gerando acúmulo de amônia (Russell et al., 1992).

Os dados de retenção de N extremamente baixos indicam dependência da disponibilidade energética no metabolismo para melhora da retenção (Schroeder e Titgemeyer, 2008), assim neste estudo, assim como o encontrado por Lazzarini (2011), a suplementação exclusivamente proteica não auxiliou no aumento da retenção de N corporal dos animais, independente da fonte utilizada.

No entanto, os resultados de fluxo e digestibilidade de AA deste estudo poderão ser utilizados na predição de modelos futuros de formulação de ração que devem levar em consideração a variação entre diferentes dietas e fatores de coeficiente específicos para a digestibilidade e a eficiência de uso individual dos AA em condições específicas (Souza et al., 2020).

5. Conclusão

A suplementação com PNDR neste estudo, não resultou em maior fluxo de aminoácidos para o duodeno, mas resultou em maior teor de isoleucina, treonina e cistina no sangue dos animais que receberam a dieta com SGM. Embora tenha sido observada essa maior concentração sanguínea desses AA, a suplementação com PNDR não aumentou a eficiência de utilização do N. Assim como a suplementação com NNP não resultou em aumento de AA proveniente da Pmic no duodeno.

6. Referências

Abbasi IHR, Abbasi F, Abd El-Hack ME, Abdel-Latif MA, Soomro RN, Hayat K, Mohamed MAE, Bodinga BM, Yao J, Cao Y (2018). Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 181-190.

Allison RD, Garnsworthy PC (2002). Increasing the digestible undegraded protein intake of lactating dairy cows by feeding fishmeal or a rumen protected vegetable protein blend. **Animal feed science and technology**, v. 96, n. 1-2, p. 69-81.

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. (1995). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th ed. Washington.

Batista ED, Detmann E, Titgemeyer EC, Valadares Filho SC, Valadares RFD, Prates LL, Rennó LN, Paulino MF (2016). Effects of varying ruminally undegradable protein supplementation on forage digestion, nitrogen metabolism, and urea kinetics in Nellore cattle fed low-quality tropical forage. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 201-216.

Broderick GA (1995). Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p.2760-2773.

Brito AF, Tremblay GF, Bertrand A, Castonguay Y, Bélanger G, Michaud R, Berthiaume R (2014). Alfalfa baleage with increased concentration of nonstructural carbohydrates supplemented with a corn-based concentrate did not improve production and nitrogen utilization in early lactation dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 11, p. 6970-6990.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren AM (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1184.

Cecava MJ, Merchen NR, Gay LC, Berger LL (1990). Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 9, p. 2480-2488.

Church DC (1993). **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. Zaragoza: Acríbia. 641p.

Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323.

Dijkstra J, Kebreab E, Mills JAN, Pellikaan WF, López S, Bannink A, France J. (2007). Predicting the profile of nutrients available for absorption: from nutrient requirement to animal response and environmental impact. **Animal**, v. 1, n. 1, p. 99-111.

Fenner H (1965). Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 249–251.

Figueiras JF, Detmann E, Paulino MF, Valente TNP, Valadares Filho SDC, Lazzarini I (2010). Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1303-1312.

Firkins JL, Yu Z, Morrison M (2007). Ruminal nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E1-E16, 2007.

Fujihara T, Ørskov ER, Reedsa PJ, Kylea DJ (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.109, p.7-12.

Garnsworthy PC, Lock A, Mann GE, Sinclair KD, Webb R (2008). Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3814-3823.

Gibb DJ, Klopfenstein TJ, Britton RA, Lewis AJ (1992). Plasma amino acid response to graded levels of escape protein. **Journal of animal science**, v. 70, n. 9, p. 2885-2892.

González FHD, Scheffer JLFS (2003). Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária (1.; 2003, Porto Alegre)**.

Hagen SR, Augustin J, Grings E, Tassinari P (1993). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. **Food chemistry**, v. 46, n. 3, p. 319-323, 1993.

Harstad OM, Prestløkken E (2001). Rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in corn gluten meal, canola meal and fish meal determined in situ. **Animal Feed Science and Technology**, v. 94, n. 3-4, p. 127-135.

Henson JE, Schigoethe DJ, Maiga HA (1997). Lactational evaluation of protein supplements of varying ruminal degradabilities. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.2p.385-392.

Huang X, Estes KA, Yoder PS, Wang C, Jiang N, Pilonero T, Hanigan MD (2019). Assessing availability of amino acids from various feedstuffs in dairy cattle using a stable isotope-based approach. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 12, p. 10983-10996.

Ipharraguerre IR, Clark JH (2005). Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E22-E37.

Ipharraguerre IR, Clark JH (2014). A meta-analysis of ruminal outflow of nitrogen fractions in dairy cows. **Advances in Dairy Research**, p. 1-13.

Kozloski GV, Netto DP, de Oliveira L, Maixner AR, Leite, DT, Maccari M, ... de Quadros FLF (2006). Chromium oxide use as a marker for measuring fecal production of grazing cattle: estimative variations due to sampling schedule.

Ladeira MM, Rodriguez NM, Borges I, Gonçalves LC, Saliba EDOS, Miranda LF (2002). Balanço de nitrogênio, degradabilidade de aminoácidos e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen de ovinos alimentados com feno de *Stylosanthes guianensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2357-2363.

Lazzarini I, Detmann E, Sampaio CB, Paulino M F, Valadares Filho SC, Souza MA, Oliveira FA (2009). Transit and degradation dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and nitrogenous compounds. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 635-647.

Lazzarini I (2011). Desempenho nutricional de bovinos em pastejo durante os períodos de seca e de águas suplementados com compostos nitrogenados e/ou amido.

Leonardi C, Stevenson M, Armentano LE (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4033-4042.

Li C, Beauchemin KA, Yang WZ (2013). Effects of supplemental canola meal and various types of distillers grains on ruminal degradability, duodenal flow, and intestinal digestibility of protein and amino acids in backgrounded heifers. **Journal of animal science**, v. 91, n. 11, p. 5399-5409.

Matsuzaki K, Sugishita KI, Harada M, Fujii N, Miyajima K (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1327, n. 1, p. 119-130.

Mertens DR (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217-1240.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine – NASEM (2016). Nutrient requirements of beef cattle. 8th ed. **Nutrient requirements of domestic animals**. National Academy Press, Washington, DC, 494p.

National Research Council – NRC (2001). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: D.C. 363p.

National Research Council – NRC (2016). **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington: D.C.

Oliveira AS, Valadares RFD, Valadares Filho SDC, Cecon PR, Rennó LN, Queiroz ACD, Chizzotti ML (2001). Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629.

Richardson CR, Hatfield EE (1978). The limiting amino acids in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.46, p.740-748.

Rodriguez NM (1996). Exigências em aminoácidos para vacas de alta produção. **Simpósio Latino-Americano de Nutrição Animal e Seminário sobre Tecnologia da Produção de Rações**, p. 103-137.

Rulquin H, Vérité R (1996). Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. **Recent developments in ruminant nutrition 3.**, p. 71-93.

Russell JB, O'connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 1. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3551- 3561.

Santos S, Rotta PP, Costa e Silva LF, Menezes ACB, Pina DS, Valadares Filho SC (2016). Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana. **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados: BR-Corte**, v. 3, p. 45-88.

Schwab CG (2010). Balancing diets for amino acids: Nutritional, environmental and financial implications. In: **Proceedings of the 19th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference, Grand Wayne Center, Fort Wayne, Indiana, USA, 20-21 April, 2010**. Purdue University Press.

Schroeder GF, Titgemeyer EC (2008). Interaction between protein and energy supply on protein utilization in growing cattle: a review. **Livestock science**, v. 114, n. 1, p. 1-10.

Souza VC, Messana JD et al (2020). Assessing amino acid utilization in young Nellore steers fed high-concentrate diets with different sources and levels of nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114642.

Titgemeyer EC (2003). Amino Acid Utilization by Growing and Finishing Ruminants. **Amino acids in animal nutrition**, p. 329.

Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal Science Food Agricultural**, v.31, n.7, p.625-632.

Valadares Filho SC, Costa e Silva LF (2016). Cálculo de exigências nutricionais, formulação de dietas e predição de desempenho de zebuínos puros e cruzados. **Retrieved April**, v. 24, p. 2017.

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

Wittwer F, Reyes JM, Opitz H, Contreras PA, Böhmwald H (1993). Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. **Arch. Med. Vet**, v. 25, n. 2, p. 165-172.

Yang WZ, Beauchemin KA (2004). Grain processing, forage-to-concentrate ratio, and forage length effects on ruminal nitrogen degradation and flows of amino acids to the duodenum. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 8, p. 2578-2590.

Zhao YL, Yan SM, Beauchemin KA, Yang WZ (2020). Feeding diets varying in forage proportion and particle length to lactating dairy cows: II. Effects on duodenal flows and intestinal digestibility of amino acids. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 5, p. 4355-4366.

Zhuang H, Tang N, Yuan Y (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1810-1821.

Zinn RA, Owens FN (1986). A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. **Canadian Journal of Animal Science**, 66 (1):157-166.