

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

**EFICIÊNCIA DE USO DE AMINOÁCIDOS E
COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL EM
BOVINOS EM PASTEJO, NO PERÍODO ÁGUAS E
SECAS E SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PNDR.**

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves
Zootecnista

2023

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

**EFICIÊNCIA DE USO DE AMINOÁCIDOS E
COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL EM
BOVINOS EM PASTEJO NO PERÍODO ÁGUAS E
SECAS E SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PNDR.**

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadoras: Dra. Juliana Duarte Messana

Dra. Yury Tatiana Granja-Salcedo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutora em Zootecnia (Nutrição e Alimentação Animal).

2023

A474e

Alves, Kênia Larissa Gomes Carvalho

Eficiência de uso de aminoácidos e comunidade microbiana ruminal em bovinos em pastejo, no período águas e secas e suplementados com fontes de pndr / Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves. -- Jaboticabal, 2023

105 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Telama Terisinha Berchielli

Coorientadora: Juliana Duarte Messana

1. Aminoácidos. 2. Farelo de soja protegido. 3. Fibrobacter. 4. Glúten de milho. 5. Prevotellaceae.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFICIÊNCIA DE USO DE AMINÓCIDOS E COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL EM BOVINOS EM PASTEJO, PERÍODO ÁGUAS E SECAS, SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PNDR

AUTORA: KÊNIA LARISSA GOMES CARVALHO ALVES
ORIENTADORA: TELMA TERESINHA BERCHIELLI
COORIENTADORA: YURY TATIANA GRANJA-SALCEDO
COORIENTADORA: JULIANA DUARTE MESSANA

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

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

Documento assinado digitalmente
 JULIANA DUARTE MESSANA
 Data: 15/12/2022 15:47:19-0300
 Verifique em <https://verificador.dfe.br>

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

Documento assinado digitalmente
 RICARDO ANDRADE REIS
 Data: 15/12/2022 08:35:48-0300
 Verifique em <https://verificador.dfe.br>

Pesquisadora Dra. RENATA HELENA BRANCO ARNANDES (Participação Virtual)
 Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Prof. Dr. GIOVANI FIORENTINI (Participação Virtual)
 Departamento de Zootecnia/Universidade Federal de Pelotas / Pelotas/RS

Giovani Fiorentini

Pós-doutoranda LORRAYNY GALORO DA SILVA (Participação Virtual)
 Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Lorrayny S.

Jaboticabal, 15 de dezembro de 2022

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de
 Jaboticabal -
 Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellani, s/n, 13880-000
 Jaboticabal - SP
 Fone: (16) 3301-9100 / Fax: (16) 3301-9101 / E-mail: fca@unesp.br



Assinado em nome de RENATA HELENA BRANCO ARNANDES - Diretor Técnico de Departamento / APTA-DGE-DG - 19/12/2022 às 15:51:30.
 60329899-7375 - consulta à autenticidade em <https://www.documentos.spsistemas.sp.gov.br/sigaes/public/apo/autenticar?m=60329899-7375>



SACAP2 02 22 34 56

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves – Nascida na cidade de Araçatuba-SP, em 09 de maio de 1988, filha de Vera Lúcia Gomes Carvalho Alves e Cláudio Carvalho Alves. De 2012 a 2016 desenvolveu o curso de graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia e Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá, sendo foi bolsista de iniciação científica do CNPq sobre a orientação da professora Dra. Rosemary Laís Galati. De 2017 a 2019 desenvolveu o Mestrado em Zootecnia, área de nutrição e alimentação animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli e bolsista CNPq e FAPESP. Em março de 2019 ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia, área de nutrição e alimentação animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli e bolsista CNPq.

MENSAGEM

“Se tentaram matar os teus sonhos
Sufocando o teu coração
Se lançaram você numa cova
E, ferido, perdeu a visão

Não desista, não pare de crer
Os sonhos de Deus jamais vão morrer
Não desista, não pare de lutar
Não pare de adorar”
(música: **Os sonhos de Deus- Gabriela Rocha**)

Dedico

Aos meus pais **Cláudio Carvalho Alves**
e **Vera Lúcia Gomes Carvalho Alves**.

Aos meus irmãos **Karine** e **Rodrigo**.

Aos meus sobrinhos **Bernardo, Kal** e **Cecília**

e a toda **minha família**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu força e sabedoria para continuar e concluir mais esta etapa de minha vida.

À minha família, meus pais Cláudio e Vera, meus irmãos Karine e Rodrigo, meus sobrinhos que amo muito Bernardo, Kal e Cecília. Ao Leandro pelas conversas e incentivos. A Karina Bandeira Barros que por toda sua vida me incentivou nos meus estudos e me comprometo fazer o mesmo pelo Kal.

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

A outorgante, processo número 140912/2019-3, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida. E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento concedido por meio do processo número 2016/12992-6.

As minhas orientadoras Prof. Dr^a. Telma Teresinha Berchielli, Dr^a Juliana Duarte Messana e Dr^a Yury Tatiana Granja-Salcedo pela paciência e ensinamentos durante todo este período de execução do trabalho.

Aos professores Ricardo Andrade Reis, Flávia Adriane Sales Silva, Luciano da Silva Cabral, Renata Helena Branco Arnades e Giovani Fiorentini. As pesquisadoras Dr^a Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes e Lorryny Galoro da Silva que contribuíram com este trabalho em forma de discussão de dados no exame de defesa de projeto, qualificação e defesa de tese.

A Paloma Helena Gonçalves por dividir esse doutorado comigo, agradeço por toda alegria e choro compartilhado até o final. Acredito no propósito desse encontro, que proporcionou e proporciona grandes ensinamentos. Ao Vlade pela paciência e ajuda durante todo o experimento. Aos estagiários que ajudaram proporcionando o seu melhor, muito obrigada.

Aos amigos que me ajudaram a manter constância até o final do doutorado com o apoio, ensinamentos e muitas risadas: Rayanne, Karine, Laura, Sérgio, Vinicius, Lucas,

Helo, Thuanny, Edvania, Isis, Lais, Carlos Eduardo, Arthur, Leni, Isabela, Ana Paula, Marina, Junior, Tito Júlia, Maria Carolina, Juliana, João e Érika.

A Priscila que me ajudou a manter a saúde mental, não teria conseguido sem seu apoio.

A todos muito obrigada!

Sumário

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS.	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
<u>CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</u>	<u>1</u>
1. <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	1
2. <u>OBJETIVO</u>	7
3. <u>REFERÊNCIAS</u>	7
<u>CAPÍTULO 2- DIVERSIDADE MICROBIANA RUMINAL, PARÂMETROS SANGUÍNEOS E RUMINAIS, FLUXO E DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM BOVINOS DE CORTE A PASTO SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN NA ESTAÇÃO CHUVOSA.</u>	<u>13</u>
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	15
2. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	16
2.1. <u>Animais, desenho experimental e dietas.</u>	17
2.2. <u>Amostragem do pasto e do suplemento</u>	19
2.3. <u>Consumo, fluxo e digestibilidade</u>	20
2.4. <u>Parâmetros ruminais</u>	21
2.5. <u>Nitrogênio microbiano e balanço de nitrogênio</u>	22
2.6. <u>Parâmetros sanguíneos</u>	23
2.7. <u>Determinação da composição de aminoácidos nas amostras</u>	24
2.8. <u>Comunidade bacteriana ruminal</u>	24
2.9. <u>Análise estatística</u>	25
3. <u>RESULTADOS</u>	26
3.1. <u>Consumo, fluxo e digestibilidade</u>	26
3.2. <u>Parâmetros ruminais, balanço de nitrogênio e parâmetros sanguíneos</u>	31
3.3. <u>Comunidade microbiana</u>	33
4. <u>DISCUSSÃO</u>	39
5. <u>CONCLUSÃO</u>	44
6. <u>REFERÊNCIAS</u>	44
7. <u>MATERIAL SUPLEMENTAR</u>	52
<u>CAPÍTULO 3- EFEITO DA TERMINAÇÃO INTENSIVA A PASTO NO PERÍODO</u>	

<u>DA SECA COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA SOBRE A DIVERSIDADE MICROBIANA RUMINAL, FLUXO E DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM BOVINOS DE CORTE.</u>	53
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	55
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	56
<u>2.1. Animais, delineamento experimental e dietas</u>	57
<u>2.2. Amostragem do pasto e do suplemento</u>	59
<u>2.3. Consumo, fluxo e digestibilidade</u>	60
<u>2.4. Parâmetros ruminais</u>	61
<u>2.5. Balanço de nitrogênio</u>	62
<u>2.6. Parâmetros sanguíneos</u>	63
<u>2.7. Determinação da composição de aminoácidos nas amostras</u>	63
<u>2.8. Comunidade bacteriana</u>	63
<u>2.9. Análise estatística</u>	65
<u>3. RESULTADOS</u>	65
<u>3.1. Consumo, fluxo e digestibilidade</u>	65
<u>3.2. Parâmetros ruminais, balanço de nitrogênio e parâmetros sanguíneo</u>	70
<u>3.3. Comunidade bacteriana</u>	73
<u>4. DISCUSSÃO</u>	79
<u>5. CONCLUSÃO</u>	84
<u>6. REFERENCIAS</u>	84
<u>7. MATERIAL SUPLEMENTAR</u>	90



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

EFICIÊNCIA DE USO DE AMINOÁCIDOS E COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL EM BOVINOS EM PASTEJO, NO PERÍODO ÁGUAS E SECAS E SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PNDR

Resumo: Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes proteicas (sal mineral, farelo de soja, farelo de soja protegido e glúten de milho) sobre o consumo de matéria seca e nutrientes, parâmetros ruminais, fluxo e digestibilidade de AA, diversidade microbiana ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos Nelore mantidos a pasto durante período de águas e seca. No experimento 1 - capítulo 2 - foram utilizados seis novilhos, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em delineamento *cross over* recebendo um dos três suplementos: 1) suplementação com sal mineral (SM) ad libitum; 2) suplementação com 0,3% PC de farelo de soja protegido (FSP) e 3) suplementação com 0,3% PC de glúten de milho (GM) durante três períodos experimentais. O consumo de AA totais, aminoácidos essenciais (AAE) e aminoácidos não essenciais (AANE) foi 30% maior nos animais suplementados com FSP e GM quando comparado ao SM ($P < 0,05$). Animais suplementados com GM e FSP tenderam a apresentar fluxo de AA individuais similares ($P \geq 0,01$) e ambas as fontes resultaram em maior de fluxo de Met, Phe, Val, Ala, Cis, Glu, Ser e Tir quando comparada a SM ($P \leq 0,01$). A proteína total plasmática foi superior em animais suplementados com FSP quando comparada aos SM ($P = 0,049$), a ureia plasmática apresentou maior concentração em animais suplementados com GM em comparação com SM ($P = 0,038$). Entre os filos encontrados, o filo SR1_ (Absconditabacteria) estiveram presentes, em média de 6,69%, somente nos tratamentos SM e FSP. A suplementação com fontes de PNDR proporcionou maior diversidade microbiana associada ao consumo de AA individuais, tais achados refletiram em maior aporte de proteína metabolizável que chega ao duodeno pelo fluxo de AA totais, AAE e AANE. No experimento 2 - capítulo 3 - foram utilizados oito bovinos Nelore, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em delineamento *cross over*. Os animais receberam 1,8% peso corporal do suplemento (suplementação intensiva a pasto, período seco) composto por polpa cítrica, milho, sal mineral e umas das diferentes fontes proteicas: 1) farelo de soja (FS) como fonte de PDR; 2) farelo de soja protegido (FSP) como fonte de PNDR; 3) glúten de milho 60 (GM) como fonte de PNDR. O consumo de PDR foi maior em animais suplementados com FS em comparação com FSP e GM. O consumo de AA totais e AANE (kg/dia) foram superiores para com GM em comparação com outros suplementos (GM vs FS, 22,43%, e GM vs FSP, 30,61%). A concentração isovalorato foi 27,10% menor para FSP comparado com FS. A suplementação com FSP e GM proporcionou maior abundância relativa do Methonospaera ($P = 0,024$) comparado a FS. O gênero Thermoplasmatales_Incertae_Sedis_Uncultured apresentou maior abundância relativa na suplementação com FSP em comparação FS. A família Bacteroidales com gêneros distintos foram diferentes entre as suplementações, apresentando maior abundância relativa com FS. O gênero Fibrobacter tendeu à maior abundância relativa quando os animais recebiam FS e FSP ($P = 0,087$). FSP e GM tendeu à maior abundância relativa dos gêneros Christensenellaceae Uncultured ($P = 0,058$), Lachnospiraceae_ND3007_group ($P = 0,065$) e resultou em maior abundância da família Mycoplasmataceae ($P = 0,032$). A suplementação com FS resultou em digestibilidade aparente ruminal da proteína

bruta 7,82% superior quando comparada a GM. Em relação aos AA individuais, a suplementação com FSP proporcionou um aumento de 17,77% na digestibilidade intestinal da arginina quando comparada a animais que foram suplementados com FS. A concentração plasmática de lisina foi superior em 55,81% em animais suplementados com FSP e GM em comparação com FS. Concluímos que a terminação intensiva a pasto, com diferentes fontes proteicas promoveu a alteração na abundância relativa da diversidade ruminal dos gêneros Christensenellaceae Uncultured, Lachnospiraceae_ND3007_group e Mycoplasmataceae e as metanogênicas Methanospaer e fontes com maiores teores de PNDR alteram a digestibilidade aparente intestinal dos AA de forma individual, sendo GM com maiores valores de digestibilidade intestinal em comparação com FSP. Concluímos que as fontes proteicas proporcionaram modificação na diversidade microbiana no ambiente ruminal em bovinos Nelores no sistema de pastejo em diferentes estações do ano.

PALAVRAS-CHAVE: aminoácidos, farelo de soja, farelo de soja protegido, glúten de milho, Fibrobacter, Prevotellaceae Thermoplasmatales incertae sedis

EFFICIENCY OF USE OF AMINO ACIDS AND RUMINAL MICROBIAL COMMUNITY IN BOVINE GRAZING IN THE WATERS AND DRY PERIODS AND SUPPLEMENTED WITH PNDR SOURCES

Abstract: The objective was to evaluate the effect of different protein sources (mineral salt, soybean meal, protected soybean meal and corn gluten) on the intake of dry matter and nutrients, ruminal parameters, flow and digestibility of AA, ruminal microbial diversity and blood parameters in Nelore cattle kept on pasture during wet and dry periods. In chapter 2, six steers were used, cannulated in the rumen and duodenum, distributed in a cross over design receiving one of the three supplements: 1) supplementation with mineral salt (SM) ad libitum; 2) supplementation with 0.3% BW protected soybean meal (FSP) and 3) supplementation with 0.3% BW corn gluten (GM) during three experimental periods. The consumption of total AA, essential amino acids (EAA) and non-essential amino acids (AANE) was 30% higher in animals supplemented with FSP and GM when compared to SM ($P < 0.05$). Animals supplemented with GM and FSP tended to have similar individual AA flux ($P \geq 0.01$) and both sources resulted in greater flux of Met, Phe, Val, Ala, Cys, Glu, Ser and Tir when compared to SM ($P \leq 0.01$). Total plasma protein was higher in animals supplemented with FSP when compared to SM ($P = 0.049$), urea had a higher plasma concentration with GM compared to SM ($P = 0.038$). Among the phyla found, the phylum SR1_(Absconditabacteria) were present, on average 6.69%, only in the SM and FSP treatments. Supplementation with PNDR sources provided greater microbial diversity associated with the consumption of individual AA, such findings reflected in a greater supply of metabolizable protein that reaches the duodenum through the flow of total AA, AAE and AANE. In chapter 3, eight Nelore cattle, cannulated in the rumen and duodenum, were distributed in a cross over design, in the dry period with intensive supplementation to pasture. The animals received 1.8% body weight of the supplement composed of citrus pulp, corn, mineral salt and one of the different protein sources: 1) soybean meal (SF) as a source of PDR; 2) protected soybean meal (FSP) as a source of PNDR; 3) corn gluten 60 (GM) as source of PNDR. The consumption of PDR was higher in animals supplemented with FS compared to FSP and GM (FS vs. consumption of total AA and AANE (kg/day) was higher for with GM compared to other supplements (GM vs FS 22.43% and GM vs FSP 30.61%). Isovalerate concentration was 27.10% lower for FSP compared to FS. Supplementation with FSP and GM provided greater relative abundance of the *Methonosphaera* ($P = 0.024$) compared to FS. The genus *Thermoplasmatales_Incertae_Sedis_Uncultured* showed greater relative abundance in supplementation with FSP compared to FS. The Bacteroidales family with different genera were different between supplementations, showing greater relative abundance with FS. The genus *Fibrobacter* tended to be more relative abundance when animals received FS and FSP ($P = 0.087$). FSP and GM tended to greater relative abundance of the genera *Christensenellaceae* *Uncultured* ($P = 0.058$), *Lachnospiraceae_ND3007_group* ($P = 0.065$) and resulted in greater abundance. that of the *Mycoplasmataceae* family ($P = 0.032$). Supplementation with FS resulted in ruminal apparent digestibility of crude protein 7.82% higher when compared to GM. Regarding individual AA, supplementation with FSP provided an increase of 17.77% in the intestinal

digestibility of arginine when compared to animals that were supplemented with PS. Plasma lysine concentration was 55.81% higher in animals supplemented with FSP and GM compared to FS. We conclude that intensive finishing on pasture, with different protein sources, promoted changes in the relative abundance of ruminal diversity of the genera Christensenellaceae Uncultured, Lachnospiraceae_ND3007_group and Mycoplasmataceae and the methanogenic Methanosphaera and sources with higher levels of PNDR alter the apparent intestinal digestibility of AA individually, being GM with higher values of intestinal digestibility compared to FSP. We conclude that the protein sources provided modification in the microbial diversity in the ruminal environment of Nellore cattle in the grazing system in different seasons.

KEYWORDS: amino acids, soybean meal, protected soybean meal, corn gluten, Fibrobacter, Prevotellaceae Thermoplasmatales incertae sedis

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. REVISÃO DE LITERATURA

A cultura forrageira é a principal fonte de alimento para os ruminantes, ocupando aproximadamente 60% das terras agrícolas globais (Hart et al., 2022). O uso eficiente da fração fibrosa das forragens por ruminantes é decorrente da sua evolução, que proporcionou uma simbiose com microrganismos no ambiente ruminal, os quais tem a capacidade de romper as ligações β 1-4 de carboidratos, cujos produtos da fermentação são utilizados, como fonte de energia e proteína para o metabolismo do ruminante (Van Soest, 1994).

Atualmente, o desafio na produção de alimentos é a melhor eficiência no uso dos recursos naturais (solo e água) e diminuição dos impactos ambientais gerados pelo setor (Gleison e White, 2019). Portanto, uma das direções em estudos com ruminantes é relacionada à compreensão da microbiota ruminal, a fim de elucidar seu complexo ecossistema habitado por protozoários, bactérias anaeróbias, fungos e archaeas (Huws et al., 2018) e a interação com os nutrientes fornecidos na dieta.

Na nutrição de ruminantes as dietas são compostas por fontes de volumosos (forragens *in natura* ou conservadas) ou concentrados (divididos em energéticos e proteicos), sendo necessário fornecer uma dieta balanceada entre energia e proteína, possibilitando assim um ambiente que maximize o crescimento e a atividade desses microrganismos (Matthewes et al., 2018). A degradação ruminal dos carboidratos influencia a síntese de proteína microbiana (Pmic), pois, uma rápida taxa de degradação pode contribuir para maior eficiência de formação da Pmic (Van Soest et al., 1991). A Pmic pode ser responsável por cerca de 50-90% dos requisitos em proteína metabolizável dos ruminantes, sendo que fatores que afetam negativamente sua síntese no rúmen podem limitar seu suprimento para animais de alta produção (leite e carne) (Bento et al., 2016; Pfau e Hummel, 2019).

A proteína metabolizável (PM) que chega ao intestino para ser absorvida é o produto da somatória entre a Pmic (55 a 80%), proteínas endógenas (5%) e PNDR (15 a 40%) (Sinclair et al., 2014). Sendo que animais de alta produção necessitam de uma contribuição da PNDR advinda da fonte de proteína alimentar, para que expressem seu máximo potencial de crescimento (Ribeiro et al., 2005).

Alimentos ricos em PNDR possuem maior proporção da fração B e C, que está relacionada com a taxa de degradação e taxa de passagem no trato gastrointestinal (Santos et al., 2013). Em alimentos concentrados, os altos teores de PNDR são provenientes de ingredientes que passaram por tratamentos térmicos, provocando modificações estruturais proteicas. Os grupos alfa-carbônicos e amina dos aminoácidos (AA) se tornam estáveis pela reação de Maillard, dificultando a ação das enzimas dos microrganismos (Shibao e Bastos, 2011).

No Brasil, a maior parte da produção de ruminantes é realizada a pasto, utilizando aproximadamente 158 milhões de ha (Martins, 2021). Entretanto, estes sistemas são passíveis de mudanças em quantidade e qualidade da forragem oferecida ao longo do tempo (Roth et al., 2017). Na estação chuvosa as gramíneas tropicais podem atingir uma produção de massa forrageira que correspondem a 70-80% da produção anual e tem potencial de fornecer maior qualidade, ao fornecer cerca de 16 % PB; porém a síntese de Pmic pode ser afetada pela falta de sincronismo na taxa de degradação proteína e carboidratos presente nas plantas (Costa et al., 2011; Reis et al., 2015). Por outro lado, as gramíneas tropicais na estação da seca têm o teor de PB limitado, geralmente inferior a 7%, o que também prejudica a síntese de Pmic, logo que apresenta alto teor de celulose, hemicelulose e lignina, além da redução na produção de massa de forragem e falta de N para que os microrganismos possam crescerem e utilizar a fração digestível da fibra (Figueiras et al., 2010; Reis et al., 2013; Batista et al., 2016).

Assim, a suplementação está entre as estratégias usadas para se melhorar a dieta de bovinos em pastejo, a qual pode ser proteica e/ou energética; visando aumentar a ingestão de matéria orgânica da forragem, a sua digestibilidade e, conseqüentemente, o desempenho animal (Krysl e Hess, 1993; Poppi e McLeannan, 1995; Paulino et al., 2008; Reis et al., 2015).

Na nutrição de ruminantes, os carboidratos assumem um papel importante, uma vez que a degradação ruminal destes é a principal via metabólica de liberação de energia. Estima-se que 60 a 75% da energia digestível é utilizada para a geração de produtos como ácidos graxos de cadeia curta, amônia e proteína microbiana, além de dióxido de carbono e metano (Marque e Cook, 2021).

Como mencionado anteriormente, as forrageiras sofrem sazonalidade de nutrientes disponíveis durante o ano devido às estações climáticas. Portanto, com o propósito de entender o maior aporte de nutrientes em novilhos Nelore em sistema de pastejo no período das águas, Camargo et al. (2022), forneceram suplementos com diferentes fontes de PNDR (glúten de milho ou farelo de soja protegido), e reportaram que a ingestão de proteína bruta aumentou 55%

nos animais que foram suplementados com PNDR quando comparados ao controle (sal mineral), resultando em aumento de 48% na retenção de N (g/d) e 26% no ganho de peso (kg), para ambas fontes analisada em comparação com a suplementação mineral, todavia o farelo de soja protegido apresentou melhor desempenho em comparação com o glúten de milho

Dias (2021) estudou a diversidade microbiana ruminal de bovinos Nelore em sistema de pastejo no período da seca, suplementados com fonte de PDR (Sal mineral +ureia) ou PNDR (glúten de milho) e observou que a suplementação com PNDR proporcionou aumento da abundância relativa das espécies bactérias *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus.spp*, *Papillibacter.spp*, e da família Christensenellaceae. Além disso, proporcionou um aumento de isoButirato, isoValerato e Valerato no rúmen, acarretando uma maior funcionalidade, para utilização de aminoácidos como fonte de energia para manutenção dos microrganismos e fonte de N para produção de Pmic possivelmente pela reciclagem de N na fonte de PNDR.

Ao utilizar o glúten de milho como fonte de PNDR em substituição ao milho da dieta de caprinos, Wu et al. (2020), observam que os teores de aminoácidos livres no rúmen foram 23% maiores na dieta com glúten de milho, e reportaram uma diminuição na abundância relativa de *Ruminococcus flavefaciens* demonstrando a necessidade de se entender melhor a via de assimilação de amônia para esses microrganismos. A concentração de histidina foi 75% menor na dieta com glúten de milho em relação a não substituição do milho, esse aminoácido fornece uma ligação potencial entre os microrganismos ruminais e o metabolismo do ruminante (Jiang et al., 2016).

A Pmic e PNDR são os principais contribuintes de proteína metabolizável, ou seja, os perfis de AA que chegam ao duodeno dependem da composição delas. Estudos com vacas de leite analisando a diferença entre a relação volumoso:concentrado correlacionado com o tamanho de partícula da forragem, demonstram que de maneira geral a fluxo duodenal de AA totais, AA essenciais e AA não essenciais, não apresentaram grandes diferenças no seus perfis, porém os AA individuais foram diferentes em suas concentrações, o que revela a necessidade de considerar tanto os fluxos quanto a digestibilidade de AA individual para otimizar a formulação da dieta, para atender às exigências de AA de vacas leiteiras (Li, et al., 2012; Zhao et al., 2020).

Bento et al. (2016), em um estudo com bovinos recebendo uma dieta basal com feno de baixa qualidade com intuito de ser semelhante a animais a pasto e suplementados via infusão de caseína (fonte de PDR) no rúmen, abomaso ou dividido (proporção 50: 50) no rúmen /

abomaso, observaram alterações na atividade metabólica ruminal relacionadas com a atividade de desaminação. Os autores concluíram que o fornecimento de PDR reduziu a riqueza de espécies e o índice de Shannon-Wiener no filo Bacteroidetes em novilhos suplementados com caseína no rúmen em comparação com animais não suplementados, e encontraram uma correlação positiva entre a concentração de amônia com a atividade de desaminação nos animais que receberam PDR, sendo consistente com a hipótese do estudo que a maior disponibilidade de PDR aumenta a degradação de AA por uma população mais especializada de bactérias ruminais.

Ainda se tem a necessidade de compreender melhor o papel da população microbiana na utilização do nitrogênio no animal, pois a proteólise e o catabolismo dos AA pela microbiota ruminal pode influenciar 60% a 80% do perfil de AA disponíveis presentes na Pmic para absorção duodenal (Schwab e Broderick, 2017). As bactérias responsáveis pela degradação da proteína são denominadas proteolíticas, possuindo uma eficiência utilização da proteína maior em comparação com outros microrganismos (Bach et al., 2005). As principais bactérias proteolíticas são dos gêneros *Prevotella sp*, *Bacteroides sp*, *Butyrivibrio sp.*, *Ruminobacter sp* (Kozloski, 2011; Huws et al., 2018).

As bactérias se aderem às partículas de alimentos e com essa adesão são formados biofilmes microbianos que agem em simbiose para degradar e fermentar nutrientes, como proteínas, pela ação das enzimas proteolíticas microbianas (proteases, peptidases e deaminases) (Walker et al., 2005; Huws et al., 2018). As proteínas são transformadas em peptídeos menores e AA sendo incorporados às células microbianas, isso dependerá da energia disponível no ambiente ruminal, quando se tem sincronismo desses nutrientes os AA são transaminados ou irão se incorporar diretamente a Pmic (Bach et al., 2005).

Caso ocorra uma limitação de energia, os AA serão desaminado e seu esqueleto de carbono usado para síntese de ácidos graxos cadeia curta, sendo acetato, butirato e propionato encontrados em maiores proporções (Bach et al., 2005; Huws et al., 2018). Aproximadamente 50% do nitrogênio presente no rúmen é oriundo do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) (Schwab e Broderick, 2017), segundo, Preston, (1986), a quantidade mínima necessária de $N-NH_3$ para o que crescimento microbiano ruminal não seja limitado é de 5 mg/dL.

Diferentes sistemas enzimáticos podem ser utilizados na assimilação da amônia, sendo que a predominância de determinado sistema depende da concentração no meio e do acúmulo intracelular. O sistema enzimático de maior afinidade é a glutamina e ou glutamato sintetase

(GS-GOGAT) (White, 2000). A amônia é primeiramente incorporada na glutamina, usando glutamato como substrato, hidrolisando ATP. O NH_2 é então transferido ao α -oxaloglutarato formando duas moléculas de glutamato (Wallace et al., 1997). Se a concentração de amônia é baixa, a eficiência do crescimento microbiano é reduzida, porque o ATP é desviado do crescimento para o processo de captação de compostos nitrogenados pela GS-GOGAT.

Erflle et al. (1977) verificaram atividade de GS-GOGAT em condições de baixas concentrações de amônia, mas a atividade desta enzima não foi significativa em concentrações elevadas. Quando se têm alta concentração de amônia, a principal via de assimilação de nitrogênio é a glutamato-desidrogenase (GDH) (White, 2000). Os sistemas de assimilação de menor afinidade presente nos microrganismos ruminais incluem glutamato desidrogenase-NADP (GDH-NADP), GDH-NAD e alanina desidrogenase (Wallace et al., 1997). Contudo, a GDH-NAD é o principal sistema enzimático envolvido na assimilação de amônia em proteína microbiana no rúmen (Chalupa et al., 1969). A utilização da amônia ruminal é controlada não somente pelas enzimas que ligam a amônia ao carbono, mas também por outros fatores como a disponibilidade de energia e cofatores, nível de substrato e permeabilidade da membrana bacteriana (Chalupa et al., 1969).

O excesso de NH_3 no ambiente ruminal é tóxico para alguns microrganismos, portanto ocorre a difusão passiva do ambiente ruminal para fora deste ambiente quando está presente na forma de amônio (NH_4^+), sendo transportado pela via transporte de K^+ ou por alguns transportadores de proteína presentes no epitélio ruminal regulado por gradientes químicos e elétricos (Abdoun et al., 2006). A toxicidade de amônia na corrente sanguínea inibe o ciclo do ácido cítrico (TCA), causa acidose láctica e age no metabolismo energia cerebral pela bomba de sódio/potássio (Schwab, 2005). Na corrente sanguínea a NH_3 é transportada para o fígado onde é convertida em ureia (Parker et al., 1995). A ureia formada pode seguir duas rotas: a excreção na urina e/ou leite, ou retornar para o ambiente ruminal via saliva ou transepitelial (Russel et al., 1992; Schwab e Broderick, 2017).

Os ruminantes são classificados como animais de produção com baixa eficiência de utilização de nitrogênio (EUN), isso ocorre devido as transformações do alimento no ambiente animal que pode variar de 28,51% a 56,3% (Alves et al., 2020; Camargo et al., 2022). Essa baixa EUN influencia no perfil de AA disponíveis no duodeno (Batista et al 2016; de Souza et al., 2020). Portanto, estudos associando a microbiota ruminal com EUN, com o intuito de elucidar

o metabolismo de N nos ruminantes, são realizados para auxiliar o nutricionista a elaborar dietas que proporcione melhor uso do nutriente fornecido.

Wang et al. (2018), em um estudo *in vitro* avaliaram a suplementação de ureia e reportaram reduções na abundância relativa de bactérias celulolíticas *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Butyrivibrio fibrosolvens*, a redução dessas bactérias foi atribuída a falta de esqueletos de carbonos para o crescimento desses gêneros. Porém, bactérias ruminais, especialmente as celulolíticas, incluindo *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, e *Fibrobacter succinogenes*, sintetizam enzimas (como glutamato desidrogenase e glutamina sintetase) e podem incorporar amônia e esqueletos de carbono e sintetizar seu próprio aminoácido para crescimento bacteriano (Antonopoulos et al., 2003; Ataşoğlu et al., 1999).

No entanto, segundo Kim et al (2014) bactérias da espécie *Ruminococcus albus* são capazes de crescer com amônia, ureia e peptídeos como fontes de nitrogênio, mas os seus genes do metabolismo do nitrogênio e as atividades enzimáticas são regulados pela fonte de nitrogênio e o nível de amônia no meio de crescimento. Segundo Russell et al. (1985), bactérias que degradam carboidratos não fibrosos usam 66% de peptídeos para síntese de proteína microbiana, enquanto bactérias fibrolíticas usam essencialmente N-NH₃. No entanto, *Streptococcus bovis*, que utilizam amido, tem uma taxa de crescimento de 0.9/h com NH₃ e de 1,6/h quando aminoácidos e peptídeos foram fornecidos.

Um estudo caracterizou a composição de aminoácidos que compõe a proteína metabolizável no duodeno de bovinos, diferenciando as bactérias associadas ao fluido (BAF) ou bactérias associadas as partículas (BAP), demonstrou que maiores concentrações de alanina, glicina e treonina em BAF, enquanto as concentrações de arginina, leucina, fenilalanina e prolina foram maiores em BAP (Sok et al., 2017). Schwab e Broderick, (2017), afirmaram a importância de entender melhor o efeito da composição da dieta sobre a contribuição de AA de origem microbiana para o desenvolvimento de modelos que abordem essas mudanças no suprimento de AA para o animal, e consequentemente aumente eficiência do uso de nitrogênio (EUN).

Em estudos relacionando os microrganismos com EUN, Wang et al., (2019), observaram menor abundância relativa de *Succiniclasticum* no grupo de animais com maior EUN, indicando que promover degradação da fibra não necessariamente resulta em EUN no hospedeiro. Por outro lado, Alves et al. (2020), avaliaram a diversidade bacteriana ruminal

associada a retenção de N, em novilhos Nelore, e concluíram que a abundância relativa de bactérias como *Prevotella*, *Hespellia*, *Lactonifactor*, *Lachnospiraceae_other* e *Anaerobiospirillum* estava positivamente correlacionada com a excreção urinária de N, enquanto observaram correlações negativas com *Elusimicrobia*, *Victivallis* e *Treponema*, comprovando que a comunidade bacteriana do rúmen esta significativamente ligada ao uso N no hospedeiro.

Diante do exposto pode-se afirmar que não somente a fonte proteica dietética, mas a diversidade microbiana ruminal podem influenciar na EUN e na utilização do AA que chega ao duodeno pelo hospedeiro. Assim, a hipótese deste estudo é que a suplementação com PNDR favorece grupos de bactérias fibrolíticas, proteolíticas, utilizadoras de amônia no rúmen os quais afetam a eficiência de utilização da proteína de forma diferente em pasto durante a estação de chuvosa e seca. A exploração da relação pode melhorar a eficiência de síntese microbiana, o fluxo, digestibilidade e do perfil de aminoácidos que chegam ao intestino para absorção, consequentemente aumentando a eficiência de utilização do nitrogênio a pasto em período das águas e seca.

2. OBJETIVO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes proteicas (sal mineral, farelo de soja, farelo de soja protegido e glúten de milho) sobre o consumo de matéria seca e nutrientes, parâmetros ruminais, fluxo e digestibilidade de AA, diversidade microbiana ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos Nelore mantidos a pasto durante periodo de águas e seca.

3. REFERÊNCIAS

- Abdoun, K., Stumpff, F., & Martens, H. (2006). Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Animal Health Research Reviews**, 7(1-2), 43-59.
- Alves, K. L. G. C., Granja-Salcedo, Y. T., Messana, J. D., de Souza, V. C., Ganga, M. J. G., Colovate, P. H. D., Kishi, L. T., Berchielli, T. T. (2021). Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle. **Anaerobe**, 67, 102316.
- Antonopoulos, D. A., Aminov, R. I., Duncan, P. A., White, B. A., & Mackie, R. I. (2003). Characterization of the gene encoding glutamate dehydrogenase (gdhA) from the ruminal bacterium *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Archives of microbiology**, 179(3), 184-190.

Atasoglu, C., Valdés, C., Newbold, C. J., Wallace, R. J. (1999). Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and de novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen. **British Journal of Nutrition**, 81(4), 307-314.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. (2005) Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal. Dairy Science**. 88, p. E9-E21.

Batista E.D., Detmann E, Titgemeyer E.C., Valadares Filho S.C., Valadares, R.F.D., Prates, L.L., Paulino, M. F. (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, C. B. P., Azevedo, A. C., Gomes, D. I., Batista, E. D., Rufino, L. M. A., Detmann, E., Mantovani, H. C. (2016). Effect of protein supplementation on ruminal parameters and microbial community fingerprint of Nellore steers fed tropical forages. **Animal**, 10(1), 44-54.

Chalupa, W.; Clark, J.; Opliger P.; Lavker R. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. **Journal of Nutrition**, v.100, p.161-169, 1969.

Camargo, K. D. V., Messana, J. D., Silva, L. G., Granja-Salcedo, Y. T., Dias, A. V. L., Alves, K. L. G. C., Gonçalves, P. H., Reis, R. A., Berchielli, T. T. (2022). Intake, metabolism parameters, and performance of growing beef cattle on pasture supplemented with different rumen undegradable protein with different amino acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, 286, 115258.

Costa, V. A. C., Detmann, E., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. D. C., Carvalho, I. P. C. D., Monteiro, L. P. (2011). Consumo e digestibilidade em bovinos em pastejo durante o período das águas sob suplementação com fontes de compostos nitrogenados e de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 1788-1798.

de Souza, V. C., Messana, J. D., Batista, E. D., Alves, K. L. G. C., Dias, A. V. L., Campos, L. M., Lima, L. O., Granja-Salcedo, Y. T., Faria, L. R., Carvalho, G. M., Pires, A. V., Berchielli, T. T. (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**, 269, 114642.

Detmann, E., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. D. C., Sampaio, C. B., de Souza, M. A., Lazzarini, I., Detmann, K. S. (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**, 126(1-3), 136-146.

Dias, A. V. L. (2021). **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**. Dissertação em Mestre em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Erfle, J.D.; Sauer, F.D.; Mahadevan, S. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.1064-1071, 1977.

Figueiras, J. F., Detmann, E., Paulino, M. F., Valente, T. N. P., Valadares Filho, S. D. C., Lazzarini, I. (2010). Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 1303-1312.

Gleason, C. B., White, R. R. (2019). Beef species-ruminant nutrition cactus beef symposium: A role for beef cattle in sustainable US food production. **Journal of Animal Science**, 97(9), 4010-4020.

Hart, E. H., Christofides, S. R., Davies, T. E., Rees Stevens, P., Creevey, C. J., Müller, C. T., Rogers, H. J. Kingston-Smith, A. H. (2022). Forage grass growth under future climate change scenarios affects fermentation and ruminant efficiency. **Scientific reports**, 12(1), 1-14.

Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche A., Guan, L.L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold C.J., Roehe, R., Dewhurst, R. J., Snelling, T. J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A. H., Scollan, N. D., Prado, R.M., Pilau, E. J., Mantovani, H. C., Attwood, G. T., Edwards, J. E., McEwan, N. R., Morrisson, S., Mayorga, O. L., Elliott, C., Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Frontiers in microbiology**, 9, 2161.

Jin, D., Zhao, S., Wang, P., Zheng, N., Bu, D., Beckers, Y., & Wang, J. (2016). Insights into abundant rumen ureolytic bacterial community using rumen simulation system. **Frontiers in microbiology**, 7, 1006.

Kim, J. N., Henriksen, E. D., Cann, I. K., Mackie, R. I. (2014). Nitrogen utilization and metabolism in *Ruminococcus albus* 8. **Applied and environmental microbiology**, 80(10), 3095-3102.

Kozloski, G.V (2011) **Bioquímica dos ruminantes**. Editora Universidade Federal de Santa Maria, 3ª edição. Santa Maria, pp. 124-125.

Krysl, L. J., Hess, B. W. (1993). Influence of supplementation on behavior of grazing cattle. **Journal of Animal Science**, 71(9), 2546-2555.

Li, C., Li, J. Q., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. (2012). Forage proportion and particle length affects the supply of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, 95(5), 2685-2696.

Marques, R. D. S., Cooke, R. F. (2021). Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. **Animals**, 11(10), 2871.

Martins, G. (2021). Diagnóstico sobre sistemas de dados agrícolas do Brasil para um sistema nacional de avaliação de danos e perdas por desastres na agricultura. Brasília, **FAO**. <https://doi.org/10.4060/cb6527pt>.

Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD (2018) The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. **Gut microbes**, p1-18.

Parker, D. S., Lomax, M. A., Seal, C. J., Wilton, J. C. (1995). Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society**, 54(2), 549-563.

Paulino, M.F., Detmann, E., Valente, E.E.L., Barros, L.V., (2008). Nutrição de bovinos em pastejo. In: **Proceedings of the 4th Symposium on Strategic Management of Pasture**, Viçosa, MG, Brazil. p.131–169.

Pfau, F., Hummel, J. (2019). Microbial protein formation of different carbohydrates in vitro. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 103(6), 1739-1746.

Poppi, D. P., McLennan, S. R. (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of animal science**, 73(1), 278-290.

Reis, R. A., Valente, A. L., Dos Santos, S., De Souza, F. H., Berchielli, T. T., Ruggieri, A. C., Santana, S. S., Serra, J. M. (2013). Performance of Young Nellore Bulls Grazing Marandu Grass Pasture at Different Heights. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**, v.1, p.114-115.

Reis, R.A., Oliveira, A.A., Siqueira, G.R., Gatto, E., (2015). Semiconfinamento para produção intensiva de bovinos de corte. In: **Proceedings of Simposio ´ Mato-grossense de Bovino de Corte**, Cuiaba, ´MT, Brazil. p. 248–293.

Ribeiro, M. D.; Pereira, J. C.; Vieira, R. A. M.; Pacheco, B. M.; Leonel, F. P. Consumo e desempenho de novilhas em pastagem recebendo suplementos com diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2486-2495, 2005 (supl.).

Roth, M. T. P., Resende, F. D., Oliveira, I. M., Fernandes, R. M., Custódio, L., Siqueira, G. R. (2017). Does supplementation during previous phase influence performance during the growing and finishing phase in Nellore cattle? **Livestock Science**, 204, 122-128.

Russell, J. B., O'connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of animal science**, 70(11), 3551-3561.

Russell, R. R. B., Coleman, D., Dougan, G. (1985). Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. **Microbiology**, 131(2), 295-299.

Schwab, C. G., Broderick, G. A. (2017). A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 100(12), 10094-10112.

Shibao, J., Bastos, D.H.M. (2011) Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, 24(6), 895-904.

Sinclair, K.D, Garnsworthy P.C, Mann G.E, Sinclair L.A. (2014). Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Animal**, 8(02), 262-274.

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

Tamminga, S. (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of dairy science**, 75(1), 345-357.

Van Soest, P. J. (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell university press.

Van Soest, P. V., Robertson, J. B., Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, 74(10), 3583-3597.

Wallace, R.J.; Ondera, R.; Cotta, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) The rumen microbial ecosystem. 2 ed. London: Chapman Hall, 1997. p.283-328.

Walker, N. D.; Newbold, C. J.; Wallace, R. J. (2005) Nitrogen metabolism in the rumen. In: **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle**. CABI Publisshing, Wallingford, UK.

Wang M, Chen S, Han Y, Chen L, Wang D (2019). Responses of soil aggregates and bacterial communities to soil-Pb immobilization induced by biofertilizer. **Chemosphere**, 220, 828-836.

Wang, C., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Pei, C. X., Zhang, S. L., Yang, W. Z. (2018). Effects of dietary protein levels and 2-methylbutyrate on ruminal fermentation, nutrient degradability, bacterial populations and urinary purine derivatives in Simmental steers. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102(3), 611-619.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2ed. New York: Oxord University Press, 2000. 565p

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**, 270, 114684.

Zhao, Y. L., Yan, S. M., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. (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**, 103(5), 4355-4366.

CAPÍTULO 2 – DIVERSIDADE MICROBIANA RUMINAL, PARÂMETROS SANGUÍNEOS E RUMINAIS, FLUXO E DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM BOVINOS DE CORTE A PASTO SUPLEMENTADOS COM FONTES DE PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN NA ESTAÇÃO CHUVOSA.

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com fonte de proteína não degradável no rúmen sobre parâmetros sanguíneos e ruminiais, diversidade microbiana ruminal e fluxo e digestibilidade de aminoácidos (AA) em bovinos Nelore em sistema de pastejo no período das águas. Foram utilizados seis novilhos, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em delineamento *cross over* recebendo um dos três suplementos: 1) suplementação com sal mineral (SM) *ad libitum*; 2) suplementação com 0,3% PC de farelo de soja protegido (FSP) e 3) suplementação com 0,3% PC de glúten de milho (GM) durante três períodos experimentais. O consumo de AA totais, aminoácidos essenciais (AAE) e aminoácidos não essenciais (AANE) foi 30% maior nos animais suplementados com FSP e GM quando comparado ao SM ($P < 0,05$). A suplementação com GM aumentou o consumo de AA individuais em comparação com SM (exceto arginina, lisina e glicina). O consumo de lisina tendeu ser superior no FSP quando comparado ao GM ($P = 0,086$). Animais suplementados com GM e FSP tenderam a apresentar fluxo de AA individuais similares ($P \geq 0,01$) e ambas as fontes resultaram em maior de fluxo de Met, Phe, Val, Ala, Cis, Glu, Ser e Tir quando comparada a SM ($P \leq 0,01$). No entanto, animais suplementados com FSP tenderam a apresentar maior fluxo de Arg, His, Ile, Lis, Thre, Gli, quando comparado ao SM. Enquanto, os animais suplementados com GM tenderam a apresentar maior fluxo Leu e Pro. A suplementação com fontes de PNDR (GM e FSP) resultou em maior fluxo de AA totais, AAE e AANE de origem microbiana quando comparada a SM. A proteína total plasmática foi superior em animais suplementados com FSP quando comparada aos SM ($P = 0,049$), a ureia teve maior concentração plasmática com GM em comparação com SM ($P = 0,038$). A concentração plasmática de Arg foi superior nos animais suplementados com FSP em relação com GM ou SM ($P < 0,10$). Entre os filos encontrados, o filo SR1_(Absconditabacteria) estiveram presentes, em média de 6,69%, somente nos tratamentos SM e FSP. O filo Gracilbacteria foi identificado quando os animais foram suplementados com FSP com representatividade em abundância relativa em 7,10%. A suplementação com FSP tendeu a maior abundância relativa de *Methanobrevibacter* quando comparado ao SM e GM ($P = 0,062$). A suplementação com FSP e GM apresentaram maior abundância relativa para os seguintes gêneros *Bacteroidales_RF16_group* ($P = 0,064$), *Anaerovorax* ($P = 0,029$), *Lachnospiraceae [Eubacterium]_ruminantium_group* ($P = 0,34$), *Ruminococcaceae_UCG-005* ($P = 0,016$), *Ruminococcus_2* ($P = 0,034$), *Prevotella_1* ($P = 0,100$), *Prevotellaceae_UCG-001*, *Prevotellaceae_UCG-003* ($P = 0,10$), *Fibrobacter* ($P = 0,075$) *Spirochaeta_2* ($P = 0,053$), *Marinilabiaceae* ($P = 0,033$), *Christensenellaceae* ($P = 0,064$). A suplementação com SM teve maior abundância relativa dos gêneros *Succinivibrionaceae* ($P = 0,053$) e *Lachnospiraceae [Eubacterium]_ruminantium_group Ambiguous_taxa* ($P = 0,060$). A suplementação com fontes de PNDR proporcionou maior diversidade microbiana associada ao consumo de AA individuais, tais achados refletiram em maior aporte de proteína metabolizável que chega ao duodeno pelo fluxo de AA totais, AAE e AANE.

PALAVRAS-CHAVE: arginina, lisina, farelo de soja protegido, glúten de milho, *Ruminococcaeae*, *Fibrobacter*, *Prevotellaceae*

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o sistema de produção dos ruminantes é em sua maior parte a pasto, (Martins, 2021) o qual no período chuvoso apresenta boa disponibilidade proteica (9 a 13%) e os valores de fibra em detergente neutro variam de 61 a 65% (da Silva-Marques et al., 2018; Ferrari et al., 2021; Simioni et al., 2022) sendo potencialmente mais disponível a fermentação microbiana ruminal (Detmann et al., 2010; Detmann et al., 2014). No entanto, nesse período a suplementação com 0,3% do peso corporal (PC) pode fornecer aos animais ganhos adicionais médios de 200 g/animal/dia (Poppi e McLennan, 1995, Paulino et al., 2008, Camargo et al., 2022), pois melhora o uso de carboidratos e compostos nitrogenados que chegam ao rúmen (Reis et al., 2015), proporcionando um maior uso dos mesmos pelos microrganismos ruminais (Huws et al., 2018), além de fornecer um aporte adicional de AA advindo da proteína não degradada no rúmen (PNDR) (Camargo et al., 2022).

O requerimento nutricional de proteína de bovinos é suprido pela proteína microbiana (Pmic), podendo esta corresponder a 59% do fluxo total de nitrogênio para o duodeno (Clark et al., 1992), e pela PNDR, em novilhos de alta produção, a qual representa um importante contribuinte para AA metabolizável (Batista et al., 2016; de Souza et al., 2020). No entanto, mudanças na disponibilidade ruminal de proteína e energia para o crescimento microbiano influenciam a diversidade microbiana influenciando a eficiência alimentar e eficiência de retenção de nitrogênio (Myer et al., 2015; Wang et al., 2019; Alves et al., 2020).

Os estudos sobre a diversidade microbiana relataram que os microrganismos do ambiente ruminal tem preferências pelo uso de amônia (NH₃), peptídeos ou AA específicos para síntese proteica, sendo a disponibilidade destes relacionada a maior ou menor eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) (Russel et al., 1983; Hackmann e Firkins, 2015; Wang et al., 2018). Bactérias celulolíticas, como *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Butyrivibrio fibrosolvens*, sintetizam enzimas e podem incorporar NH₃ e esqueletos de carbono para sintetizar seu próprio AA para crescimento bacteriano (Antonopoulos et al., 2003; Ataşoğlu et al., 1999).

Segundo Russell et al. (1985), os microrganismos que utilizam carboidratos não fibrosos podem utilizar até 66% de peptídeos para síntese de Pmic. *Streptococcus bovis*, tem uma taxa de crescimento de 0,9/h com NH₃ e de 1,6/h quando AA e peptídeos são fornecidos na dieta (Russell et al., 1993). Assim, pode se considerar que AA e peptídeos potencializam a síntese

de Pmic e a EUN. De acordo com Kozloski (2011), quando AA pré-formados são limitantes existe uma queda na taxa de crescimento, e o balanço das taxas de anabolismo e catabolismos resultam em um aumento no gasto de energia pelo animal. Estudos indicam que AA de cadeia ramificada (Leu e Ileu) e aromática (Phe e Tyr) são utilizados em maior extensão que outros AA advindos da *síntese de novo* (Atasoglu et al. 1999).

Estudos com ruminantes indicaram que a alta proporção de forragem na dieta pode reduzir o fluxo de AA totais que chega no intestino delgado, afetando os AA individuais que sofrerão ação das enzimas e que estarão disponíveis para absorção neste compartimento (Li et al., 2012, Zhao et al., 2020). Em contraste, o aumento do teor de proteína da dieta resulta em maior fluxo de AA totais no intestino delgado. Além disso, a utilização de AA individuais (arginina, histidina, metionina, ácido glutâmico e glicina) pode proporcionar maior retenção de proteína a composição corporal, influenciando na produção de carne pelo animal (Mariz et al., 2018). Por isso, nutricionistas de ruminantes principalmente em sistema de pastejo, devem explorar a forrageira fornecida e com o auxílio da suplementação, proporcionar um produto de alta qualidade ao consumidor.

Assim, este estudo tem como hipótese que a suplementação com fontes de PNDR em animais a pasto no período das águas pode favorecer grupos de bactérias fibrolíticas e proteolíticas, utilizadoras de amônia no rúmen, modulando o ecossistema ruminal e aumentando o fluxo e digestibilidade de AA que chegam ao duodeno. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com diferentes fontes de PNDR sobre a diversidade microbiana ruminal, o fluxo e a digestibilidade duodenal de bovinos Nelore mantidos em pasto no período das de águas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal, Brasil (Protocolo número 16688/16).

O experimento foi conduzido no período chuvoso (janeiro-abril), em área de pastagem formada por *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, pertencente ao Departamento de Zootecnia da

FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal. Foram utilizados 6 piquetes de 1,8 ha cada, com bebedouro automático e cocho coberto para suplementação.

Nessa região o clima é classificado como tropical, com verão chuvoso e inverno seco (Sistema internacional Köppen, AW). Durante o período experimental a média de precipitação mensal foi de 160,9 mm, com temperatura máxima mensal foi de 31,8 °C e de temperatura mínima mensal de 20,1 °C (Tabela 1).

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

Mês	Precipitação (mm)	ND	Tmáx (°C)	Tmín (°C)	UR (%)
Janeiro	148,1	11	32,7	20,9	69,2
Fevereiro	282,6	17	30,9	20,4	77,5
Março	115,2	12	31	20,1	76,6
Abril	97,6	6	30,6	19,0	73,4
Médias	160,9	11,5	31,3	20,1	74,2

Tmáx: temperatura máxima; Tmín: temperatura mínima; UR: umidade relativa do ar; ND: número de dias com chuva. Dados obtidos na Estação Agroclimatológica – Unesp campus de Jaboticabal-SP

2.1. Animais, delineamento experimental e dietas.

Foram utilizados seis novilhos Nelore, com peso corporal (PC) inicial médio 320 ± 78 kg, canulados no rúmen (cânula silicone- 10 cm diâmetro interno, Kehl®, São Carlos, Brasil) e no duodeno (cânula tipo T, Kehl®, São Carlos, Brasil). Inicialmente, os animais foram pesados, submetidos ao controle de endo e ecto parasitas e distribuídos em delineamento *cross over*, recebendo um dos três suplementos experimentais: 1) Animais em pastagem recebendo apenas sal mineral (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) *ad libitum*; 2) Animais em pastejo e suplementados com 0,3% PC de farelo de soja protegido (FSP) como fonte de PNDR; e 3) Animais em pastejo suplementados com 0,3% PC de glúten de milho (GM) como fonte de PNDR (Tabela 2).

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

Item (g/kg MS)	Forragem	FSP	GM
Matéria seca	240,00	874,00	911,00
Matéria orgânica	918,00	929,00	977,00

Proteína bruta	123,00	480,00	625,00
Fração A, %PB	16,25	-	-
Fração B1, %PB	8,44	-	-
Fração B2, %PB	39,07	-	-
Fração B3, %PB	24,37	-	-
Fração C, % PB	11,87	-	-
Extrato etéreo	22,70	21,00	11,00
Fibra em Detergente Neutro (FDNcp)*	613,00	261,00	109,00
Fibra em Detergente Ácido	318,00	83,00	19,00
Carboidratos não fibrosos	169,00	173,00	239,00
Energia Bruta Mcal/kg MS	4,08	4,46	4,40
FDNpd**, % FDN total	71,32	89,72	77,60
<i>Aminoácidos essenciais (%MS)</i>			
Arginina	0,73	4,10	2,17
Histidina	0,20	1,36	1,38
Isoleucina	0,46	2,52	2,75
Leucina	0,87	4,21	1,11
Lisina	0,56	3,00	1,13
Metionina	0,15	0,70	1,35
Fenilalanina	0,57	2,84	4,13
Treonina	0,47	2,20	2,28
Valina	0,63	2,58	3,01
<i>Aminoácidos não essenciais (%MS)</i>			
Alanina	0,71	2,59	5,97
Ácido Aspártico	1,17	6,62	4,37
Cistina	0,09	0,86	0,93
Ácido Glutâmico	1,14	9,93	15,03
Glicina	0,54	2,34	1,70
Prolina	0,67	2,86	6,19
Serina	0,50	2,98	3,71
Tirosina	0,36	1,98	3,41

Forragem= *Urochloa brizanyha* cv.Xaraés obtidas medias da técnica de pastejo simulado efetuada nos períodos experimentais; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido; GM= Suplementação proteica com glúten de milho 60.*FDNcp = Fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína, **FDNpd= Fibra em detergente neutro potencialmente digestível (Lima et al.,2012).As frações proteicas dos alimentos foram calculadas conforme

O experimento foi composto por três períodos experimentais de 28 dias cada (13 dias para adaptação às dietas experimentais e instalações, 7 dias para estabilização de excreção fecal de marcador externo e 8 dias para coleta de amostras). O fornecimento do suplemento ocorreu diariamente às 9h00.

Antes do início do estudo, foram realizadas amostragem do solo em cinco pontos por piquete, à 20 cm de profundidade, posteriormente foi realizada a composta por piquete e análises químicas do solo. Os resultados médios obtidos demonstraram as seguintes

características químicas do solo: pH de 5,1 em CaCl_2 ; 22 g/dm³ de matéria orgânica; 11 mg/dm³ fósforo resina; 14, 8, 2 e 25 mmolc/dm³ de cálcio, magnésio, potássio, hidrogênio + alumínio, respectivamente; e 47% de saturação por bases.

Com base nesses resultados foram realizadas 3 adubações (parcelados em janeiro, fevereiro e março) nos meses de experimentos, que totalizaram 90 kg de N/ha, na forma de ureia, 60 kg de K_2O /ha na forma de cloreto de potássio e 60 kg de P_2O_5 /ha na forma de supersimples.

O método de pastejo adotado foi lotação contínua com taxa de lotação variável, utilizando a técnica de “*put and take*” (Moot & Lucas, 1952), utilizando animais *Bos indicus* não castrados como reguladores. A oferta de forragem foi estabelecida por altura 30-35 cm.

2.2. Amostragem do pasto e do suplemento

A massa de forragem foi estimada no 28º dia de cada período experimental, para isso se mensurou a altura média do dossel, por meio da leitura de 80 pontos em cada piquete, com auxílio de régua graduada. Foram escolhidos cinco pontos com altura média que representem o piquete e toda a forragem delimitada por uma moldura de 0,25 m², a 5 cm de altura foi colhida. As amostras foram pesadas e separadas em: material morto, lâmina foliar e colmo+bainha. Na sequência, as diferentes frações foram secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas.

A oferta de matéria seca (OMS) foi calculada da seguinte forma: $\text{OMS} = \text{kg de matéria seca do piquete} / \text{total do peso vivo (kg) dos animais mantidos no piquete no período (tester e reguladores)}$. A oferta de folha verde (OFV) foi calculada da mesma forma: $\text{OFV} = \text{kg matéria seca de folha verde por piquete} / \text{total do peso vivo dos animais mantidos no piquete}$.

As amostras de suplemento foram coletadas a cada três dias e amostras de forragem foram coletadas no 28º dia de cada período experimental pela técnica do pastejo simulado (Johnson, 1978). Os alimentos foram analisados para obtenção dos 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) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados de acordo com Mertens (2002) e adaptados para Ankom200 Fiber Analyzer, sendo a FDN corrigido para cinza e proteína

posteriormente. O FDN potencialmente digestível (FDNpd) foi calculado referente ao valor do FDN segundo Lima et al., 2012:

$$\text{FDNpd} = [(\text{FDN} - \text{FDNi}) / \text{FDN}] * 100$$

A fração proteína bruta (PB) foi obtida por condutividade térmica utilizando-se o equipamento Leco®, modelo FP-528. A energia bruta (EB) foi obtida utilizando bomba calorimétrica de oxigênio (Calorímetro IKA, modelo C 2000).

2.3. Consumo, fluxo e digestibilidade

O consumo foi avaliado com uso de três indicadores, óxido de cromo (Cr_2O_3), utilizado para determinação da produção fecal; dióxido de titânio (TiO_2), utilizado para estimativa do consumo de suplemento, e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), utilizado como marcador interno para se estimar o consumo de pasto. O Cr_2O_3 e TiO_2 , foram fornecidos a partir do 13º dia de cada período experimental por 10 dias seguidos (7 dias para estabilização da excreção fecal do indicador e 3 dias para coletas de fezes), sendo 8g de Cr_2O_3 /animal imediatamente antes do fornecimento do concentrado e 10g de TiO_2 /animal por dia, misturado no suplemento.

As fezes foram coletadas no dia 20º, 21º e 22º dia de cada período experimental nos horários 7:00, 18:00 e 14:00, respectivamente. As amostras foram secas em estufas de circulação de ar forçado a 55°C por 72 h, metade da amostra foi moída (Wiley mill; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) em peneira de 1 mm, para análise bromatológica e a outra metade em peneira de 2 mm, para determinação da concentração de FDNi. A concentração de Cr_2O_3 foi analisada de acordo com a metodologia proposta por Kozloski et al. (2006) e a quantidade de TiO_2 foi mensurada, segundo metodologia descrita por Titgemeyer et al. (2001).

O consumo de pasto foi estimado com base nos dados de produção fecal utilizando FDNi como marcador interno. O teor de FDNi nas fezes, nas amostras de pasto (obtidas pela técnica de pastejo simulado Johnson, (1978) e nos suplementos foi determinado após incubação *in situ* por 288 horas (Valente et al., 2011) e posterior extração com detergente neutro com a utilização do analisador de fibra Ankom (Ankom Inc., Fairport, NY, EUA).

O fluxo de matéria seca (MS) duodenal foi estimado utilizando a FDNi como indicador (Harvatine e Allen, 2006). Amostras de aproximadamente 400 mL de digesta duodenal foram coletadas dos animais nos dias 22º, 23º e 24º de cada período experimental nos seguintes

horários: primeiro dia 1:00h, segundo dia 7:00h e 22:00h e terceiro dia 2:00h, 10:00 e 19:00h para representar o fluxo de 24 horas. Após serem coletadas as amostras foram divididas em duas alíquotas, onde 50% da amostra duodenal foi seca em estufa de circulação de ar forçado a 55°C por 72h e ao final do processo de secagem se obteve o total de nove amostras por animal representando cada horário de coleta. A segunda alíquota (50%) foi congelada a -15°C para o isolamento bacteriano, sendo também congelados nove amostras por animal referente a cada horário de coleta.

As amostras após secas em estufa foram agrupadas por animal (amostra composta) e por período, as quais foram analisadas para obtenção dos 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). O fluxo de MS duodenal (FMSD) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{FMSD g/d} = [\text{MS fecal} \times (\text{g / kg FDN indigestível na MS fecal})] / (\text{g / kg FDN indigestível em MS duodenal}).$$

A segunda alíquota, de 50% da digesta duodenal foi utilizada para isolamento seguindo a metodologia descrita por Cecava et al., (1990). As amostras compostas de digesta foram filtradas através de um filtro de nylon de 100 µm (44% de área de superfície dos poros; Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Suíça) e o material retido foi lavado com solução salina (800 mL de NaCl 0,9%). Em seguida, os microrganismos foram isolados da amostra filtrada. Após centrifugação (2.000 rpm por 20 min a 5°C), o sobrenadante foi separado e centrifugado (12.340 rpm por 20 min a 5°C). O sobrenadante foi descartado e 100 mL de solução salina a 0,9% foram adicionados ao pellet. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.340 rpm por 20 min a 5 °C) e o pellet resultante foi coletado, congelado (-80 °C), liofilizado por 72 h e usado para análise do perfil AA.

A digestibilidade aparente total (DAT) da matéria seca e dos nutrientes foram estimadas da seguinte forma:

$$\text{DAT (\%)} = (\text{consumo kg} - \text{excreção fecal kg}) / \text{consumido kg} \times 100$$

2.4. Parâmetros ruminais

No 25º e 26º dia de cada período experimental foram realizadas conteúdo ruminal, as quais foram distribuídas em dois dias para representar 24h e aconteceram nos seguintes horários

dia:0h antes da suplementação e 6h,12h,18h após a suplementação no dia 25° e as dia:3h, 9h, 15h e 21h após suplementação no dia 26°. Foram coletados 500 gramas do conteúdo ruminal, na região ventral do rúmen, por meio de cânula. As amostras foram filtradas em panos de algodão, separadas em alíquotas para mensuração do pH, realizada no horário da coleta (DM-106922, Digimed, São Paulo, Brasil), e duas alíquotas de 40 ml cada foram armazenadas a -20°C para posterior determinação de nitrogênio amoniacal ruminal (FENNER, 1965) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por cromatografia gasosa (Leviniti et al., 1990). Foram utilizadas as médias dos horários de coleta na apresentação de ambos resultados.

Para a determinação dos ACGG, o líquido ruminal foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado para posterior análise. A cromatografia foi realizada no GC2014, (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar HP INNOWax 3(0 m, 0,32 mm, 0,50 µm, Agilent Technologies, Colorado, EUA). A taxa de fluxo do gás de arraste (nitrogênio) foi 3,18 mL/min, a temperatura inicial foi de 80 °C e foi programada para aumentar 20°C/min até a temperatura final de 240°C.

2.5. Nitrogênio microbiano e balanço de nitrogênio

As coletas spot de urina foram realizadas no 23°, 24° e 25° dia de cada período experimental, no seguinte horário 7:00; 14:00 e 18:00, respectivamente. Estas amostras foram utilizadas na quantificação dos derivados de purina, N total e creatinina. O volume urinário foi estimado por meio da excreção diária de creatinina (CE), utilizando a equação para novilhos Nelore proposta por Silva et al. (2012):

$$CE \text{ (g/d)} = 0,0345 \times (PC)^{0,9491}$$

Em que CE é a excreção diária de creatinina (g / dia) e PC = peso corporal.

O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl. A excreção de alantoína foi analisada pelo método colorimétrico descrito por Chen e Gomes (1992), e a concentração de ácido úrico foi determinada pelo kit comercial Ácido Úrico Liquiform (nº de cat. 140, LABQTEST, São Paulo, SP, Brasil). As purinas microbianas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas pela excreção de derivados de purinas na urina (Y, mmol/dia), de acordo com a equação:

$$Y = 0,85X + 0,385 PC^{0,75},$$

Em que, 0,85 recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e 0,385 (PV)^{0,75}, a contribuição endógena para a excreção de purinas (VERBIC et al., 1990).

O cálculo de síntese de nitrogênio microbiano (Nmic) foi em função das purinas absorvidas (X mmol/dia), pela equação de Chen e Gomes, (1992):

$$Y=70X / 0,83 \times 0,134 \times 1000,$$

Onde, 70 conteúdo de N de purinas (mgN/mmol), 0,134 relação N purina:N total nas bactérias (Valadares et al.,1999) e 0,83 digestibilidade das purinas microbianas. A eficiência de síntese de nitrogênio microbiano foi expressa em g de Nmic / kg de matéria orgânica degradada no rúmen (MODR).

No cálculo de retenção de nitrogênio foram utilizadas as amostras de fezes que foram coletadas e armazenadas conforme descrito no item 2.3. Portanto, a retenção de N foi expressa pela relação:

$$RN= CN - (EFN + EUN), \text{ dado em g/dia.}$$

Em que: RN= retenção de N (g); CN= consumo de N (g); EFN= excreção fecal de N; EUN= excreção urinária de N (g).

2.6. Parâmetros sanguíneos

Durante o 18º dia de cada período experimental foram coletadas amostras de sangue (10mL), às 08:00 e 16:00 h, da jugular de cada animal. As amostras de sangue foram coletada em tubos vacutainer (10 mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) revestidos com heparina (143 UI) e centrifugados (1.000 g por 20 min a 4 °C) O plasma resultante foi coletado e armazenado em seis tubos de 2mL tipo eppendorf por animal (-20 °C) para posterior determinação da concentração de AA. Para a análise de AA, o plasma (200 µL) foi misturado com 50 µL solução de HCl (1 N) contendo ácido alfa-aminobutírico como padrão interno e 250 µL de metanol 99% e analisado segundo Hagen et al., (1993). Outra alíquota das amostras de sangue foi coletada em tubo contendo gel separador e acelerador de coagulação e centrifugadas a 4.000 rpm a 4º C durante 20 minutos para separação do soro (Matsuzaki et al., 1997), o qual foi acondicionado a -15º C para posterior análises de proteína total, albumina e ureia. A ureia foi estimada por espectrofotometria colorimétrica utilizando analisador Labtest (modelo Labmax 100).

2.7. Determinação da composição de aminoácidos nas amostras

O perfil de AA's foi determinado nas amostras de alimentos (pasto e suplemento), digesta duodenal, nas fezes e sangue para os cálculos de fluxo e digestibilidade intestinal referente a porção do duodeno.

A composição de AA das amostras de alimentos, do pellet de duodeno total (DNR), pellet de duodeno microbiano, fezes e sangue foram determinados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) conforme metodologia descrita por de Souza et al., 2020.

2.8. Comunidade bacteriana ruminal

As coletas para diversidade bacteriana do ambiente ruminal foram realizadas no 25º dia de cada período experimental, via cânula ruminal. Coletou-se aproximadamente 50g de digesta, fração sólida + fração líquida da região ventral, antes da alimentação matinal dos animais (Saro et al., 2012). Esse material foi imediatamente transportado para o laboratório em caixas de isopor com gelo.

No laboratório adicionou-se 50 mL de solução de PBS (pH 7,4) a 4°C, em seguida, homogeneizou-se a amostra mediante a agitação manual por três minutos. Após esse procedimento o material foi filtrado em pano estéril com porosidade de 100 micras. O filtrado foi processado de acordo com Ribeiro Júnior et al., (2015) e Granja-Salcedo et al., (2017) para formação de um pellet bacteriano. 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 foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e fluorimetria (Qubit® 3.0, kit Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit, Life Technologies). A pureza do DNA metagenômico extraído foi avaliado por espectrofotometria a partir das relações A260nm/A280nm e A260nm/A230nm. Finalmente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com 1µL de SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

A identificação e quantificação da diversidade bacteriana ruminal realizou-se por meio do sequenciamento da região V4/V5 do gene 16S rRNA bacteriano. A amplificação da região

hipervariável 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') utilizando-se 20 ng de DNA total de cada amostra, e 1,25 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para reação de PCR [1x]; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e H₂O para um volume final de 20 µl. A PCR foi conduzida nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 53,8°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas em duplicata e reunidas equimolarmente para minimizar o viés durante a reação.

A pureza dos produtos da PCR, foi verificada em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos era estimado por comparação com marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Em seguida, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery, seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na facility do departamento de tecnologia da FCAV/UNESP no Illumina® Miseq.

Os dados obtidos do sequenciamento foram processados por meio do QIIME software package (Caporaso et al., 2010). Para a leitura foram selecionadas reads acima de 250 pb e com média > 25 na qualidade Phred e assim foram agrupados em OTUs (operational taxonomic units) com mais de 99% de semelhança das sequências. Esses dados foram utilizados para análise rarefação e apresentando em gráficos o número de OTUs agrupado a 99% de semelhança em relação ao número de leituras para os diferentes níveis taxonômicos. Além desses dados se calculou também estimadores de riqueza e os índices de alpha e beta diversidade.

2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com ajuda do Software R (versão 4.1.1). Inicialmente foram verificados para distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (Teste de Bartlett) dos dados.

Os dados de consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, fluxo e concentração sanguínea foram analisados considerando um delineamento *cross over*. A ANOVA considerou o efeito fixo de tratamento (suplementos) e períodos, e o efeito aleatório de animais, a interação

animal $\times$ período e os resíduos correspondentes ao modelo. Teste de Tukey foi utilizado para a comparação de medias quando a ANOVA foi significativa.

Os dados de riqueza, diversidade e abundância microbiana ruminal foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns.

Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos para todos os testes e quando os valores de $P > 0,5$ e $\leq 0,10$ considerou-se tendência nos testes aplicados.

3. RESULTADOS

3.1. Consumo, fluxo e digestibilidade

Não houve interação ($P > 0,50$) entre tratamento e período para as características quantitativas de altura e taxa de lotação no pasto avaliado (Tabela 3). Foi observado efeito de período para todas as variáveis (Tabela 3, $P < 0,01$). Porém, os tratamentos não alteraram as variáveis qualitativas e quantitativas do dossel ($P > 0,10$).

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

	Suplemento			EPM	T	<i>P-valor</i>	
	SM	FSP	GM			P	T $\times$ P
Massa de forragem, kg/MS ha	5862	5309	5256	314,39	0,38	<0,01	0,69
Massa de folha verde, kg/MS ha	1610	1663	1769	99,47	0,54	<0,01	0,86
OMS, kg MS/kg PC	4,01	3,39	3,33	0,26	0,21	<0,01	0,69
OFV, kg MS/kg PC	1,11	1,06	1,14	0,09	0,84	<0,01	0,73
Altura, cm	38,41	35,89	36,9	2,89	0,81	<0,01	0,81
Folha verde, % MS	27,54	32,8	34,88	3,18	0,31	<0,01	0,99
Colmo, %MS	39,76	35,64	36,79	1,96	0,23	<0,01	0,50
Material morto, % MS	32,68	31,55	28,32	3,08	0,60	<0,01	0,80
Taxa de lotação, UA/há	3,63	3,73	3,87	0,29	0,31	<0,01	0,76

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido (0,3%PC) GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 (0,3%PC); OMS= Oferta de matéria seca; OFV = Oferta de folha verde na matéria seca; UA = Unidade animal. EPM = Erro padrão da média.

O consumo de suplemento Kg MS/dia foi maior nos animais que receberam FSP e GM ($P = 0,010$) em comparação a suplementação com SM. Animais suplementados com SM tenderam expressaram em média um consumo de MS (kg/dia) 32,20% inferior ao FSP e GM (Tabela 4). Já o consumo de MS, % PC, consumo de FDN, Kg/dia e o consumo de forragem, Kg MS/dia, não apresentaram diferença entre a suplementação mineral ou proteica (Tabela 4).

Ao avaliar o consumo de PB, a suplementação com SM resultou em consumo médio 55,79% inferior em relação a suplementação com FSP e GM. O consumo de PDR e PNDR, Kg/dia, para FSP foi superior ao SM, porém o GM não diferiu de nenhum dos tratamentos (Tabela 4).

O consumo de AA totais, AAE e AANE foi 30% maior em animais suplementados FSP e GM quando comparado ao SM ($P \leq 0,05$) (Tabela 4). O consumo de AA individuais foi maior com FSP e GM ($P \leq 0,05$) em comparação com SM, para AA como arginina, lisina e glicina a suplementação com FSP foi maior em comparação SM, enquanto a suplementação com GM foi equidistante não diferindo as outras formas de suplementação (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo de nutrientes e aminoácidos em novilhos Nelore mantidos a pasto *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante período das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

	Suplemento			EPM	P-valor
	SM	FSP	GM		
Consumo de suplemento, kg MS/dia	0,10 ^b	1,05 ^a	0,89 ^a	0,129	0,010
Consumo de forragem, kg MS/dia	4,48	6,58	6,19	0,452	0,436
Consumo MS, % PC	1,75	1,86	1,68	0,149	0,280
<i>Consumo, Kg/dia</i>					
Matéria seca	4,98 ^b	7,63 ^a	7,08 ^a	0,473	0,096
Fibra em detergente neutro	3,02	3,95	3,59	0,242	0,381
Proteína bruta	0,59 ^b	1,36 ^a	1,31 ^a	0,099	0,016
Proteína degradada no rúmen*	1,58 ^b	2,72 ^a	2,45 ^{ab}	0,160	0,070
Proteína não degradada no rúmen*	2,64 ^b	4,40 ^a	3,88 ^{ab}	0,264	0,052
<i>Consumo de aminoácidos (AA), Kg/dia</i>					
AA totais	0,41 ^b	1,24 ^a	1,17 ^a	90,310	0,024
AAE	0,19 ^b	0,58 ^a	0,52 ^a	41,582	0,034
AANE	0,22 ^b	0,66 ^a	0,65 ^a	49,106	0,018
<i>Consumo de AA essenciais (AAE), g/dia</i>					
Arginina	31,21 ^b	93,15 ^a	60,98 ^{ab}	7,239	0,025
Histidina	8,20 ^b	27,49 ^a	23,24 ^a	2,009	0,020
Isoleucina	18,97 ^b	58,84 ^a	80,22 ^a	4,228	0,025
Leucina	31,99 ^b	111,8 ^a	142,37 ^a	10,282	0,009
Lisina	24,38 ^b	69,27 ^a	42,35 ^{ab}	5,421	0,019
Metionina	5,78 ^b	18,53 ^a	19,66 ^a	1,516	0,059
Fenilalanina	23,44 ^b	70,31 ^a	68,68 ^a	5,176	0,028
Treonina	19,86 ^b	55,70 ^a	47,02 ^a	3,994	0,023
Valina	26,88 ^b	70,87 ^a	62,32 ^a	4,938	0,036

<i>Consumo de AA não essenciais (AANE),g/dia</i>					
Alanina	28,27 ^b	81,32 ^a	91,64 ^a	6,317	0,023
Ácido Aspártico	56,57 ^b	138,13 ^a	105,50 ^a	9,511	0,019
Cistina	3,49 ^b	14,25 ^a	12,92 ^a	1,130	0,021
Ácido Glutâmico	41,96 ^b	183,02 ^a	192,98 ^a	15,292	0,010
Glicina	23,61 ^b	62,34 ^a	46,85 ^{ab}	4,390	0,037
Prolina	29,08 ^b	72,96 ^a	94,79 ^a	6,597	0,013
Serina	21,14 ^b	65,46 ^a	60,91 ^a	4,746	0,025
Tirosina	14,01 ^b	46,85 ^a	50,01 ^a	3,744	0,019

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido(0,3%PC); GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60(0,3%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey. * A proteína degradável no rúmen e a proteína não degradável no rúmen foram estimadas a partir de frações de proteína e taxas de degradação de cada fração usando uma taxa de passagem de 0,05/h.

O fluxo de MS, kg/dia, foi em média 61,13% superior na suplementação com FSP e GM em comparação SM (Tabela 5). Os fluxos de AA totais, AAE e AANE (g/dia) tenderam serem maiores ao suplementar os animais com as fontes de PNDR em comparação com SM ($P \leq 0,10$). A suplementação com fontes de PNDR foram 71,99% superior ($P \leq 0,05$) em comparação com SM para o fluxo de de AAtotaismic, AAEmic e AANEmic (Tabela 5).

A suplementação com FSP e GM tenderam a proporcionar um fluxo de AA individuais maior em comparação com SM ($P \leq 0,10$), porém o fluxo de isoleucina, metionina, treonina e taurina não apresentaram diferença significativa entre a suplementação mineral e proteica (Tabela 5). O fluxo de ácido glutâmico foi maior quando os animais recebiam suplementação com FSP e GM em comparação SM ($P=0,049$), já o fluxo de leucina apresentou significância para GM ($P=0,045$) em comparação com o SM sendo o FSP intermediário aos demais (Tabela 5).

Tabela 5. Fluxo duodenal de aminoácidos em novilhos Nelore mantidos em forragens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

	Suplemento			EPM	<i>P-valor</i>
	SM	FSP	GM		
<i>Fluxo MS, kg/dia</i>	2,36 ^b	4,17 ^a	3,54 ^a	0,217	0,034
<i>Fluxo de aminoácidos (AA), g/dia</i>					
AA totais	267,87 ^b	876,08 ^a	995,96 ^a	81,136	0,083

AAE	130,55 ^b	413,21 ^a	403,42 ^a	34,196	0,096
AANE	135,65 ^b	467,84 ^a	556,26 ^a	46,428	0,074
<i>Fluxo de AA essenciais (AAE), g/dia</i>					
Arginina	15,32 ^b	47,13 ^a	42,78 ^a	3,489	0,087
Histidina	5,64 ^b	19,10 ^a	19,39 ^a	1,610	0,099
Isoleucina	16,11	45,99	45,75	3,523	0,117
Leucina	13,93 ^b	73,42 ^{ab}	111,06 ^a	10,751	0,045
Lisina	23,77 ^b	56,67 ^a	41,58 ^{ab}	3,591	0,064
Metionina	6,41	18,20	19,83	1,626	0,108
Fenilalanina	14,25 ^b	49,45 ^a	57,37 ^a	4,790	0,083
Treonina	7,42	44,00	43,11	3,212	0,135
Valina	17,70 ^b	50,34 ^a	49,46 ^a	3,806	0,098
<i>Fluxo de AA não essenciais (AANE), g/dia</i>					
Alanina	19,55 ^b	59,55 ^a	79,77 ^a	6,614	0,054
Ácido Aspártico	31,55 ^b	90,02 ^a	79,00 ^a	6,461	0,067
Cistina	3,57 ^b	13,46 ^a	14,54 ^a	1,264	0,078
Ácido Glutâmico	22,11 ^b	123,07 ^a	171,12 ^a	15,941	0,049
Glicina	23,06 ^b	50,14 ^a	41,24 ^{ab}	3,114	0,0830
Prolina	7,71 ^b	42,52 ^{ab}	68,07 ^a	6,491	0,088
Serina	13,13 ^b	44,79 ^a	52,13 ^a	4,286	0,079
Tirosina	11,66 ^b	28,06 ^a	45,22 ^a	3,768	0,078
Taurina	3,11	6,73	5,69	0,759	0,124
<i>Fluxo de AA microbianos (AA mic), g/dia</i>					
AAmic total	88,46 ^b	129,25 ^a	116,51 ^a	10,367	0,002
AAEmic	42,34 ^b	61,16 ^a	54,66 ^a	4,832	0,005
AANEmic	46,12 ^b	68,09 ^a	61,84 ^a	5,43	<0,001

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido(0,3%PC); GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60(0,3%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Os diferentes tipos de suplementação não afetaram a digestibilidade aparente total da MS, PB e FDN ($P \geq 0,10$, Tabela 6). Da mesma forma, a digestibilidade aparente intestinal de

AA totais, AAE, AANE e todos os AA individuais não foram influenciados pelo tipo de suplemento fornecido aos animais ($P \geq 0,10$, Tabela 6).

Tabela 6. Digestibilidade aparente de nutrientes e aminoácidos em novilhos Nelore mantidos em forragens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P- valor
	SM	FSP	GM		
Digestibilidade aparente total %					
Matéria seca	55,40	60,04	59,15	1,136	0,130
Proteína bruta	56,30	61,79	67,43	1,872	0,296
Fibra em detergente neutro	58,29	56,41	59,84	1,803	0,473
Digestibilidade intestinal de aminoácidos (AA),100 /dia					
AA totais	517,59	660,63	530,54	36,780	0,828
AAE	497,04	652,33	503,41	36,642	0,775
AANE	528,82	665,55	545,07	35,927	0,846
Digestibilidade intestinal de AA essenciais (AAE),100 g/dia					
Arginina	575,88	688,62	604,14	28,250	0,750
Histidina	502,60	633,60	537,81	35,589	0,818
Isoleucina	488,32	605,16	461,67	41,177	0,794
Leucina	477,04	510,84	560,80	42,289	0,746
Lisina	693,58	679,77	612,44	20,989	0,492
Metionina	521,26	754,48	475,39	31,990	0,519
Fenilalanina	509,79	594,33	538,18	36,784	0,980
Treonina	542,81	594,83	521,85	32,820	0,969
Valina	451,26	622,80	456,29	43,287	0,732
Digestibilidade intestinal de AA não essenciais (AANE),100 g/dia					
Ácido Aspártico	682,36	722,05	539,55	31,508	0,494
Cistina	507,78	722,04	509,12	39,711	0,782
Ácido Glutâmico	494,14	373,14	545,82	44,831	0,710
Glicina	543,88	595,77	506,44	32,130	0,776
Prolina	389,91	628,90	551,48	44,686	0,895
Serina	494,45	639,98	554,67	35,465	0,949
Tirosina	559,43	652,23	652,32	32,061	0,938

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido(0,3%PC); GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60(0,3%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

3.2. Parâmetros ruminais, balanço de nitrogênio e parâmetros sanguíneos

Os diferentes suplementos testados não afetaram pH ruminal, N-NH₃, proporção molar de acetato(A), propionato(P), isobutirato, butirato, isovalerato, relação A:P, proteína microbiana (Pmic) e eficiência de síntese de PB (EPBmic, P>0,10, Tabela 7). Entretanto, a proporção molar de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) total tendeu a ser superior em animais suplementados com SM (P=0,105), e o valerato foi superior em animais suplementados com FSP quando comparada a animais suplementados a SM (P<0,05), mas não diferiu de animais que receberam GM, o qual também não diferiu da SM (P>0,10, Tabela 7). O consumo de nitrogênio e o nitrogênio excretado nas fezes foi maior em animais suplementados com FSP e GM, mas não diferiram entre estas fontes. O N retido foi maior em animais suplementados com FSP do que em animais que receberam GM e SM (P<0,05, Tabela 7). O nitrogênio excretado na urina g/dia se tendeu ser maior em animais suplementados com GM em relação ao FSP e SM (P=0,064; Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros ruminais em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv, Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	SM	FSP	GM		
pH	6,77	6,91	6,78	0,047	0,124
N-NH ₃ , mg/dL	18,73	18,48	19,20	1,037	0,397
AGCC, mmol/L	108,38 ^a	101,71 ^b	103,31 ^b	1,998	0,105
Acetato ¹	70,56	69,39	71,00	0,278	0,723
Propionato ¹	16,70	17,12	15,68	0,188	0,467
isoButirato ¹	1,04	1,24	1,15	0,040	0,808
Butirato ¹	9,70	9,92	9,94	0,170	0,998
isoValerato ¹	1,28	1,50	1,47	0,051	0,678
Valerato ¹	0,70 ^b	0,80 ^a	0,74 ^{ab}	0,018	0,025
A:P	4,22	4,08	4,57	0,069	0,512
Pmic, g/dia	57,36	126,56	86,76	11,087	0,814
EPBmic, g Pmic/kg MODR	20,44	31,67	21,73	3,113	0,996
<i>Balanço de nitrogênio (N) g/dia</i>					
N consumido	94,76 ^b	218,52 ^a	210,66 ^a	15,830	0,017
N excretado urina	26,67 ^c	47,06 ^b	63,58 ^a	5,374	0,064
N excretado fezes	36,88 ^b	62,35 ^a	71,55 ^a	0,548	0,017
N retido, % Nconsumido	30,85 ^{ab}	50,22 ^a	27,01 ^b	2,296	0,048

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido(0,3%PC); GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60 (0,3%PC); EPM = Erro padrão da média; ¹= mmol/100mol do

total de AGCC; N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal ruminal; A:P = Relação acetato:propionato; Pmic = Proteína microbiana; EPBmic = Eficiência de síntese de PB microbiana. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

A proteína plasmática total foi superior em animais suplementados com FSP que em animais que receberam SM (P=0,049), mas não diferiu dos animais que foram suplementados com GM (P= 0,317, Tabela 8). A ureia plasmática foi superior em animais suplementados com FSP e GM (P<0,05), mas não diferiu entre as fontes de PNDR (P>0,01). Os diferentes tipos de suplementação não alteraram concentração plasmática de albumina, AAE e AANE (P>0,01). No entanto, animais suplementados com FSP tenderam apresentar maior concentração plasmática de arginina do que animais suplementados com GM ou SM (P<0,01, Tabela 8) e menor concentração de tirosina no plasma quando comparada a SM (P=0,099). As concentrações plasmáticas de leucina, glicina e prolina em animais suplementados com FSP tenderam a ser superiores a concentração observada em animais suplementados com GM (P<0,01), mas similares às concentrações observadas em animais que receberam suplementação com sal mineral (P>0,01, Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros sanguíneos e composição de aminoácidos no plasma sanguíneo de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	SM	FSP	GM		
Proteínas totais, g/dL	6,85 ^b	7,02 ^a	6,92 ^{ab}	0,109	0,041
Albumina, g/dL	2,40	2,46	2,48	0,052	0,321
Uréia, mg/dL	32,25 ^b	55,50 ^{ab}	63,00 ^b	4,072	0,033
<i>Concentração plasmática, µmol/L</i>					
AAE	739,93	923,94	722,63	55,509	0,406
AANE	723,17	815,11	767,98	26,200	0,578
<i>Aminoácidos essenciais (AAE), µmol/L</i>					
Arginina	62,71 ^b	122,65 ^a	64,13 ^b	9,408	0,047
Histidina	34,20 ^a	41,57 ^a	32,80 ^a	2,340	0,238
Isoleucina	74,81 ^a	97,70 ^a	85,87 ^a	4,440	0,895
Leucina	184,15 ^{ab}	214,47 ^a	106,68 ^b	26,129	0,021
Lisina	45,80 ^b	58,33 ^{ab}	470,68 ^a	4,886	0,071
Metionina	12,93 ^b	15,76 ^a	12,08 ^b	0,099	0,047
Fenilalanina	59,69 ^a	58,48 ^b	49,10 ^a	3,022	0,030
Treonina	47,32 ^a	67,27 ^a	60,58 ^a	4,798	0,284
Valina	195,94 ^a	272,05 ^a	217,74 ^a	0,353	0,779
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE), µmol/L</i>					

Alanina	180,20	205,78	219,58	7,773	0,827
Ácido Aspártico	12,75	20,61	16,53	0,938	0,109
Cistina	8,85	8,99	8,73	0,134	0,113
Ácido Glutâmico	101,30	76,47	87,30	4,423	0,486
Glicina	66,19 ^{ab}	170,92 ^a	87,99 ^b	12,662	0,032
Prolina	77,37 ^{ab}	92,57 ^a	68,22 ^b	5,015	0,048
Serina	50,05	58,94	52,89	2,955	0,711
Tirosina	58,25	57,24	47,38	3,688	0,210
Asparagina	2,14	3,96	2,17	0,736	0,535
Glutamina	63,29	78,83	66,90	4,437	0,486
Hidroxiprolina	58,46	51,91	58,93	2,749	0,647
Taurina	7,92 ^b	31,71 ^a	15,16 ^b	3,138	0,032

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido(0,3%PC); GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60(0,3%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

3.3. Comunidade microbiana

O sequenciamento do gene 16S rRNA gerou um total de 2.264.800 sequências (média 34.132,25) com uma confiabilidade de 0,99%. Foram identificados 22 filos com abundância relativa entre as amostras, sendo Unassigned presente em todas as amostras representando em média 32,64% dos filos presentes (Figura 1). Os filos descritos como “Unassigned” foram encontrados nas amostras, porém não estão classificados na taxonomia.

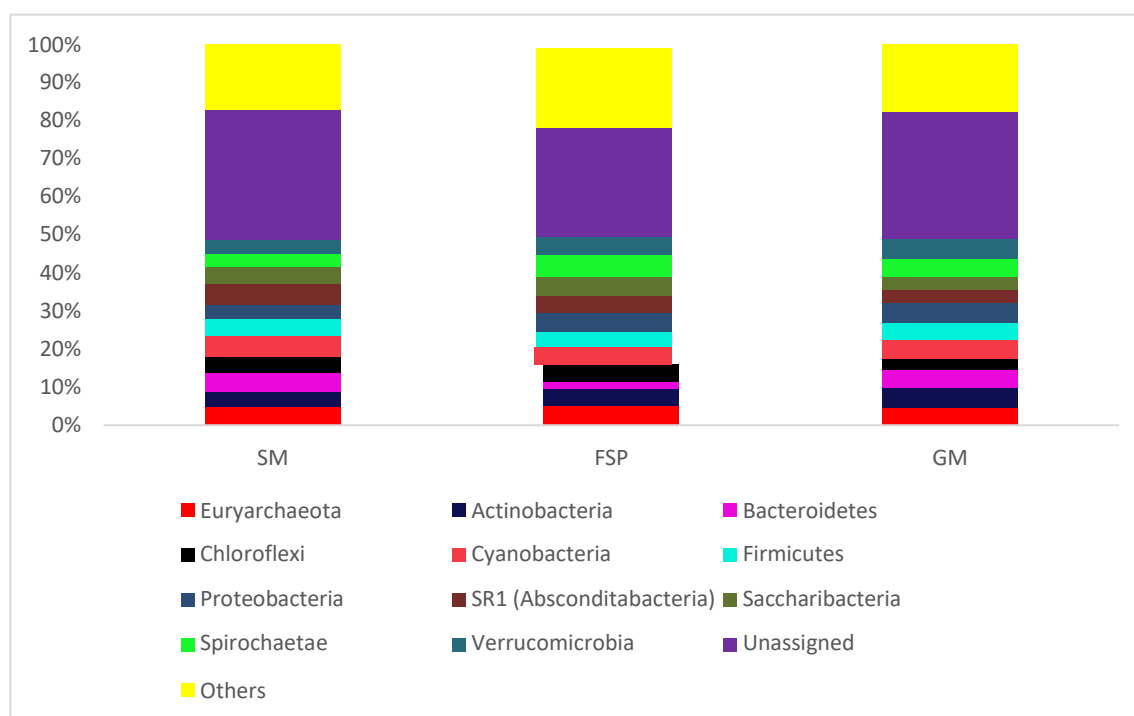


Figura 1 Abundância das unidades operacionais classificadas no nível de filo (%) em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido; GM = Suplementação proteica com glúten de milho 60. Others = somatória dos filos Armatimonadetes, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Fusobacteria, Gracilbacteria, Lentisphaerae, Planctomycetes, Synergistetes, Tenericutes e WA-aaa01f12.

O filo Gracilbacteria só foi identificado quando os animais foram suplementados com FSP com representatividade em abundância relativa em 7,10%. Já o filo WA-aaa01f12 esteve presente somente nas amostras dos animais suplementados com GM em abundância relativa 4,31% (Figura1).

As Archaea foram encontradas em uma abundância relativa entre os tratamentos de 6,70%. ($P = 0,528$). No nível do filo, apenas Euryarchaeota foram identificados, com abundância semelhante entre os grupos (4,70%, $P = 0,853$). Em nível de gênero, Methanosphaera (0,434%), Methanimicrococcus (0,001%) e Thermoplasmatales Incertae Sedis (0,420%) foram identificados sem efeitos dos tratamentos. Entretanto, o FSP permitiu uma maior abundância de Methanobrevibacter ($0,529 \pm 0,429$) quando comparado ao GM ($0,001 \pm 0,000$) e ao SM ($0,001 \pm 0,000$) (Tabela 9). As dietas não influenciaram os índices de riqueza, alfa diversidade, abundância relativa total de bactérias e OTUs sem classificação (OTUs unassigned) (Tabela S1 $P > 0.05$).

Tabela 9. Mediana e rango interquartil (IQR) da abundância relativa das Archaeas ruminais classificadas por filo e gênero de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR

	Suplemento			P-valor
	SM	FSP	GM	
Filo				
Euryarchaeota	4,728±1,759	4,583±0,607	4,802 ±0,414	0,8539
Gênero				
Methanospaera	0,212±0,069	0,248±0,111	0,248±0,073	0,2963
Methanimicrococcus	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,9862
Thermoplasmatales_Incertae_Sedis	0,221±0,468	0,268±0,305	0,104±0,214	0,7998
Methanobrevibacter	0,001±0,000 ^b	0,529±0,429 ^a	0,001±0,000 ^b	0,0621

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60. Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.

No total foram identificados 113 famílias e 234 gêneros de bactérias sendo 33 com diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$, Tabela 10). Os microrganismos pertencentes à família Bacteroidales_RF16_group foram maiores no tratamento FSP ($1,454 \pm 0,834$ $P = 0,064$) em comparação os demais tratamentos.

Os animais ao serem suplementados com as diferentes fontes proteicas apresentaram aumento na abundância ($P = 0,064$) no nível de família: Family_XIII FSP ($1,050 \pm 0,312$) e GM ($1,029 \pm 0,377$) e no gêneros ($P = 0,029$) Anaerovorax FSP ($0,517 \pm 0,166$) e GM ($0,473 \pm 0,111$) pertencente a mesma família (Tabela 10).

As bactérias da família Lachnospiraceae do gênero [Eubacterium]_ruminantium_group de espécies distintas tiveram maior abundância relativa em animais que receberam GM quando comparado ao SM. Já a espécie ($P = 0,060$) *Ambiguous_taxa* apresentou maior abundância relativa no tratamento SM ($0,366 \pm 0,090$) em comparação com os outros tratamentos. Mas a espécie ($P = 0,034$) *Uncultured_rumen_bacterium* foi maior em abundância relativa no tratamento FSP ($0,421 \pm 1,097$) (Tabela 10).

Na família Ruminococcaceae [Eubacterium]_coprostanoligenes_group, a maior abundância relativa foi observada no tratamento FSP quando comparado ao SM. As bactérias do gênero Ruminococcaceae_UCG-005 espécie ($P = 0,016$), *Uncultured_bacterium*, apresentou abundância relativa somente no tratamento GM ($0,704 \pm 0,813$). Já o gênero ($P = 0,034$) Ruminococcus_2 esteve presente em todos os tratamentos, porém com maior

abundância relativa quando os animais foram suplementados com GM ($0,446 \pm 0,403$) (Tabela 10).

O ambiente ruminal apresentou uma abundância relativa maior para os microrganismos pertencentes à família (0,078) Desulfuromonadaceae quando os animais foram suplementados com o tratamento FSP ($1,221 \pm 0,797$).

A família Prevotellaceae apresentou abundância relativa para três gêneros Prevotella_1, Prevotellaceae_UCG-001 e Prevotellaceae_UCG-003, porém essa abundância relativa foi diferente entre os suplementos fornecidos (Tabela 7). Prevotella_1 obteve maior abundância relativa ao receber suplementação FSP em comparação com GM ($P=0,100$), já os microrganismos Prevotellaceae_UCG-001 e Prevotellaceae_UCG-003 apresentou maior abundância relativa nos animais que foram suplementados com FSP em comparação SM (Tabela 10). O gênero Fibrobacter apresentou maior abundância relativa para SM ($0,299 \pm 0,084$ $P=0,075$) em comparação com a suplementação com GM (Tabela 10).

Os microrganismos da família Succinivibrionaceae apresentaram maior abundância relativa para animais suplementados com SM ($1,331 \pm 0,860$ $P=0,053$) em comparação com FSP (Tabela 10). Já o gênero Spirochaeta_2 teve maior abundância relativa ao serem suplementados com FSP ($1,331 \pm 0,860$ $P=0,053$) em comparação com SM (Tabela 10).

A família Marinilabiacea do gênero Uncultured espécie Ambiguous taxa, esteve em maior abundância relativa quando os animais foram suplementados com GM em comparação ao FSP ($P=0,033$ Tabela 10). Os microrganismos da família Christensenellaceae apresentaram uma tendência de maior abundância relativa na suplementação com FSP em comparação com SM ($P=0,064$ Tabela 10).

Tabela 10. Mediana e rango interquartil (IQR) da abundância relativa bacteriana ruminal de novilhos Nelore em recría a pasto suplementados com diferentes fontes de proteína na dieta.

Família	Gênero	Espécie	Suplemento			P-valor
			SM	GM	FSP	
Bacteroidales_RF16_group			0,487±0,257 ^b	0,691±0,595 ^b	1,454±0,834 ^a	0,064
Marinilabiaceae	Uncultured	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,000±0,154 ^{ab}	0,640±0,639 ^a	0,000±0,000 ^b	0,033
Prevotellaceae	Prevotella_1	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,205±0,081 ^{ab}	0,206±0,130 ^b	0,312±0,137 ^a	0,100
Prevotellaceae	Prevotellaceae_UCG-001	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,346±0,102 ^a	0,280±0,320 ^{ab}	0,151±0,102 ^b	0,100
Prevotellaceae	Prevotellaceae_UCG-003	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,050±0,071 ^b	0,103±0,266 ^{ab}	0,369±0,269 ^a	0,091
Fibrobacteraceae	Fibrobacter		0,299±0,084 ^a	0,120±0,191 ^b	0,229±0,144 ^{ab}	0,075
Christensenellaceae			0,785±0,229 ^b	1,248±0,611 ^{ab}	1,076±0,391 ^a	0,079
Family_XIII			0,719±0,194 ^b	1029±0,377 ^a	1,050±0,312 ^a	0,064
Family_XIII	Anaerovorax		0,340±0,112 ^b	0,473±0,111 ^a	0,517±0,166 ^a	0,029
Family_XIII	Family_XIII_AD3011_group		0,325±0,053 ^b	0,399±0,139 ^{ab}	0,554±0,126 ^a	0,064
Family_XIII	Family_XIII_UCG-002		0,247±0,253 ^b	0,291±0,500 ^{ab}	0,492±0,221 ^a	0,100
Lachnospiraceae	[Eubacterium]_ruminantium_group		0,000±0,000 ^b	0,564±0,483 ^a	0,000±0,606 ^{ab}	0,089
Lachnospiraceae	[Eubacterium]_ruminantium_group	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,366±0,090 ^a	0,010±0,300 ^b	0,083±0,198 ^b	0,060
Lachnospiraceae	[Eubacterium]_ruminantium_group	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,000±0,000 ^b	0,000±0,000 ^b	0,421±1,097 ^a	0,034
Lachnospiraceae	Coproccoccus	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,227±0,351 ^a	0,000±0,376 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,089
Lachnospiraceae	Lachnoclostridium_10	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,000±0,000 ^b	0,244±0,608 ^a	0,000±0,000 ^{ab}	0,090
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_AC2044_group	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,000±0,000 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,431±0,878 ^a	0,090
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK3A20_group		0,250±0,094 ^{ab}	0,136±0,082 ^b	0,454±0,127 ^a	0,019
Lachnospiraceae	Oribacterium		0,082±0,377 ^b	0,781±0,791 ^a	0,569±0,279 ^{ab}	0,085
Lachnospiraceae	Roseburia		0,383±0,202 ^a	0,052±0,130 ^b	0,042±0,471 ^{ab}	0,050
Lachnospiraceae	Uncultured		0,000±0,440 ^{ab}	0,445±0,894 ^a	0,000±0,000 ^b	0,068

Ruminococcaceae	[Eubacterium]_coprostanoligenes_group		0,308±0,053 ^b	0497±0,186 ^{ab}	0,487±0,270 ^a	0,090
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_NK4A214_group		0,255±0,057 ^{ab}	0,214±0,099 ^b	0,312±0,123 ^a	0,035
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_NK4A214_group	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,399±0,481 ^a	0,103±0,537 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,075
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-005	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,000±0,000 ^b	0,704±0,813 ^a	0,000±0,000 ^b	0,016
Ruminococcaceae	Ruminococcus_1	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,000±0,842 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,293±0,478 ^a	0,100
Ruminococcaceae	Ruminococcus_2		0,114±0,367 ^b	0,446±0,403 ^a	0,000±0,185 ^b	0,034
Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichaceae_UCG-004		0,000±0,000 ^b	0,440±0,259 ^a	0,113±0,557 ^{ab}	0,044
Desulfuromonadaceae			0,656±0,935 ^b	0,541±0,899 ^b	1,221±0,797 ^a	0,078
Desulfuromonadaceae	Desulfuromonas		0,312±0,444 ^{ab}	0,200±0,446 ^b	0,586±0,454 ^a	0,100
Succinivibrionaceae			1,331±0,860 ^a	0,858±0,709 ^{ab}	0,074±0,632 ^b	0,053
Succinivibrionaceae	Succinivibrionaceae_UCG-002		0,255±0,383 ^a	0,182±0,148 ^{ab}	0,037±0,121 ^b	0,100
Spirochaetaceae	Spirochaeta_2		0,000±0,000 ^b	0,000±0,732 ^{ab}	0,644±0,458 ^a	0,041

SM= sal mineral ad libitum, GM= glúten de milho; FSP= farelo de soja protegido. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.

4. DISCUSSÃO

A hipótese proposta foi aceita parcialmente já que a digestibilidade aparente intestinal AA não foi modificada ao fornecer a suplementação com PNDR. As diferentes fontes de PNDR influenciaram o fluxo de AA total, AAE e AANE que chegaram ao intestino delgado, proporcionando maior aporte de alguns AA individuais como metionina, fenilalanina, valina, cistina, alanina, serina e tirosina. O FSP e GM proporcionaram maior abundância relativa dos microrganismos da família Family_XII e do gênero *Anaerovorax*, demonstrando que esses alimentos ricos em ácido glutâmico proporcionam o γ -aminobutirato que é utilizado como substrato para desenvolvimento desse microrganismo (Ueki et al., 2018).

O consumo de lisina foi 35,20% superior no FSP quando comparado ao SM fato que se deve ao maior consumo de suplemento com maior teor deste AA. Souza et al., (2020), analisou diferentes fontes e níveis de proteína na dieta de novilhos confinados e reportam diferença na composição entre o farelo de soja sem proteção, glúten de milho e resíduo de destilaria de milho (DDG), onde o farelo de soja apresentou maior concentração de lisina em comparação aos demais alimentos.

Os fluxos duodenais de AA totais, AAE e AANE foram maiores nos animais que receberam suplementação com PNDR. Isto também foi observado por outros autores que reportaram valores superiores para fluxos de AA totais (Mariz et al., 2018) com o aumento (100, 120 ou 140 g/kg de MS) da PB na dieta. O fluxo de AA individuais metionina, fenilalanina, valina, alanina, cistina, serina e tirosina foram maiores quando os animais receberam as fontes de PNDR. Por isso, pode-se concluir que a suplementação de animais em pastejo é necessária, pois, possibilita uma melhora no fluxo desses AA no trato gastrointestinal e pode, consequentemente incrementar o ganho de peso dos animais. Como observado por Camargo et al, (2022), animais suplementados com 0,3%PC de PNDR apresentaram um aumento no ganho de peso de 0,200 g/dia comparados a animais que não receberam suplementação.

O fluxo microbiano de AA totais, AAE e AANE aumentou com o uso das fontes de PNDR avaliadas neste estudo, no entanto, a contribuição deste para o total de AA metabolizável que chega ao duodeno foi menor nos tratamentos que receberam suplementação com o tratamento SM. Sabe-se que AA de origem microbiana podem corresponder em média a 59 a 61,4% do total de AA disponível no duodeno (Clark et al., 1992, de Souza et al., 2020).

Podemos inferir que a SM possa contribuir com maior quantidade de AA mic chegando ao duodeno

Ao analisarmos os nossos resultados comparando a fonte de FSP em relação ao SM, o fluxo de arginina foi maior em FSP, porém não houve diferença nos fluxos desse AA entre as fontes de PNDR. Além disso, a concentração plasmática da arginina foi maior em animais suplementados com FSP comparado com animais suplementados GM ou SM. Acreditamos que a diferença de concentração plasmática arginina entre as fontes de PNDR, possa estar relacionada com a maior concentração plasmática de prolina na suplementação com FSP em comparação com GM. Uma vez que a arginina pode ser sintetizada a partir de L-glutamina, L-glutamato e L-prolina através da formação de L-citrulina (Cit) nos enterócitos de ruminantes (Wu et al, 2021). O fluxo de leucina foi maior em animais suplementados com GM em comparação com SM. Tal fato ocorre, pois, esse ingrediente apresenta maior concentração desse AA (de Souza et al., 2020; Gargallo et al.,2022). Maior concentração de valerato foi observada em animais suplementados com FSP em comparação com os demais tratamentos (SM e GM). Acreditamos que a desaminação de AA no ambiente ruminal foi maior para esses animais, pois, segundo Gargallo et al., (2022), os ácidos graxos valerato, 2-metilbutirato e isobutirato, são resultantes da desaminação dos AA de cadeia ramificada como leucina, isoleucina e valina.

O filo *Saccharibacteria* esteve em maior abundância relativa no tratamento FSP do que em GM e representou 5,74% do total de filos identificados. Acreditamos que este filo tem preferência pelo uso de AA para seu crescimento, uma vez que os resultados demonstram que a suplementação com GM forneceu menores quantidades de AA totais degradados no ambiente ruminal comparado com FSP.

Aumento na abundância relativa do gênero *Methanobrevibacter*, pode ser devido a interação entre rotas metabólicas de fixação de nitrogênio, a associação com vírus que degradam lignina (Ngo et al.,2022), e a genes envolvidos na formação de AA como glicina ou metabolismo do açúcar. Em recente estudo tais rotas foram apontadas como influenciadoras na produção de metano (Martinez-Álvaro et al., 2020). Em nosso estudo suplementação com FSP apresentou maiores concentrações plasmáticas de glicina e maior abundância relativa do gênero *Methanobrevibacter* comparação SM e GM. Sugerindo assim que essas metanogênicas podem estar relacionadas com AA. A suplementação com FSP tendeu maior retenção de N (g/dia) em relação a SM e GM, em estudo com condições similares ao nosso, Camargo et al., (2022),

encontrou maior ganho de peso médio diário em novilhos suplementados com FSP atribuído a retenção N.

A abundância relativa da Desulfuromonadaceae foi maior em animais suplementados com FSP, fato que pode estar relacionado ao maior consumo de lisina neste tratamento. Em estudo com digestibilidade *in vitro* avaliando-se a atividade da suplementação com lisina, os autores concluíram que o fornecimento desse AA gerou um aumento de alguns microrganismos ruminais entre eles os da família Desulfuromonadaceae (Kim et al., 2021). Maior abundância relativa da família Bacteroidales RF16 foi observada na suplementação com FSP. Há poucos estudos sobre essa família. Liu et al., (2019), correlacionaram negativamente a abundância relativa de Bacteroidales RF16 com as concentrações de isobutirato e isovalerato no rúmen. Porém em nosso estudo tais ácidos graxos de cadeia curta não foram diferentes entre os tratamentos, nos levando acreditar que abundância relativa dessa família possa estar relacionada com outras rotas metabólicas, já que os mecanismos do metabolismo desses microrganismos são desconhecidos.

O gênero *Eubacterium _ruminantium_group* da espécie *Ambiguos_taxa* pertencente à família Lachnospiraceae esteve em maior abundância relativa em animais que suplementados com SM. Em um estudo Stevenson (1979), evidenciou que este gênero apresenta elevado crescimento quando amônia está disponível na dieta. Fato que pode ser confirmado com os resultados do nosso estudo. Devido à tendência nos resultados de amônia. Adicionalmente, autores observaram que *Eubacterium ruminantium*, é uma bactéria fermentadora de hemicelulose sendo classificada como bactéria fibrolítica. O aumento na abundância relativa desta bactéria em tratamentos com maior concentração de fibra mais digestível está relacionado à degradação de celulose e hemicelulose, bem como ao metabolismo do nitrogênio, causando assim a melhora na degradação da fibra e no perfil de fermentação ruminal (Xu et al., 2022). Bactérias do mesmo gênero *Eubacterium _ruminantium_group*, porém da espécie *Uncultured_rumen_bacterium* foram encontradas em maior abundância relativa em animais suplementados com FSP em comparação com os demais tratamentos. Tal resultado pode indicar que essa espécie é influenciada pelo consumo de lisina que foi maior na suplementação FSP.

Os gêneros *Ruminococcus_2* e *Ruminococcus_UCG005* pertencem as bactérias fibrolíticas, sua maior abundância relativa foi observada nos animais suplementados com GM, os microrganismos desse gênero sintetizam enzimas como glutamato desidrogenase e glutamina sintetase e incorporam a amônia e esqueleto de carbono para síntese de seu próprio

AA (Antonopoulos et al., 2003; Ataşoğlu et al., 1999). Esses resultados sugerem que estes gêneros podem estar relacionados com a síntese de alguns AA individuais como His, Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Cis, Gli, Pro. Maior consumo de tais AA foi observado em animais suplementados com GM em comparação SM, e entre as fontes PNDR, o consumo de lisina foi maior para FSP em comparação GM, porém mais estudos precisam ser realizados para elucidar o uso de AA por esses microrganismos.

Em estudos com diversidade ruminal o gênero *Prevotella* é geralmente relatado como um membro central ($\geq 90\%$ das amostras) da microbiota ruminal (Holman e Gzyel, 2019) e apresentam características metabólicas diversas. Alguns grupos de *Prevotella* respondem positivamente à suplementação de nitrogênio (Martinez-Fernandez et al., 2020), facilitando sua capacidade de degradação dos nutrientes no ambiente ruminal (Granja-Salcedo, 2019; Alves et al., 2020; Xue et al., 2020). Além disso, esses microrganismos também desempenham papéis importantes no metabolismo de carboidratos (Gardner et al. 1995; Kabel et al., 2011). Os gêneros *Prevotella_UCG003* e *Prevotella_1* apresentaram maior abundância relativa na suplementação com FSP comparado com SM e GM. Acreditamos que o consumo de lisina influencie abundância desse microrganismo visto que o consumo deste AA foi maior na suplementação FSP.

A suplementação com SM proporcionou maior abundância relativa da família *Succinivibrionaceae* em comparação com FSP. Acreditamos que tal resultado pode estar relacionado com a competição por hidrogênio livre no ambiente ruminal, pois, estudos demonstraram uma correlação negativa da *Succinivibrionaceae* com a produção de metano (Qiu et al., 2022). Aliado a isso, animais suplementados com SM tenderam a ter uma maior produção de propionato ruminal. Essa resposta vem de acordo com nossos resultados que apresentaram maior abundância relativa de *Methanobrevibacter* na suplementação com FSP em comparação aos outros suplementos.

O gênero *Fibrobacter* esteve em maior abundância relativa em animais suplementados com SM em comparação GM. Isso pode estar relacionado com o consumo de metionina que foi menor SM em comparação a GM. Estudos avaliando a suplementação de metionina protegida antes e após o parto de vacas leiteiras, relataram que a suplementação diminuiu a abundância relativa da *F. succinogenes* (Abdelmegeid et al., 2018).

Em estudo avaliando a EUN com a diversidade ruminal a família Spirochaetaceae, foi identificada e correlacionada positivamente com animais com alta EUN e correlação

negativamente com excreção urinária de nitrogênio (Alves et al., 2020). Em nosso estudo o gênero *Spirochaetae_2* apresentou maior abundância relativa ao fornecermos suplementação com FSP em comparação com SM, evidenciando a relação entre a suplementação e retenção uma vez que animais suplementados com FSP apresentaram uma maior retenção de nitrogênio em relação aos demais tratamentos.

Entre as fontes de PNDR avaliadas no presente estudos, a família *Marinilabiaceae* do gênero *Uncultured* espécie *Ambiguous*, esteve em maior abundância relativa na suplementação com GM em comparação a FSP. Estudos com ambiente anaeróbio relataram que essa família esteve em maior abundância relativa na fase sólida e associaram com capacidade na digestão anaeróbia de celulose e/ou hemicelulose, ao analisar a degradação destes componentes em biodigestores (Tian et al., 2017). Em nosso estudo diferença entre o consumo de lisina entre as suplementações PNDR foi observada, onde a suplementação com GM forneceu 26,92g a menos desse AA, acreditamos que essa família não seja dependente da lisina. A família *Christensenellaceae* apresentou em maior abundância relativa na suplementação com FSP comparado com SM. Estudos com humanos demonstram uma maior proporção de microrganismos dessa família no intestino humano e os associaram a menor taxa de alanina transaminase (Li et al., 2020). Em estudo com ruminantes essa família foi associada com animais com alta eficiência alimentar (Couch et al., 2020).

A suplementação com FSP resultou em maior concentração plasmática de glicina comparado com os demais tratamentos. Isso pode ser devido ao processo de proteção do farelo de soja, que impediu a degradação ruminal deste AA resultando em maior aporte do mesmo no duodeno, compartimento onde os AA são absorvidos e transportados para corrente sanguínea. Apesar da glicina não ser um AA essencial sua limitação pode resultar em um crescimento microbiano abaixo do ideal (Li e Wu, 2018). Em nosso estudo as concentrações de proteína plasmática totais foram maiores no FSP, fato que está relacionado com o aumento na concentração plasmática dos AA individuais arginina, prolina e glicina.

A concentração plasmática de ureia foi maior quando o animal foi suplementado GM comparado com SM. Isso se refletiu em uma maior excreção de N na urina, devido ao maior teor de proteína bruta e maior proporção de PNDR na dieta, e possível aumento da filtração renal do N da ureia. Resultados similares foram observados por de Souza et al., 2021. Maiores concentrações plasmáticas de prolina foram observadas em animais suplementados com FSP comparados com GM. Isso pode ser explicado pela maior concentração de arginina que

participa da síntese desse AA (Wu et al.,2016). Além disso, as altas concentrações de arginina ativam N-acetilglutamato sintase para manter o ciclo da ureia hepática em um estado ativo. Esse AA promove a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e glicose em tecidos alvo de insulina, a síntese de proteínas no músculo esquelético e desenvolvimento de tecido adiposo marrom, aumentando assim a massa de tecido magro e reduzindo o tecido adiposo branco (Wu et al.,2016). Desse modo, supõe-se que a suplementação com FSP proporcionou um perfil de AA que proporcionou uma maior retenção de N g/dia observada em nosso estudo.

Atualmente na nutrição de ruminantes existem vários modelos usados para o cálculo de exigência de proteína NRC, NASEM, CNCPS, BR-Corte entre outros. Seus modelos utilizam suposições e cálculos, com características intrínsecas diferentes, ou seja, os dados utilizados para construção desses modelos de equações são específicos da região de origem. Portanto, se faz necessário estudos que visam não só a utilização da proteína bruta pelos animais, mas também a eficiência de uso dos AA para que se obtenha uma nutrição de precisão para ruminantes (Batista et al.2016; Mariz et al.,2018; Souza et al.,2020; Hassan et al.,2021).

Assim, estudos futuros devem incluir em seus modelos de predições da proteína metabolizável variáveis que considerem separadamente AA oriundos da Pmic e AA oriundos da PNDR, bem como a variação de retenção de acordo com perfil de AA diferente dos modelos atuais que levam em consideração que ambos apresentam perfis de AA semelhantes.

5. CONCLUSÃO

O metabolismo de AA em ruminantes é influenciado pela degradação da proteína dietética no ambiente ruminal. A suplementação com fontes de PNDR proporcionou maior diversidade microbiana associada ao consumo de AA individuais, tais achados refletiram em maior aporte de proteína metabolizável chegando no duodeno pelo fluxo de AA totais, AAE e AANE. Suplementação com FSP gerou um aumento na abundância relativa de bactéria do gênero *Spirochaetae_2*, a qual resultou em maior EUN quando comparado a suplementação com GM.

6. REFERENCIAS

Abdelmegeid, M. K., Elolimy, A. A., Zhou, Z., Lopreiato, V., McCann, J. C., & Looor, J. J. (2018). Rumen-protected methionine during the peripartal period in dairy cows and its effects

on abundance of major species of ruminal bacteria. **Journal of animal science and biotechnology**, 9(1), 1-7.

Alves, K. L. G. C., Granja-Salcedo, Y. T., Messana, J. D., de Souza, V. C., Ganga, M. J. G., Colovate, P. H. D., Kishi, L. T., Berchielli, T. T. (2021). Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle. **Anaerobe**, 67, 102316.

AlZahal, O., Li, F., Walker, N. D., & McBride, B. W. (2017). Factors influencing ruminal bacterial community diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast. **Journal of dairy science**, 100(6), 4377-4393.

Antonopoulos, D. A., Aminov, R. I., Duncan, P. A., White, B. A., & Mackie, R. I. (2003). Characterization of the gene encoding glutamate dehydrogenase (gdhA) from the ruminal bacterium *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Archives of microbiology**, 179(3), 184-190.

AOAC. (1995) Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. Association of Official Analytical Methods Inc., Washington, D.C., USA.

Atasoglu, C., Valdés, C., Newbold, C. J., Wallace, R. J. (1999). Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and de novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen. **British Journal of Nutrition**, 81(4), 307-314.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. (2005) Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal. Dairy Science**. 88, p. E9-E21.

Batista E.D., Detmann E, Titgemeyer E.C., Valadares Filho S.C., Valadares, R.F.D., Prates, L.L., Paulino, M. F. (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.

Camargo, K. D. V., Messana, J. D., Silva, L. G., Granja-Salcedo, Y. T., Dias, A. V. L., Alves, K. L. G. C., Gonçalves, P. H., Reis, R. A., Berchielli, T. T. (2022). Intake, metabolism parameters, and performance of growing beef cattle on pasture supplemented with different rumen undegradable protein with different amino acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, 286, 115258.

Cecava, M. J., Merchen, N. R., Gay, L. C., & Berger, L. L. (1990). Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, 73(9), 2480-2488.

Couch, C. E., Arnold, H. K., Crowhurst, R. S., Jolles, A. E., Sharpton, T. J., Witczak, M. F., Beechler, B. R. (2020). Bighorn sheep gut microbiomes associate with genetic and spatial structure across a metapopulation. **Scientific reports**, 10(1), 1-10.

Chen XB e Gomes MJ (1992) **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details**. Rowett Research Institute; International Feed Resources Unit, p21

Clark, J.H., Klusmeyer, T.H., Cameron, M.R., (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **J. Dairy Sci.** 75,

da Silva-Marques, R.P., Zervoudakis, J.T., Hatamoto-Zervoudakis, L.K., da Rosa e Silva, P.I.J.L., do Nascimento Matos, N.B., Feliciano, A.L., de Paula Júnior, R.G., da Silva Cabral, L., (2018) Efficiency of nitrogen metabolism in beef cattle grazing pasture and supplemented with different protein levels in the rainy season. **Trop. Anim. Health Prod.** 50, 715–720

de Souza, V. C., Messana, J. D., Batista, E.D, Alves, K. L G. C., Titgemeyer, E. C., Pires, A V., Ferraz Junior, M. V., Silva, L. G., Negrão, J. A., Costa, V. E., Ganga, M.J. G., Colovate, P.H. D., Berchielli, T. T. (2021). Effects of protein sources and inclusion levels on nitrogen metabolism and urea kinetics of Nellore feedlot steers fed concentrate-based diets. **Journal of animal science**, 99(8), skab185.

de Souza, V. C., Messana, J. D., Batista, E. D., Alves, K. L. G. C., Dias, A. V. L., Campos, L. M., Lima, L. O., Granja-Salcedo, Y. T., Faria, L. R., Carvalho, G. M., Pires, A. V., Berchielli, T. T. (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**, 269, 114642.

Detmann, E., Paulino, M.F., Valadares Filho, S.C. (2010). Optimizing the use of basal forage resources. In: **Proceedings of the 7th International Symposium on Beef Cattle Production**. (Eds S.C.Valadares Filho, M.F. Paulino, P.V.R. Paulino, M.I. Marcondes, A.G. Silva, L.F. Prados, L.V. Barros, M.A. Fonseca, P.D.B. Benedeti) pp. 191–240. (Viçosa: Viçosa, MG, Brazil).

Detmann, E., Valente, E.E.L., ´ Batista, E.D., Huhtanen, P., (2014). An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livest. Sci.** 162, 141–153.

Fenner, H. (1965) Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. *Journal of Dairy Science*, v.48, p. 249–251. for whole-body deposition. **J. Anim. Sci.** 96, 670–683.

Ferrari, A. C., Leite, R. G., Fonseca, N. V., Romanzini, E. P., Cardoso, A. D. S., Barbero, R. P., & Reis, R. A. (2021). Performance, nutrient use, and methanogenesis of Nellore cattle on a continuous grazing system of *Urochloa brizantha* and fed supplement types varying on protein and energy sources. **Livestock Science**, 253, 104716.

Gardner RG, Wells JE, Russell JB, Wilson DB (1995) The cellular location 2589 of *Prevotella ruminicola* beta-1, 4-D-endoglucanase and its occurrence in other strains of 2590 ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 61(9):3288-3292.

Gargallo, S., Ferret, A., Calsamiglia, S. (2022). Ruminal Microbial Degradation of Individual Amino Acids from Heat-Treated Soyabean Meal and Corn Gluten Meal in Continuous Culture. **Animals**, 12(6), 688.

Granja-Salcedo YT, Ramirez-Uscategui RA, Machado EG, Messana JD, Kishi LT, Dias AVL, Berchielli TT (2017). Studies on bacterial community composition are affected by the time and storage method of the rumen content. **PloS one**, v12, p (4), e0176701

Granja-Salcedo, Y. T., Fernandes, R. M., Araujo, R. C. D., Kishi, L. T., Berchielli, T. T., Resende, F. D. D., Berndt, A., Siqueira, G. R. (2019). Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. **Frontiers in Microbiology**, 10, 614.

Hackmann, T. J., & Firkins, J. L. (2015). Electron transport phosphorylation in rumen butyrovibrios: unprecedented ATP yield for glucose fermentation to butyrate. **Frontiers in microbiology**, 6, 622.

Hagen, S.R., Augustin, J., Grings, E., Tassinari, P., 1993. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. **Food Chem.** 46, 319–323.

Harvatine, K.J.; Allen, M.S. (2006) Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 677– 685.

Hassan, F. U., Guo, Y., Li, M., Tang, Z., Peng, L., Liang, X., & Yang, C. (2021). Effect of methionine supplementation on rumen microbiota, fermentation, and amino acid metabolism in vitro cultures containing nitrate. **Microorganisms**, 9(8), 1717.

Henderson, G.; Cox, F.; Kittelmann, S.; Heidarian, M.V.; Zethof, M.; Noel, S.J.; Waghorn, G.C.; Janssen, P.H. (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.

Holman, D. B., Gzyl, K. E. (2019). A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. **FEMS microbiology ecology**, 95(6), fiz072.

Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche A., Guan, L.L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold C.J., Roehe, R., Dewhurst, R. J., Snelling, T. J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A. H., Scollan, N. D., Prado, R.M., Pilau, E. J., Mantovani, H. C., Attwood, G. T., Edwards, J. E., McEwan, N. R., Morrisson, S., Mayorga, O. L., Elliott, C., Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Frontiers in microbiology**, 9, 2161.

Jaffe, A. L., Thomas, A. D., He, C., Keren, R., Valentin-Alvarado, L. E., Munk, P., Bouma-Gregson, K., Farag, I. F., Amano, Y., Sachedeva, R., West, P.T., Banfield, J. F. (2021). Patterns of gene content and co-occurrence constrain the evolutionary path toward animal association in Candidate Phyla Radiation Bacteria. **MBio**, 12(4), e00521-21.

Kabel MA, Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Abbas CA, de Bont JA, Morrison M, Cann IK, Mackie RI (2011) Biochemical characterization and relative expression levels of multiple carbohydrate

esterases of the xylanolytic rumen bacterium *Prevotella ruminicola* 23 grown on an ester-enriched substrate. **Applied and Environmental Microbiology** 77(16):5671-5681.

Kim, H., Park, T., Kwon, I., Seo, J. (2021). Specific inhibition of *Streptococcus bovis* by endolysin LyJH307 supplementation shifts the rumen microbiota and metabolic pathways related to carbohydrate metabolism. **Journal of animal science and biotechnology**, 12(1), 1-15.

Kozloski, G. V., Netto, D. P., Oliveira, L. D., Maixner, A. R., Leite, D. T., Maccari, M., Quadros, F. L. F. D. (2006). Chromium oxide use as a marker for measuring fecal production of grazing cattle: estimative variations due to sampling schedule. **Ciência Rural**, 36, 599-603.

Leventini, M. W., C. W. Hunt, R. E. Roffler, and D. G. Casebolt. (1990). Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:4334–4344

Li P, Wu G. (2018) Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. **Amino Acids**. Jan;50(1):29-38

Li, C., Li, J. Q., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. (2012). Forage proportion and particle length affects the supply of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, 95(5), 2685-2696.

Liu, C., Wu, H., Liu, S., Chai, S., Meng, Q., Zhou, Z. (2019). Dynamic alterations in yak rumen bacteria community and metabolome characteristics in response to feed type. **Frontiers in microbiology**, 10, 1116.

Li, X., Li, Z., He, Y., Li, P., Zhou, H., & Zeng, N. (2020). Regional distribution of Christensenellaceae and its associations with metabolic syndrome based on a population-level analysis. **PeerJ**, 8, e9591.

Mariz, L. D. S., Amaral, P. M., Valadares Filho, S. C., Santos, S. A., Detmann, E., Marcondes, M. I., Faciola, A. P. (2018). Dietary protein reduction on microbial protein, amino acid digestibility, and body retention in beef cattle: 2. Amino acid intestinal absorption and their efficiency for whole-body deposition. **Journal of Animal Science**, 96(2), 670-683.

Martínez-Álvaro, M., Auffret, M. D., Stewart, R. D., Dewhurst, R. J., Duthie, C. A., Rooke, J. A., Wallace, R. J., Shih, B., Freeman, T. C., Watson, M., Roehe, R. (2020). Identification of complex rumen microbiome interaction within diverse functional niches as mechanisms affecting the variation of methane emissions in bovine. **Frontiers in microbiology**, 11, 659.

Martinez-Fernandez G, Jiao J, Padmanabha J, Denman SE and McSweeney CS (2020) Seasonal and Nutrient Supplement Responses in Rumen Microbiota Structure and Metabolites of Tropical Rangeland Cattle. **Microorganisms**, 8(10), 1550.

Martins, G. (2021). Diagnóstico sobre sistemas de dados agrícolas do Brasil para um sistema nacional de avaliação de danos e perdas por desastres na agricultura. Brasília, **FAO**. <https://doi.org/10.4060/cb6527pt>.

Matsuaki, M.; Takizawa, S.; Ogawa, M. Plasma insulin, metabolite concentrations, and carcass characteristics of Japanese Black, Japanese Brown, and Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.3287-3293, 1997.

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

Mott, G. O.; Lucas, H. L. The design conduct and interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. **In: International Grassland Congress**, 6, (1952), Pennsylvania State College, 1952. p.1380-1395.

Myer PR, Smith TP, Wells JE, Kuehn LA, e Freetly, HC (2015). Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, 10(6), e0129174

Ngo, V. Q. H., Enault, F., Midoux, C., Mariadassou, M., Chapleur, O., Mazéas, L., Loux, V., Bouchez, T. Krupovic, M., Bize, A. (2022). Diversity of novel archaeal viruses infecting methanogens discovered through coupling of stable isotope probing and metagenomics. **Environmental Microbiology**.

Paulino, M.F., Detmann, E., Valente, E.E.L., Barros, L.V., (2008). Nutrição de bovinos em pastejo. **In: Proceedings of the 4th Symposium on Strategic Management of Pasture**, Viçosa, MG, Brazil. p.131–169.

Poppi, D. P., McLennan, S. R. (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of animal science**, 73(1), 278-290.

Qiu, X., Qin, X., Chen, L., Chen, Z., Hao, R., Zhang, S., Yang, S., Wang, L., Cui, Y., Li, Y., Ma, Y., Cao, B., Su, H. (2022). Serum Biochemical Parameters, Rumen Fermentation, and Rumen Bacterial Communities Are Partly Driven by the Breed and Sex of Cattle When Fed High-Grain Diet. **Microorganisms**, 10(2), 323.

Reis, R.A., Oliveira, A.A., Siqueira, G.R., Gatto, E., (2015). Semiconfinamento para produção intensiva de bovinos de corte. **In: Proceedings of Simposio ´ Mato-grossense de Bovino de Corte**, Cuiaba, ´MT, Brazil. p. 248–293.

Ribeiro Júnior, C. S., Messana, J. D., Granja-Salcedo, Y. T., Canesin, R. C., Fiorentini, G., San Vito, E., ... & Berchielli, T. T. (2016). Parameters of fermentation and rumen microbiota of Nellore steers fed with different proportions of concentrate in fresh sugarcane containing diets. **Archives of Animal Nutrition**, 70(5), 402-415.

Russell, J. B., O'connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of animal science**, 70(11), 3551-3561.

Russell, R. R. B., Coleman, D., Dougan, G. (1985). Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. **Microbiology**, 131(2), 295-299.

Saro, C.; Ranilla, M. J.; Carro, M.D. (2012) Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by realtime PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Journal of Animal Science**, v.90, p.4487–4494.

Silva LFC, Valadares Filho SC, Chizzotti ML, Rotta PP, Prados LFP, Valadares RFD, Zanetti D, Braga JMS (2012) Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle, **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.41, no.3, Viçosa Mar.

Simioni, T.A., Messana, J.D., Silva, L.G., Granja-Salcedo, Y.T., Torrecilhas, J.A., Vito, E.S., Lage, J.F., Reis, R.A., Berchielli, T.T., (2022). Effects of mineral or proteinenergy supplementation and genetic group on metabolism parameters of young beef bulls grazing tropical grass during the rainy season. **Livest. Sci.** 255, 104805

Sniffen, C. J., Robinson, P. H. (1987). Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, 70(2), 425-441.

Stevenson, I.L. The effect of L- α -amino-*n*-butyric acid on growth and production of extracellular isoleucine and valine by *Eubacterium ruminantium* and a related rumen isolate. **Canadian Journal of Microbiology**. 25(12): 1394-1400.

Tian, J. H., Pourcher, A. M., Bureau, C., & Peu, P. (2017). Cellulose accessibility and microbial community in solid state anaerobic digestion of rape straw. **Bioresource technology**, 223, 192-201.

Titgemeyer, E.C., Armendariz, C.K., Bindel, D.J., Greenwood, R.H., Loest, C.A., (2001.) Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **J. Anim. Sci.**

Ueki, A., Goto, K., Kaku, N., & Ueki, K. (2018). *Aminipila butyrica* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, arginine-decomposing bacterium isolated from a methanogenic reactor of cattle waste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68(1), 443-448.

Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK (1999) Effect of replacing alfafa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal Dairy Science**, 82:2686-2696.

Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Cunha, M.D.;Queiroz, A.C.; Sampaio, C.B. (2011) In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle 59 feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40(3), 666–675.

Wang, C., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Pei, C. X., Zhang, S. L., Yang, W. Z. (2018). Effects of dietary protein levels and 2-methylbutyrate on ruminal fermentation, nutrient degradability, bacterial populations and urinary purine derivatives in Simmental steers. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102(3), 611-619.

- Wang, L., Zhang, K., Zhang, C., Feng, Y., Wang, X., Wu, G. (2019). Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. **Sci Rep** 9, 19620.
- Wu, J., Zhang, X., Tan, Z., & Jiao, J. (2022). Distribution of free amino acids and mRNA expression of their corresponding transporters in the intestinal mucosa of goats feeding on a corn grain versus corn gluten diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 102(2), 868-875.
- Wu, Z., Hou, Y., Hu, S., Bazer, F. W., Meininger, C. J., McNeal, C. J., & Wu, G. (2016). Catabolism and safety of supplemental L-arginine in animals. **Amino acids**, 48(7), 1541-1552.
- Xu, Y., Aung, M., Sun, Z., Zhou, Y., Cheng, Y., Hao, L., ... & Zhu, W. (2022). Bio-Fermentation Improved Rumen Fermentation and Decreased Methane Concentration of Rice Straw by Altering the Particle-Attached Microbial Community. **Fermentation**, 8(2), 72.
- Xue, M. Y., Sun, H. Z., Wu, X. H., Liu, J. X., Guan, L. L. (2020). Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. **Microbiome**, 8(1), 1-19.
- Yang, W. Z., Beauchemin, K. A. (2007). Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, 90(6), 2826-2838.
- Zhao, Y. L., Yan, S. M., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. (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**, 103(5), 4355-4366.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Mediana e rango interquartil (IQR) dos Índices de riqueza e diversidade de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época das águas e suplementados com diferentes fontes de PNDR

Suplementos				
Índices	SM	FSP	GM	P-valor
Riqueza				
ACE	93,000±7,500	88,000±22,250	97,000±20,750	0,838
Chao1	93,000±7,500	88,000±22,250	97,000±20,750	0,838
Diversidade				
Fisher	12,321±0,750	11,935±2,931	12,845±2,594	0,949
Shannon W	3,504±0,217	3,464±0,131	3,431±0,130	0,652
Simpson	0,943±0,015	0,945±0,006	0,942±0,012	0,949

SM= Suplementação mineral; FSP= Suplementação proteica com farelo de soja protegido GLU = Suplementação proteica com glúten de milho. Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.

CAPÍTULO 3 – EFEITO DA TERMINAÇÃO INTENSIVA A PASTO NO PERÍODO DA SECA COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA SOBRE A DIVERSIDADE MICROBIANA RUMINAL, FLUXO E DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM BOVINOS DE CORTE.

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação intensiva a pasto com diferentes fontes de proteína em bovinos Nelore na estação de seca, sobre a diversidade microbiana, digestibilidade e fluxo de AA. Foram utilizados oito bovinos Nelore, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em delineamento *cross over*, no período seco com suplementação intensiva a pasto. Os animais receberam 1,8% peso corporal do suplemento composto por polpa cítrica, milho, sal mineral e umas das diferentes fontes proteicas: 1) farelo de soja (FS) como fonte de PDR; 2) farelo de soja protegido (FSP) como fonte de PNDR; 3) glúten de milho 60 (GM) como fonte de PNDR. O consumo de PDR foi maior em animais suplementados com FS em comparação com FSP e GM (FS vs. FSP 40,40% e FS vs. GM 28,28%). Já o consumo de PNDR foi maior para FSP e GM (FSP vs FS 15,38% e GM vs. FS 29,79%). O consumo de AA totais e AANE (kg/dia) foi superior para com GM em comparação com outros suplementos (GM vs FS 22,43% e GM vs FSP 30,61%). A suplementação GM proporcionou um consumo superior Ala, Cis, Glu, Pro, Ser e Tyr, em relação à suplementação com FS e FSP. Por outro lado, a suplementação com FS resultou em consumo 25, 66% superior de ácido aspártico em comparação com GM. Animais suplementados com FS apresentaram menor pH ruminal comparado com o GM. A suplementação com FS resultou em maiores concentrações ruminal de $\text{NH}_3\text{-N}$ comparado com GM. A concentração isovalerato foi 27,10% menor para FSP comparado com FS. Foram identificados 24 filos, sendo 23,19% pertencentes ao filo Bacteroidetes e 12,36% Unassigned filo não classificados. Além disso, mais da metade dos filos pertencem ao Firmicutes com 51,09%. A suplementação com FSP e GM proporcionou maior abundância relativa do Methonosphaera ($P=0,024$) comparado a FS. O gênero Thermoplasmatales_Incertae_Sedis_Uncultured apresentou maior abundância relativa na suplementação com FSP em comparação FS. A família Bacteroidales com gêneros distintos foram diferentes entre as suplementações, apresentando maior abundância relativa com FS. A Lachnospiraceae_UCG-001 ($P=0,038$), Ruminococcaceae_UCG-010 ($P=0,025$), gênero Treponema_2 ($P=0,005$) foram observadas em maior abundância relativa no FSP. O gênero Fibrobacter tendeu à maior abundância relativa quando os animais recebiam FS e FSP ($P=0,087$). FSP e GM tendeu à maior abundância relativa dos gêneros Christensenellaceae Uncultured ($P=0,058$), Lachnospiraceae_ND3007_group ($P=0,065$) e resultou em maior abundância da família Mycoplasmataceae ($P=0,032$). A suplementação com FS resultou em digestibilidade aparente ruminal da proteína bruta 7,82% superior quando comparada a GM. Já a digestibilidade aparente intestinal aumentou 185,96g, 209,57g e 162,22g respectivamente para AA totais, AAE e AANE ao comparar a suplementação do GM com FS. Em relação aos AA individuais, a suplementação com FSP proporcionou um aumento de 17,77% na digestibilidade intestinal da arginina quando comparada a animais que foram suplementados com FS. A concentração plasmática de lisina foi superior em 55,81% em animais suplementados com FSP e GM em comparação com FS. Concluímos que a terminação intensiva a pasto, com diferentes fontes proteicas promoveu a alteração na abundância relativa da diversidade ruminal dos gêneros Christensenellaceae Uncultured,

Lachnospiraceae_ND3007_group e Mycoplasmataceae e as metanogênicas Methanosphaer e fontes com maiores teores de PNDR alteram a digestibilidade aparente intestinal dos AA de forma individual, sendo GM com maiores valores de digestibilidade intestinal em comparação com FSP.

PALAVRAS-CHAVE: aminoácidos essenciais, farelo de soja protegido, Fibrobacter, glúten de milho, Thermoplasmatales incertae sedis , lisina,

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a produção de bovinos de corte vem sendo desafiada a aumentar a eficiência do sistema (produção de carne) e diminuir os impactos ambientais gerados por esse setor. No Brasil 82,81% dos animais abatidos em 2021 foram oriundos de sistemas de produção a pasto (ABIEC, 2022), porém a qualidade e quantidade da forragem oferecida a esses animais é afetada pelas estações climáticas do país (Roth et al., 2018). Na estação da seca as forrageiras apresentam alta concentração de compostos fibrosos como celulose, hemicelulose e lignina, além da redução da proteína bruta (PB) ($< 7\%$ da MS total) e valores de fibra em detergente neutro variando de 62 a 79%, (MS total). Esses fatores são conhecidos por limitar o crescimento microbiano e síntese de proteína microbiana, afetando assim o uso eficiente do pasto pelos animais (Figueiras et al., 2010; Cidrini et al., 2022).

A suplementação ($\geq 1,8\%$ PC) de animais em terminação em sistema de pastejo é adotada com a finalidade de melhorar o desempenho animal uma vez a diminui o efeito de déficit nutricional do pasto, principalmente em relação aos compostos nitrogenados, importantes para o desenvolvimento microbiano ruminal e proporcionam a diminuição do impacto ambiental de forma sustentável ((Detmann et. al., 2014; Huws et.al, 2018, Dallantonia et al., 2021).

Neste contexto, entender a microbiota ruminal se faz necessária devido ao seu papel essencial na degradação da fibra e no uso do nitrogênio, o qual que é influenciado pelo substrato ingerido pelo hospedeiro (Huws et al., 2018). Estudos recentes evidenciam que a eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) está sendo associada à diversidade microbiana ruminal, onde os microrganismos *Ruminococcus_2*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Candidatus_Arthromitus*, *Mogibacterium*, *Anaerofustis*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Hespellia*, *Lactonifactor*, *Lachnospiraceae* apresentam correlação negativa com a retenção de nitrogênio (Wang et al., 2019, Alves et al., 2020).

No ambiente ruminal as bactérias são as principais utilizadoras do nitrogênio (N), sendo as bactérias celulóticas *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, e *Fibrobacter succinogenes*, capazes de incorporar a amônia e esqueletos de carbono e sintetizar seu próprio aminoácido (AA) para crescimento bacteriano (Bach et al., 2005, Antonopoulos et al., 2003; Ataçoğlu et al., 1999). Tais achados demonstram que os microrganismos ruminantes podem interferir no metabolismo de AA em ruminantes.

Estudos demonstram que a energia associada a suplementação proteica interfere no metabolismo do N, podendo proporcionar diferença na quantidade de proteína metabolizável que chega ao duodeno (Nichols et al., 2018), demonstrando assim que a energia oriunda dos carboidratos da forragem influencia no metabolismo de N. Estudos avaliando fornecimento de AA são realizados, em sua maioria, com vacas leiteiras, (Fleming et al., 2018; Nichols et al., 2018; Zang et al., 2019). Porém, supõem-se que o metabolismo de AA em animais a pasto possa ser modificado pela dieta fornecida. Portanto, a porcentagem de proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR) seria uma estratégia a ser utilizada por nutricionistas de animais em sistema de pastejo, pois, as fontes de PNDR podem gerar um incremento na retenção de N, e contribuir para reciclagem de N) devido à baixa concentração PDR (Batista et al., 2016, de Souza et al., 2020).

Muitos estudos realizados com AA em ruminantes estão relacionados com bovinos leiteiros (Fleming et al., 2018; Nichols et al., 2018; Zang et al., 2019), portanto, uma insuficiência em estudos com bovinos de corte demonstra a necessidade de estudos neste tipo de animal, principalmente que estejam em sistema de pastejo. Assim, este estudo tem como hipótese que a suplementação com fontes de PNDR em animais em terminação intensiva a pasto no período da seca favorece as populações de bactérias fibrolíticas e celulóticas, modificando a diversidade microbiana ruminal, e aumentando o fluxo e digestibilidade de AA que chegam ao duodeno. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação intensiva a pasto com diferentes fontes de proteína, em bovinos Nelore na estação de seca, sobre a diversidade microbiana ruminal, fluxo e digestibilidade intestinal de aminoácidos

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal, Brasil (Protocolo número 16688/16).

O experimento foi conduzido no período seco do ano (maio -agosto), na área de pastagem, formadas pela forragem *Urochloa brizantha* cv. Xaraés, pertencente ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal. Nessa região o clima é

classificado como tropical, com chuvas no verão e inverno seco (Sistema internacional Köppen, AW). Durante o período experimental a média de precipitação mensal foi de 33,3 mm, de temperatura máxima mensal foi de 28,5 °C e de temperatura mínima mensal de 20,6 °C (Tabela 1).

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

Mês	Precipitação (mm)	ND	Tmax (°C)	Tmin (°C)	UR (%)
Maio	97,6	4	29,1	16,4	73,6
Junho	24,2	1	27,9	13,9	65,5
Julho	11,5	1	27,7	12,2	59,6
Agosto	9,3	2	29,5	14,1	57,2
Médias	35,65	2	28,55	14,15	63,98

Tmax= temperatura máxima; Tmin= temperatura mínima; Tmed= temperatura média; UR= umidade relativa do ar; ND=número de dias com chuva. Dados obtidos na Estação Agroclimatológica – Unesp de Jaboticabal-SP

2.1. Animais, delineamento experimental e dietas

Foram utilizados oito novilhos da raça Nelore (peso corporal inicial 408 ± 38 kg), canulados no rúmen (cânula silicone- 10 cm diâmetro interno, Kehl®, São Carlos, Brasil) e no duodeno (cânula tipo T, Kehl®, São Carlos, Brasil). Inicialmente, os animais foram pesados, sorteados entre os tratamentos, submetidos ao controle de endo e ecto parasitas e distribuídos em delineamento *cross over*. O experimento foi composto por três períodos experimentais de 28 dias cada (13 dias para adaptação às dietas experimentais e instalações, 7 dias para fornecer indicadores e obter a estabilização da excreção fecal de marcador externo e 8 dias para coleta de amostras).

Os animais foram mantidos em 8 piquetes de 1,8 ha cada, com bebedouro automático e cocho coberto para suplementação. O método de pastejo foi lotação contínua e taxa de lotação variada utilizando a técnica de “*put and take*” (Moot & Lucas, 1952), utilizando animais *Bos indicus* não castrados como reguladores. A oferta de forragem foi estabelecida por altura 30-35cm. Foram fornecidas três dietas experimentais compostas por uma das diferentes fontes proteicas: 1) Animais a pasto e suplementados (1,8% peso corporal PC) com polpa cítrica, milho, sal mineral e a fonte proteica farelo de soja (FS); 2). Animais a pasto e suplementados (1,8 % PC) com polpa cítrica, milho, sal mineral e a fonte proteica farelo de soja protegido (FSP) como fonte de PNDR; 3)Animais a pasto e suplementados (1,8% PC) com polpa cítrica,

milho, sal mineral e a glúten de milho 60 (GM) como fonte de PNDR (Tabela 2). Os animais foram suplementados diariamente as 9h00.

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

Item	Suplemento			
	FS	GM	FSP	Forragem
<i>Ingredientes (g/ kg MS)</i>				
Milho moído	236,10	239,70	235,65	-
Polpa Cítrica	494,50	540,03	532,74	-
Farelo de Soja	254,79	-	-	-
Farelo de Soja Protegido	-	-	217,01	-
Glúten de milho 60	-	205,55	-	-
Mistura Mineral*	14,62	14,72	14,59	-
<i>Composição química (% MS)</i>				
Matéria seca	91,75	91,82	93,07	48,6
Matéria orgânica	92,19	93,25	91,99	93,29
Proteína Bruta	19,35	20,90	19,54	7,83
Proteína degradada no rúmen	11,72	8,83	7,55	3,88
Proteína não degradada no rúmen	7,64	12,07	9,99	3,95
Extrato etéreo	4,20	3,89	3,99	1,51
Nutriente digestíveis totais	79,52	78,96	78,68	-
Carboidratos não fibrosos	54,85	48,61	55,05	23,62
Fibra em detergente neutro indigestível	2,75	3,47	3,16	39,3
Fibra em detergente neutro (FDNcp) [#]	13,80	15,85	15,40	60,34
Fibra em detergente neutro potencialmente digestível %FDN [§]	79,84	77,17	78,07	35,02
Fibra em detergente ácido	18,23	22,73	20,98	27,92
Lignina	-	-	-	2,33
<i>Aminoácidos essenciais (AAE)s, %MS</i>				
Arginina	1,56	1,19	1,42	0,34
Histidina	0,50	0,49	0,45	0,12
Isoleucina	0,82	0,84	0,76	0,26
Leucina	1,60	2,95	1,48	0,5
Lisina	1,10	0,54	0,95	0,3
Metionina	0,23	0,39	0,20	0,08
Fenilalanina	1,04	1,29	0,95	0,31
Treonina	0,73	0,75	0,67	0,3
Valina	1,07	1,14	1,00	0,35
<i>Aminoácidos não essenciais(AANE), %MS</i>				
Alanina	1,09	1,84	1,03	0,45

Ácido Aspártico	2,05	1,49	1,85	0,59
Cistina	0,22	0,27	0,19	0,08
Ácido Glutâmico	3,39	4,39	3,01	0,75
Glicina	0,97	0,83	0,91	0,34
Prolina	1,38	2,17	1,30	0,41
Serina	0,97	1,07	0,86	0,31
Tirosina	0,70	0,97	0,62	0,18

FS=fonte proteica farelo de soja(1,8%PC); FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido(1,8%PC); GM= fonte proteica glúten de milho 60 (1,8%PC); Forragem= *Urochloa brizanyha* cv.Xaraés obtidas medias da técnica de pastejo simulado efetuada nos períodos experimentais.*Mistura mineral: (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),⁴Fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína, ⁵Fibra em detergente neutro potencialmente digestível (Lima et al.,2012)

2.2. Amostragem do pasto e do suplemento

A massa de forragem foi estimada no 28º dia de cada período experimental, para isso se mensurou a altura média do dossel, por meio da leitura de 80 pontos em cada piquete, com auxílio de bengala graduada. Foram escolhidos cinco pontos com altura média que representava o piquete, e colheu toda a forragem delimitada por uma moldura de 0,25 m², a 5 cm de altura. As amostras colhidas foram pesadas e separadas em: material morto, lâmina foliar e colmo+bainha. Na sequência, as diferentes frações foram secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 72 horas.

A oferta de matéria seca (OMS) foi calculada da seguinte forma: OMS = kg de matéria seca do piquete dividido pelo total do peso vivo (kg) dos animais mantidos no piquete no período. A oferta de folha verde (OFV) foi calculada da mesma forma: OFV = kg matéria seca de folha verde por piquete/total do peso vivo dos animais mantidos no piquete.

As amostras de suplemento foram coletadas a cada três dias e amostras de forragem foram coletadas no 28º dia de cada período experimental pela técnica de depilação manual (Johnson,1978). Os alimentos foram analisados para obtenção dos 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) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados de acordo com Mertens (2002) e adaptados para Ankom²⁰⁰FiberAnalyzer, sendo a FDN corrigido para cinza e proteína posteriormente (FDNcp). O FDN potencialmente digestível (FDNpd) foi calculado referente ao valor do FDN segundo Lima et al., 2012:

$$\text{FDNpd} = [(\text{FDN} - \text{FDNi}) / \text{FDN}] * 100$$

A fração proteína bruta (PB) foi obtida por condutividade térmica utilizando-se o equipamento Leco®, modelo FP-528. A concentração de carboidratos não fibrosos (CNF) determinada foi calculada de acordo com (NRC, 2001) com base na equação da seguinte forma: $CNF = 100 - (\%FDN + \% PB + \% EE + \% \text{ Matéria Mineral})$. A celulose foi solubilizada utilizando ácido sulfúrico a 72% pela diferença em relação ao valor de FDA método de “Lignina Klason” (Van Soest, 1963).

2.3. Consumo, fluxo e digestibilidade

O consumo foi avaliado com uso de três indicadores, óxido de cromo (Cr_2O_3) utilizado na estimativa da produção fecal; dióxido de titânio (TiO_2) na estimativa do consumo de suplemento e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como marcador interno, para estimar o consumo de pasto. O Cr_2O_3 (8 de Cr_2O_3 /animal, no rúmen – via cânula) e TiO_2 (10 de TiO_2 /animal por dia, misturado no suplemento), foram fornecidos a partir do 13º dia de cada período experimental, por 10 dias seguidos (7 dias para estabilização da excreção fecal do indicador e 3 dias para coletas de fezes).

As fezes foram coletadas nos dias 20º, 21º e 22º de cada período experimental nos horários 7:00, 18:00 e 14:00 respectivamente, as amostras foram secas em estufas de circulação de ar forçado a 55°C por 72 h, metade da amostra foi moída (Wiley mill; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) em peneira de 1 mm e a outra metade em peneira de 2 mm. A quantidade de Cr_2O_3 foi analisada de acordo com a metodologia proposta por Kozloski et al. (2006) e a quantidade de TiO_2 foi mensurada, segundo metodologia descrita por Titgemeyer et al. (2001).

O consumo de pasto foi estimado com base nos dados de produção fecal utilizando a fibra em detergente neutro indigestível FDNi como marcador interno. O teor de FDNi nas fezes, nas amostras de pasto (obtidas pela técnica de desfolhação manual, Johnson, (1978)) e nos suplementos foi determinado após incubação *in situ* por 288 horas (Valente et al., 2011) e posterior extração com detergente neutro com a utilização do analisador de fibra Ankom (Ankom Inc., Fairport, NY, EUA).

O fluxo de matéria seca (MS) duodenal foi estimado utilizando a FDNi como indicador (Harvatine e Allen, 2006). Amostras de digesta duodenal foram coletadas dos animais nos dias 22º, 23º e 24º de cada período experimental nos seguintes horários: primeiro dia 14:00h, segundo dia 7:00h e 22:00h e terceiro dia 1:00h, 10:00 e 19:00h, para representar o fluxo de 24

horas. Após serem homogeneizadas duas alíquotas foram formadas; onde 50% da amostra duodenal foi seca em estufa de circulação de ar forçado a 55°C por 72h. As amostras, depois de seca em estufa, foram agrupadas por cada animal para formar a composta que foram analisadas para obtenção dos 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). O fluxo de MS duodenal (FMSD) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{FMSD g/d} = [\text{MS fecal} \times (\text{g / kg FDN indigestível na MS fecal})] / (\text{g / kg FDN indigestível em MS duodenal}).$$

A segunda alíquota de 50% da digesta duodenal foi congelada a -15°C para o isolamento bacteriano. O isolamento bacteriano da digesta duodenal foi realizado seguindo a metodologia descrita por Cecava et al., (1990), onde as amostras compostas de digesta foram filtradas através de um filtro de nylon de 100 µm (44% de área de superfície dos poros; Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Suíça) e o material retido foi lavado com solução salina (800 mL de NaCl 0,9%). Em seguida, os microrganismos foram isolados da amostra filtrada. Após centrifugação (2.000 rpm por 20 min a 5°C), o sobrenadante foi separado e centrifugado (12.340 rpm por 20 min a 5°C). O sobrenadante foi descartado e 100 mL de solução salina a 0,9% foram adicionados ao pellet. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.340 rpm por 20 min a 5 °C) e o pellet resultante foi coletado, congelado (-80 °C), liofilizado por 72 h e usado para análise do perfil AA.

A porcentagem da digestibilidade aparente total (DAT) da matéria seca e dos nutrientes e a digestibilidade aparente ruminal (DAR) foram estimadas da seguinte forma:

$$\text{DAT (\%)} = ((\text{consumo kg} - \text{excreção fecal kg}) / (\text{consumido kg})) \times 100$$

$$\text{DAR} = ((\text{consumo kg} - \text{fluxo de MS ou nutriente}) / (\text{consumo kg})) \times 100$$

2.4. Parâmetros ruminais

A coletas de conteúdo ruminal foram distribuídas em dois dias para se ter uma representatividade de 24h. Portanto no dia 25° e 26 ° de cada período experimental foi coletado 500 gramas do conteúdo ruminal, na região ventral do rúmen, por meio de cânula, filtradas em

panos de algodão, separadas em alíquotas uma para mensuração do pH (DM-106922, Digimed, São Paulo, Brasil) e outra armazenada (duas alíquotas de 40 mL), a -20°C para N-NH₃. Essas coletas foram realizadas nos seguintes horários em relação a suplementação dos animais: primeiro dia: 0h,6h,12h,18h após a suplementação e segundo dia: 3h,9h,15h e 21h após suplementação. Posteriormente as alíquotas armazenadas foram submetidas às análises de nitrogênio amoniacal ruminal (FENNER, 1965) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por cromatografia gasosa (Leviniti et al., 1990). Para a determinação dos ACGG, o líquido ruminal foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado para posterior análise. A cromatografia foi realizada no GC2014, (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar HP INNOWax 3(0 m, 0,32 mm, 0,50 µm, Agilent Technologies, Colorado, EUA). A taxa de fluxo do gás de arraste (nitrogênio) foi 3,18 mL/min, a temperatura inicial era de 80 °C e foi programada para aumentou 20 °C/min até uma temperatura final de 240 °C.

2.5. Balanço de nitrogênio

As coletas spot de urina foram realizadas no 23°, 24° e 25° no seguinte horário 7:00; 14:00 e 18:00, respectivamente estas amostras foram utilizadas na quantificação N total e creatinina. O volume urinário foi estimado por meio da excreção diária de creatinina (CE), utilizando a equação para novilhos Nelore proposta por Silva et al. (2012):

$$CE \text{ (g/d)} = 0,0345 \times (PC)^{0,9491}$$

Em que CE é a excreção diária de creatinina (g / dia) e PC = peso corporal.

O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl.

No cálculo de retenção de nitrogênio foi utilizada as amostras de fezes que foram coletadas e armazenadas conforme descrito no item 2.3. Portanto, a retenção de N foi expressa pela relação:

$$RN = CN - (EFN + EUN), \text{ dado em g/dia.}$$

2.6. Parâmetros sanguíneos

Durante o 18º dia do período experimental foram coletadas amostras de sangue (10mL), às 08:00 e, 16:00 h, da jugular de cada animal, as amostras de sangue foram coletada em tubos vacutainer (10 mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) revestidos com heparina (143 UI), centrifugados (1.000 g por 20 min a 4 °C), o plasma foi coletado e armazenado em seis tubos de 2ml tipo eppendorf por animal (-20 °C) para posterior determinação da concentração de AA. Para a análise de AA, o plasma (200 µL) foi misturado com 50 µL solução de HCl 1 N contendo ácido alfa-aminobutírico como padrão interno e 250 µL de metanol 99% e analisado segundo metodologia descrita por Hagen et al., (1993). 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).

2.7. Determinação da composição de aminoácidos nas amostras

O perfil de AA's foi determinado nas amostras de alimentos (pasto e suplemento), digesta duodenal, nas fezes e sangue para quantificação da absorção de cada AA no intestino, embora saiba-se que há síntese de PMIC no intestino grosso.

A composição em aminoácidos das amostras de alimentos, pellet duodeno total (DNR) e pellet duodeno microbiano, fezes e sangue foram determinados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) conforme metodologia descrita por de Souza et al.,2020.

2.8. Comunidade bacteriana

As coletas para diversidade bacteriana do ambiente ruminal foram realizadas no 25º dia de cada período experimental, pela cânula ruminal, coletou-se aproximadamente 50g de digesta, fração sólida + fração líquida da região ventral, antes da alimentação matinal dos animais (Saro et al., 2012). Esse material foi imediatamente transportado para o laboratório em caixas de isopor com gelo.

No laboratório adicionou-se 50 mL de solução de PBS (pH 7,4) a 4°C, em seguida, homogeneizou-se a amostra mediante a agitação manual por três minutos. Após esse procedimento o material foi filtrado em pano estéril com porosidade de 100 micras. O filtrado foi processado de acordo com metodologia utilizada descrita por Ribeiro Júnior et al., (2016) e Granja-Salcedo et al., (2017) para formação de um pellet bacteriano. 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 foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e fluorimetria (Qubit® 3.0, kit Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit, Life Technologies). A pureza do DNA metagenômico extraído foi avaliada por espectrofotometria a partir das relações A260nm/A280nm e A260nm/A230nm. Finalmente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com 1 µL de SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

A identificação e quantificação da diversidade bacteriana ruminal realizou-se por meio do sequenciamento da região V4/V5 do gene 16S rRNA bacteriano. A amplificação da região hipervariável 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') utilizando-se 20 ng de DNA total de cada amostra, e 1,25 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para reação de PCR [1x]; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e H₂O para um volume final de 20 µL. A PCR foi conduzida nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 53,8°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas em duplicata e reunidas equimolarmente para minimizar o viés durante a reação.

A pureza dos produtos da PCR, foi verificada em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos era estimado por comparação com marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Em seguida, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery, seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na facility do departamento de tecnologia da FCAV/UNESP no Illumina® Miseq.

Os dados obtidos do sequenciamento foram processados por meio do QIIME software package (Caporaso et al., 2010). Para a leitura foram selecionadas reads acima de 250 pb e com média > 25 na qualidade Phred e assim foram agrupados em OTUs (operational taxonomic units) com mais de 99% de semelhança das sequências. Esses dados foram utilizados para análise rarefação e apresentando em gráficos o número de OTUs agrupado a 99% de semelhança em relação ao número de leituras para os diferentes níveis taxonômicos. Além desses dados se calculou também estimadores de riqueza e os índices de alpha e beta diversidade.

2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio 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.

O efeito do tratamento foi analisado em delineamento *cross over*, onde o tratamento é o efeito fixo e períodos, animais e resíduos os efeitos aleatórios, correspondente ao modelo. A ANOVA os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos, enquanto valores $0,05 > P > 0,10$ foram considerados tendências no comparativo das médias utilizando o pós-teste de Tukey.

Nas análises microbianas quando a ANOVA foi significativa as médias foram comparadas utilizando o pós-teste de teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns com significância declarada 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Consumo, fluxo e digestibilidade

A massa de forragem, massa de folha verde, colmo em porcentagem da matéria seca, a relação folha e caule e a taxa de lotação apresentou diferença significativa entre tratamentos (Tabela 3). A OMS, OFV e folha verde em porcentagem da matéria seca não teve diferença no tratamento (Tabela 3). Não houve interação (Tabela 3) entre tratamento e período para variáveis apresentadas ($P > 0,50$). Ocorreu efeito do período para todas as variáveis ($P < 0,01$).

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

Item	Suplemento			EPM	P-valor		
	FS	FSP	GM		T	P	T×P
Massa de forragem, kg MS/há	6155,63	7262,60	7649,47	227,36	0,012	<0,01	0,999
Massa de folha verde, kg MS/ha	1666,40	2442,87	2296,47	119,65	0,005	<0,01	0,662
OMS, kg MS/kg PC	3,86	4,08	4,06	0,098	0,361	<0,01	0,920
OFV, kg MS/kg PC	0,49	0,48	0,51	0,025	0,787	<0,01	0,868
Folha verde, %MS	13,17	12,88	11,78	1,133	0,419	<0,01	0,549
Colmo %MS	14,47	19,47	20,67	1,282	<0,01	<0,01	0,320
Folha: Caule	1,02	0,87	0,67	0,094	0,012	<0,01	0,504
Taxa de lotação, UA/há	6,50	7,53	7,22	0,207	0,043	<0,01	0,800

FS=fonte proteica farelo de soja; FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido; GM= fonte proteica glúten de milho 60; OMS= Oferta de matéria seca; OFV = Oferta de folha verde na matéria seca; UA = Unidade animal. EPM = Erro padrão da média.

O consumo de MStotal, MSsuplemento, MSforragem, MO e FDN não diferiu entre as diferentes fontes proteicas suplementares ($P \geq 0,10$; Tabela 4). O consumo de EE foi superior em 13,89% em animais suplementados com FS em relação as suplementação com FSP e GM ($P=0,042$), já o consumo de PB tendeu ser maior 17,47% na suplementação com FS e GM em comparação com FSP ($P=0,068$; Tabela 4). No entanto, o consumo de proteína degradável no rúmen foi maior em animais suplementados com FS em comparação com FSP e GM ($P=0,001$) e o consumo de proteína não degradável no rúmen (kg) foi superior na suplementação com GM em comparação com FS e FSP ($P=0,001$; Tabela 4).

A analisar o consumo de AA totais e AANE foram superiores em animais suplementados com GM em comparação FS e FSP ($P \leq 0,05$), o consumo de AAE foi maior na suplementação com GM em comparação com FSP, porém a suplementação com FS foi similar as demais fontes ($P=0,020$; Tabela 4). O consumo de AA individuais apresentou tendência ou sendo significativos para 15 dos AA analisando não apresentando diferença para o consumo de dois AA histidina e isoleucina ($P \geq 0,10$ Tabela 4).

Tabela 4. Consumo de nutrientes e aminoácidos em bovinos Nelore mantidos a pasto em forragens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época da seca e suplementados com diferentes fontes de proteína.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	FS	FSP	GM		
Consumo MS, % PC	2,07	1,85	1,91	0,049	0,338

Consumo de suplemento, kg MS/dia	8,11	7,32	7,62	0,322	0,279
Consumo de forragem, kg MS/dia	1,23	1,09	0,80	0,127	0,293
<i>Consumo, kg/dia</i>					
Matéria seca	9,34	8,40	8,42	0,366	0,131
Matéria orgânica	8,62	7,74	7,85	0,337	0,165
Fibra em detergente neutro	1,85	1,78	1,68	0,091	0,290
Extrato etéreo	0,36 ^a	0,31 ^b	0,31 ^b	0,014	0,042
Proteína bruta	1,66 ^a	1,37 ^b	1,66 ^a	0,065	0,068
Proteína degradada no rúmen	0,99 ^a	0,59 ^b	0,71 ^b	0,046	0,001
Proteína não degradada no rúmen	0,66 ^b	0,78 ^b	0,94 ^a	0,038	0,001
<i>Consumo de AA, Kg/dia</i>					
AA totais	5,50 ^b	4,92 ^b	7,04 ^a	293,337	0,004
AAE	2,85 ^{ab}	2,49 ^b	3,33 ^a	122,207	0,020
AANE	3,05 ^b	2,720 ^b	4,11 ^a	176,005	0,002
<i>Consumo de AAE, g/dia</i>					
Arginina	435,72 ^a	380,33 ^{ab}	295,11 ^b	20,533	0,003
Histidina	144,52	128,45	152,35	6,203	0,236
Isoleucina	231,68	211,81	252,87	10,162	0,195
Leucina	441,62 ^b	408,60 ^b	972,02 ^a	56,703	<0,001
Lisina	328,18 ^a	279,50 ^a	152,15 ^b	19,469	<0,001
Metionina	67,82 ^b	59,52 ^b	133,19 ^a	7,371	<0,001
Fenilalanina	294,74 ^b	264,90 ^b	410,21 ^a	17,858	0,001
Treonina	209,11 ^{ab}	187,33 ^b	228,65 ^a	9,193	0,079
Valina	295,56 ^{ab}	267,30 ^b	335,92 ^a	13,473	0,055
<i>Consumo de AANE, g/dia</i>					
Alanina	292,75 ^b	271,41 ^b	583,01 ^a	32,017	<0,001
Ácido Aspártico	605,46 ^a	539,08 ^{ab}	450,12 ^b	27,082	0,007
Cistina	67,02 ^b	58,47 ^b	90,83 ^a	3,937	0,002
Ácido Glutâmico	990,60 ^b	882,79 ^b	1454,13 ^a	65,859	<0,001
Glicina	268,26 ^a	239,33 ^{ab}	228,29 ^b	11,181	0,043
Prolina	359,14 ^b	324,90 ^b	658,62 ^a	34,591	<0,001
Serina	273,03 ^{ab}	237,91 ^b	330,48 ^a	13,551	0,008
Tirosina	196,24 ^b	173,80 ^b	316,09 ^a	15,291	<0,001

FS=fonte proteica farelo de soja (1,8%PC); FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido(1,8%PC); GM= fonte proteica glúten de milho 60 (1,8%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Os diferentes tipos de suplementação não alteraram fluxo duodenal de MS (kg/dia), fluxos de AA totais, AAE, AANE ($P \geq 0,05$, Tabela 5). Somente o fluxo de leucina e prolina

tenderam serem superiores na suplementação com GM em comparação com FS e FSP ($P \leq 0,10$; Tabela 5).

Tabela 5. Fluxo duodenal de aminoácidos em novilhos Nelore mantidos em forragens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época da seca e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	FS	FSP	GM		
<i>Fluxo MS, kg/dia</i>	3,21	2,94	2,27	0,161	0,279
<i>Fluxo AA, g/dia</i>					
AA totais	727,81	732,55	763,15	42,009	0,807
AAE	340,40	336,45	324,38	18,635	0,936
AANE	380,30	384,17	426,89	23,124	0,647
<i>Fluxo de AA), g/dia</i>					
Arginina	38,33	42,64	24,71	2,204	0,370
Histidina	18,21	17,85	15,62	1,079	0,919
Isoleucina	41,72	39,67	30,69	2,498	0,586
Leucina	60,60	59,09	102,67	6,043	0,880
Lisina	49,70	48,53	24,45	3,128	0,123
Metionina	14,51	13,09	16,08	0,824	0,437
Fenilalanina	35,23	37,02	41,77	2,281	0,508
Treonina	38,18	36,18	30,74	2,000	0,824
Valina	43,91	42,38	37,67	2,464	0,849
<i>Fluxo de AANE, g/dia</i>					
Alanina	49,67	47,14	64,37	3,528	0,261
Ácido Aspártico	74,23	74,04	53,04	4,268	0,425
Cistina	9,90	10,21	9,95	0,478	0,908
Ácido Glutâmico	103,15	111,29	141,59	7,925	0,287
Glicina	45,05	44,29	29,11	2,736	0,451
Prolina	35,02	36,43	58,78	3,486	0,100
Serina	36,34	37,01	38,94	2,092	0,727
Tirosina	26,94	26,76	31,11	1,634	0,386
<i>Fluxo de aminoácidos microbiano (AA mic), g/dia</i>					
AAmic totais	206,01	102,06	273,58	32,185	0,371

AAEmic	97,09	97,32	126,91	15,163	0,363
AANEmic	111,60	59,31	131,76	16,551	0,364

FS=fonte proteica farelo de soja(1,8%PC); FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido(1,8%PC); GM= fonte proteica glúten de milho 60(1,8%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

A digestibilidade aparente total da MS, MO, EE não diferiram entre as suplementações proteicas, assim como a digestibilidade do FDN (Tabela 6). A digestibilidade aparente total da PB apresentou tendência a ser maior na suplementação com GM em comparação com FS e FSP ($P=0,066$), já a digestibilidade aparente ruminal da PB foi superior na suplementação com FS, quando comparada ao GM, mas não diferiu do FSP ($P=0,011$; Tabela 6).

No caso da digestibilidade intestinal dos AA totais, AAE e AANE foram superiores para a suplementação com GM, em comparação com SM ($P\leq 0,05$; Tabela 6). A digestibilidade intestinal foi significativa ou apresentou tendência para 15 dos AA individuais analisados, porém dois AA tiveram a digestibilidade intestinal semelhante entre as fontes proteicas sendo eles lisina e glicina (Tabela 6).

Tabela 6. Digestibilidade aparente de nutrientes e aminoácidos em novilhos Nelore mantidos em forragens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época da seca e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	FS	FSP	GM		
<i>Digestibilidade aparente total, %</i>					
Matéria seca	64,10	63,00	69,77	1,630	0,388
Matéria orgânica	68,14	67,65	73,19	1,485	0,546
Proteína bruta	53,42 ^b	47,34 ^b	68,55 ^a	1,260	0,066
Extrato etéreo	80,52	83,30	79,05	1,260	0,872
Fibra em detergente neutro	38,37	42,94	41,47	2,695	0,888
<i>Digestibilidade ruminal aparente, (% da total)</i>					
Matéria seca	63,58	62,48	70,70	1,771	0,485
Matéria orgânica	68,87	67,05	75,06	1,615	0,611
Proteína bruta	72,74 ^a	70,38 ^{ab}	64,89 ^b	1,245	0,011
Extrato Etéreo	59,09	53,59	59,03	1,365	0,714
Fibra em detergente neutro	74,22	75,68	75,18	2,969	0,708
<i>Digestibilidade intestinal de aminoácidos (AA), 100g/dia</i>					
AA totais	383,34 ^b	459,72 ^{ab}	569,30 ^a	32,595	0,007
AAE	328,04 ^b	411,99 ^{ab}	537,61 ^a	31,013	0,008

AANE	419,06 ^b	489,12 ^{ab}	581,28 ^a	30,382	0,009
<i>Digestibilidade intestinal de aminoácidos essenciais (AANE), 100g/dia</i>					
Arginina	433,06 ^b	526,64 ^a	496,76 ^{ab}	26,319	0,013
Histidina	370,73 ^b	485,91 ^{ab}	533,65 ^a	22,520	0,041
Isoleucina	328,16	438,39	522,31	37,521	0,066
Leucina	291,36 ^b	398,15 ^b	645,88 ^a	44,588	<0,001
Lisina	454,47	438,86	427,47	29,253	0,819
Metionina	441,89 ^b	405,93 ^{ab}	669,84 ^a	38,141	0,043
Fenilalanina	232,87 ^b	364,82 ^b	533,45 ^a	39,253	0,003
Treonina	266,62	310,86	408,07	31,246	0,055
Valina	204,02 ^b	333,10 ^{ab}	445,53 ^a	33,373	0,008
<i>Digestibilidade intestinal de aminoácidos não essenciais (AANE), g/dia</i>					
Ácido Aspártico	696,90	707,85	694,74	18,906	0,689
Cistina	529,94 ^b	531,75 ^{ab}	686,42 ^a	22,683	0,008
Alanina	118,19 ^b	269,17 ^{ab}	482,57 ^a	40,312	0,002
Ácido Glutâmico	546,77 ^b	606,56 ^{ab}	672,02 ^a	24,542	0,009
Glicina	237,15	321,29	310,94	25,655	0,124
Prolina	296,81 ^b	415,40 ^b	593,06 ^a	33,790	<0,001
Serina	364,10	355,76	519,14	35,923	0,056
Tirosina	208,59 ^b	254,05 ^{ab}	468,58 ^a	37,753	0,004

FS=fonte proteica farelo de soja(1,8%PC); FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido(1,8%PC); GM= fonte proteica glúten de milho 60(1,8%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

3.2. Parâmetros ruminiais, balanço de nitrogênio e parâmetros sanguíneo

As variáveis pH e N amoniacal ruminal variaram ao longo do tempo de coleta do líquido ruminal, mas não houve interação tempo × tratamento ($P>0,10$, Figura 1). Na mensuração do pH ruminal os tempos de coleta 0 ($P= 6,50$) e 21 ($P = 6,39$; Figura 1A) horas após alimentação apresentaram maiores valores médios em relação aos demais tempos de coleta (Figura 1A). Os tempos 3 ($P =6,12$) e 18 ($P = 6,06$) apresentaram pH 5,58% inferior aos tempos 0 e 21 e 6,84% superior aos tempos 9 e 12, não diferindo dos tempos 6 e 15. Os tempos 9 e 12 apresentaram-se 11,63% inferior aos tempos 0 e 21, não diferindo dos tempos 6 e 15. Já N amoniacal apresentou oscilação de concentração durante os tempos de coletas, sendo observado maior

concentração no tempo 21, seguido dos tempos 0, 15, e 18 que se apresentaram 6,03% inferiores ao 21. O tempo 12 não diferiu dos tempos 0, 9, 15 e 18. Já o tempo 9 apresentou-se 41,96% inferior ao tempo 21 e 38,24% inferior aos tempos 0, 15 e 18 (Figura 1B).

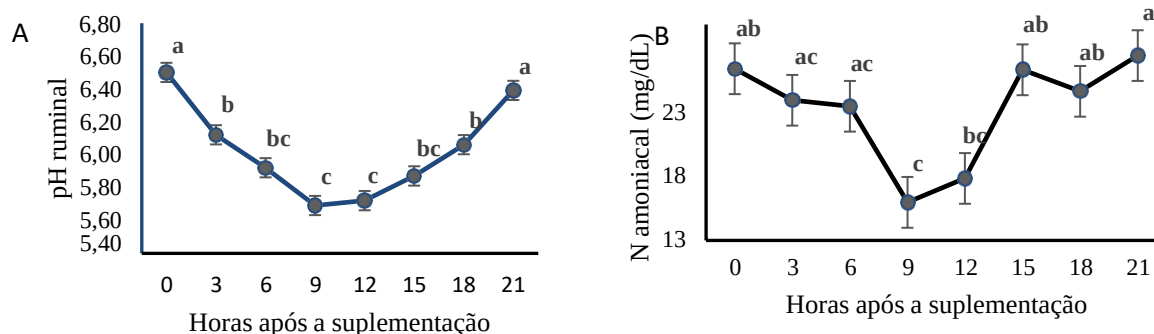


Figura 1. A= mediana dos valores de pH ao longo do tempo após alimentação de líquido ruminal em bovinos Nelore em terminação a pasto durante período das secas recebendo suplementação com diferentes fontes proteicas. B= mediana dos valores de NH₃-N ao longo tempo após alimentação de líquido ruminal em bovinos Nelore em terminação a pasto durante período das secas recebendo suplementação com diferentes fontes proteicas.

A concentração de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) total apresentou diferença significativa entre a suplementação de FS em comparação GM ($P=0,005$), houve também efeito do tempo sobre a concentração de AGCC total, onde menor valor foi observado 21 horas após a suplementação em relação aos outros horários ($P<0,01$). As concentrações de ácido acético, propiônico, butírico e valérico não foram afetadas pelas fontes proteicas ($P>0,01$, Tabela 7). No entanto, o isovalerato foi influenciado pela fonte proteica e o tempo de coleta (Tabela 7). Ao fornecermos o FSP a concentração de isovalerato foi 27,10% menor em comparação FS. Em relação ao tempo ao comparar o tempo de 9 horas após a alimentação com o tempo de 0 horas, a produção do isovalerato foi 41,38% menor, para os demais tempos a concentração foi semelhante quando comparados. A relação acetato:propriônico (A/P) foi maior em animais suplementados com GM que FS ($P=0,010$ Tabela 7).

O isoButírico tendeu uma concentração inferior de 42,85% 9 horas após o fornecimento do suplemento em relação a 15 horas para os demais tempos 0,3,6 e 21 a concentração foi semelhante aos tempos 9 e 15 horas após a suplementação. O butírico apresentou uma concentração média 30,21% inferior 9 horas após a suplementação em comparação com

horários 0,6,3 e 21. No caso do valerato teve uma concentração menor de 54,22% quando o tempo de 21 horas após a suplementação foi comparado com 6 horas.

As variáveis: excreção de nitrogênio na urina e excreção de nitrogênio nas fezes e não apresentaram diferenças significativas ($P \geq 0,1$; Tabela 7). O consumo de nitrogênio em gramas teve tendência a ser menor em animais que receberam FSP ($P=0,067$), refletindo assim na retenção de nitrogênio que foi em média 22,55% inferior em animais suplementados com FSP em comparação aos que receberam FS e GM ($P=0,045$; Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros de fermentação ruminal em novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv, Xaraés durante a época da seca e suplementados com diferentes fontes proteicas.

Item	Suplemento ¹			EPM	P-valor ²		
	FS	GM	FSP		F	T	F×T
AGCC, mmol/L							
Acetato (A)	66,34	67,70	67,69	0,354	0,152	0,781	0,440
Propionato (P)	24,26	23,36	23,95	0,268	0,290	0,423	0,654
Butirato	3,43	3,52	3,53	0,207	0,930	0,047	0,162
Isobutirato	2,52	2,19	1,96	0,125	0,200	0,081	0,680
Valerato	1,80	1,69	1,51	0,126	0,542	0,023	0,228
Isovalerato	1,06a	0,86ab	0,78b	0,040	0,005	0,007	0,730
Relação A:P	2,79b	2,99a	2,87ab	0,041	0,010	0,816	0,581
Balanço de nitrogênio (N), g/ dia							
N consumido	265,12a	266,01a	219,36b	10,372	0,066	-	-
N excretado urina	41,72	54,41	43,15	3,170	0,416	-	-
N excretado fezes	122,45	84,42	112,54	6,698	0,184	-	-
N retido	99,53	91,68	100,59	8,992	0,896	-	-
N retido (% consumido)	37,54	37,19	41,28	2,803	0,800	-	-

¹FS=farelo de soja (1,8%PC), FSP= farelo de soja protegido (1,8%PC), GM= glúten de milho(1,8%PC). EPM=erro padrão da média.; ²F=fonte proteica, T= horário de coleta (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, e 21 horas após o fornecimento do suplemento); e F×T= interação entre fonte proteica e o horário de coleta.

As concentrações sanguíneas de proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL) não diferiram entre a suplementação proteica com diferentes fontes ($P \geq 0,10$; Tabela 8). A concentração plasmática de ureia foi superior na suplementação com FS quando comparado ao FSP, sendo a suplementação com GM equivalente as demais suplementações ($P=0,040$. Tabela 8). Ao analisar os aminoácidos individuais, a concentração de isoleucina foi 13,80% maior ao comparar GM com FS, porém não tivemos diferença significativa entre as fontes PNDR. A

concentração plasmática de lisina foi superior em 55,81% nas suplementações com FSP e GM ao compará-las com a suplementação de FS. O aminoácido não essencial cistina obteve concentração superior de 20,03% no GM em comparação com as demais suplementações (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros sanguíneos e composição de aminoácidos no plasma sanguíneo de novilhos Nelore mantidos em pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Xaraés durante a época da seca e suplementados com diferentes fontes de PNDR.

Item	Suplemento			EPM	P-valor
	FS	FSP	GM		
Proteínas totais, g/dL	7,04	6,95	6,99	0,067	0,807
Albumina, g/dL	2,71	2,73	2,79	0,041	0,579
Uréia, mg/dL	48,64 ^a	40,44 ^b	46,10 ^{ab}	1,601	0,040
AA Totais	2281,54	2341,20	2324,65	81,954	0,393
Arginina	181,68	209,84	224,23	8,318	0,580
Histidina	58,41	59,31	63,48	3,601	0,221
Isoleucina	113,73 ^b	131,95 ^{ab}	141,83 ^a	5,393	0,031
Leucina	346,84	232,94	232,94	22,084	0,848
Lisina	65,77 ^b	101,09 ^a	103,86 ^a	5,471	0,005
Metionina	23,11	19,66	19,10	0,928	0,967
Fenilalanina	78,62	64,77	69,05	2,821	0,781
Teronina	74,19	83,98	82,39	5,905	0,417
Valina	347,38	395,49	403,46	15,537	0,356
Alanina	171,14	238,67	187,34	10,167	0,392
Ácido Aspártico	11,82	14,16	14,11	1,038	0,350
Cistina	9,41 ^b	9,27 ^b	10,33 ^a	0,181	0,006
Ácido Glutâmico	70,29	68,94	61,88	3,443	0,984
Glicina	238,63	268,43	252,66	11,325	0,501
Prolina	128,92	98,28	105,25	7,309	0,970
Serina	75,88	73,12	79,11	3,311	0,446
Tirosina	72,93	61,46	66,64	3,411	0,587
Asparagina	9,15 ^a	9,46	9,84	0,892	0,716
Glutamina	117,39	112,59	116,24	4,133	0,436
Hidroxiprolina	33,09	31,45	37,27	1,233	0,265
Taurina	53,18	56,35	42,20	3,102	0,449

FS=fonte proteica farelo de soja(1,8%PC); FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido(1,8%PC); GM= fonte proteica glúten de milho 60 (1,8%PC); EPM = Erro padrão da média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.

3.3. Comunidade bacteriana

O sequenciamento do gene 16S DNA das 24 amostras analisadas geraram um total de 5.877.529 sequências (média 16.185,75) com uma confiabilidade de 0,99%. Com o sequenciamento foram identificados 24 filós, sendo 23,19% pertencentes ao filo Bacteroidetes e 12,36% Unassigned filo não classificados. Já mais da metade dos filós pertencem ao Firmicutes com 51,09% (Figura2).

Filós com leituras menores que 1% foram classificados como “others”, e estavam presentes em média no valor 0,17% na abundância relativa sendo eles Chloroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fibrobacter, Planctomycetes, SR1(abscondibacteria), Sccharibacteria, Synergistetes e Verrocomicrobia (Figura 2).

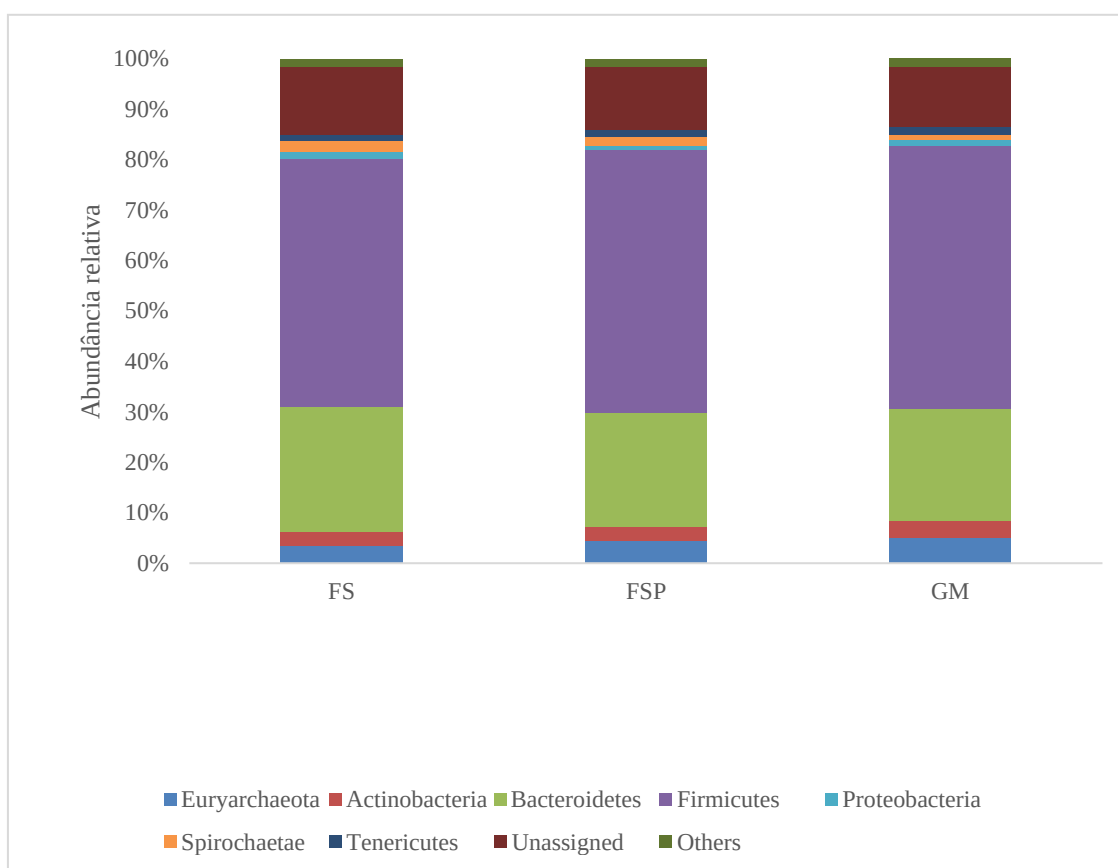


Figura 2. Abundância das unidades operacionais classificadas no nível de filo (%) em bovinos Nelore terminados a pasto durante o período das secas e suplementados com diferentes fontes de proteína. Others = somatória dos filós Chloroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fibrobacter, Planctomycetes, SR1(abscondibacteria), Sccharibacteria, Synergistetes e Verrocomicrobia Actinobacteria.

A abundância relativa das Archaeae com média de 4,36%. O filo classificado como Euryarchaeota não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,151$). Entre os gêneros identificados a Methanosphaera tiveram abundância relativa quando os animais foram suplementados com fontes proteicas não degradada no rumen nos tratamentos FPS e GM ($P = 0,024$). Já o gênero Methanobrevibacter não teve diferença significativa (Tabela 9). O gênero Thermoplasmatales_Incertae_Sedis_Uncultured apresentou maior abundância relativa na suplementação com FSP em comparação FS (Tabela 9). As dietas não influenciaram os índices de riqueza, alfa diversidade, abundância relativa total de bactérias e OTUs sem classificação (OTUs unassigned) (Tabela Suplementar 1).

Tabela 9 Mediana e rango interquartil (IQR) da abundância relativa das Archaeas ruminais classificadas por filo e gênero de novilhos Nelore em terminação a pasto suplementados com diferentes fontes de proteína na dieta.

Item	Suplemento			P-valor
	FS	FSP	GM	
Filo				
Euryarchaeota	3,375±1,921	4,325±1,289	5,064 ±2,835	0,151
Gênero				
Methanosphaera	0,829±0,519b	1,491±0,694a	1,584±0,696a	0,024
Thermoplasmatales_Incertae_Sedis_Uncultured	0,001±0,001b	0,019±0,042a	0,001±0,085ab	0,100
Methanobrevibacter	2,239±1,819	2,577±1,147	2,866±3,109	0,511

FS=fonte proteica farelo de soja; FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido; GM= fonte proteica glúten de milho 60. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.

Nas leituras foram identificados 716 gêneros, desses 35 apresentaram diferença significativas entre a suplementação com diferentes fontes proteicas. Os microrganismos da família Bacteroidales com gêneros distintos apresentaram maior abundância relativa com FS (Tabela 7) que nos demais tratamentos. Comportamento semelhante aconteceu com os seguintes microrganismos: família Lachnospiraceae do gênero Lachnospiraceae_UCG-001 espécie *Uncultured_bacterium* ($P=0,038$), família Ruminococcaceae do gênero Ruminococcaceae_UCG-010 espécie *Uncultured_rumen_bacterium* ($P=0,025$), família Veillonellaceae do gênero Selenomonas_3 ($P=0,008$) e família Spirochaetaceae do gênero Treponema_2 ($P=0,005$) (Tabela 10).

Para o gênero *Fibrobacter* a abundância relativa apresentou uma tendência a ser maior quando os animais recebiam FS e FSP ($P=0,087$). Quando os animais foram suplementados com FSP e GM, o ambiente ruminal apresentou tendência a maior abundância relativa dos gêneros *Christensenellaceae Uncultured* ($P=0,058$), *Lachnospiraceae_ND3007_group* ($P=0,065$) e a foi significativa para família *Mycoplasmataceae* ($P=0,032$) (Tabela 10).

Os gêneros *Lachnospiraceae _NK4A136_group* ($P = 0,016$) e *Ruminococcaceae_UCG-004* ($P = 0,002$) apresentaram maior abundância relativa em ambiente ruminal quando os animais recebiam as dietas com FS e GM (Tabela 10).

Tabela 10. Mediana e rango interquartil (IQR) da abundância relativa bacteriana ruminal de novilhos Nelore em terminação a pasto suplementados com diferentes fontes de proteína na dieta.

Família	Gênero	Espécie	Suplemento			P-valor
			FS	FSP	GM	
Bifidobacteriaceae	Bifidobacteriu	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,000±0,000b	0,042±0,2510 ^a	0,000±0,131 ^{ab}	0,083
Bacteroidales_BS11_gut_group	Uncultured_rumen_bacterium		1,128±0,713 ^a	0,435±0,351 ^{ab}	0,325±0,290 ^b	0,100
Bacteroidales_S24-7_group			3,662±2,010 ^a	1,979±0,683 ^{ab}	1,397±1,669 ^b	0,039
Bacteroidales_S24-7_group	Uncultured_bacterium		2,330±3,036 ^a	0,683±1,005 ^{ab}	0,270±0,516 ^b	0,050
Bacteroidales_UCG-001			0,000±0,079 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000±0,000 ^{ab}	0,100
Bacteroidales_UCG-001	Uncultured_rumen_bacterium		0,000±0,079 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000±0,000 ^b	0,038
Prevotellaceae	Prevotellaceae_YAB2003_group		0,366±0,517 ^a	0,066±0,413 ^{ab}	0,000±0,086 ^b	0,099
Prevotellaceae	Uncultured	<i>Bacterium_AC2042</i>	0,099±0,176 ^a	0,000±0,091 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,015
Uncultured			0,048±0,109 ^a	0,000±0,032 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,067
Fibrobacteraceae	Fibrobacter		0,533±0,176 ^a	0,511±0,389 ^a	0,360±0,197 ^b	0,087
Christensenellaceae	Christensenellaceae_R-7_group	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,116±0,117 ^b	0,299±0,225 ^{ab}	0,694±0,910 ^a	0,066
Christensenellaceae	Uncultured		0,000±0,000 ^b	0,017±0,020 ^a	0,015±0,046 ^a	0,058
Defluviitaleaceae	Defluviitaleaceae_UCG-011		0,047±0,086 ^a	0,000±0,040 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,047
Lachnospiraceae	[Eubacterium]_xylanophilum_group	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,038±0,151 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000±0,028 ^{ab}	0,064
Lachnospiraceae	[Ruminococcus]_gavvreauii_group	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,256±0,141 ^a	0,000±0,016 ^b	0,000±0,126 ^{ab}	0,085
Lachnospiraceae	Acetitomaculum	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,007±0,038 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000±0,023 ^{ab}	0,100
Lachnospiraceae	Coprococcus	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,000±0,099 ^a	0,000±0,000 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,100
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_AC2044_group		0,000±0,017 ^{ab}	0,000±0,000 ^b	0,049±0,122 ^a	0,058
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_ND3007_group		0,000±0,000 ^b	0,014±0,061 ^a	0,006±0,107 ^a	0,065
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK3A20_group	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,029±0,098 ^b	0,234±0,624 ^a	0,076±0,213 ^{ab}	0,030
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group		0,069±0,196 ^a	0,000±0,000 ^b	0,023±0,140 ^a	0,016
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_UCG-001	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,000±0,145 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000±0,000 ^b	0,038
Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_UCG-008		0,108±0,072 ^a	0,060±0,069 ^{ab}	0,000±0,015 ^b	0,020
Lachnospiraceae	Marvinbryantia	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,000±0,000 ^b	0,230±0,341 ^a	0,000±0,320 ^{ab}	0,058
Lachnospiraceae	Oribacterium		0,303±0,322 ^{ab}	0,619±0,658 ^a	0,183±0,220 ^b	0,089
Lachnospiraceae	Uncultured	<i>Ambiguous_taxa</i>	0,007±0,128 ^{ab}	0,153±0,313 ^a	0,000±0,016 ^b	0,063

Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_NK4A214_group	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,335±0,641 ^b	1,417±0,628 ^a	0,969±0,799 ^{ab}	0,049
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-004		0,257±0,130 ^a	0,017±0,115	0,198±0,084 ^a	0,002
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-010	<i>Uncultured_rumen_bacterium</i>	0,090±0,128 ^a	0,005±0,040 ^b	0,000±0,008 ^b	0,025
Ruminococcaceae	Ruminococcaceae_UCG-013	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,080±0,218 ^a	0,034±0,086 ^{ab}	0,000±0,032 ^b	0,100
Ruminococcaceae	Ruminococcus_1	<i>Uncultured_bacterium</i>	0,564±0,858 ^{ab}	0,745±0,857 ^a	0,296±0,220 ^b	0,032
Veillonellaceae	Selenomonas_3		0,194±0,241 ^a	0,000±0,074 ^b	0,000±0,000 ^b	0,008
Spirochaetaceae	Treponema_2		0,726±0,424 ^a	0,099±0,361 ^b	0,188±0,346 ^b	0,005
Synergistaceae	Pyramidobacter		0,035±0,023 ^a	0,009±0,019 ^b	0,019±0,022 ^{ab}	0,036
Mycoplasmataceae			0,000±0,000 ^b	0,011±0,081 ^a	0,002±0,024 ^a	0,032

FS=fonte proteica farelo de soja; FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido; GM= fonte proteica glúten de milho 60; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo a suplementação de bovinos Nelore terminados a pasto no pério das secas com FSP e GM utilizados como fontes de PNDR, demonstrou que apesar de não apresentarem diferença no fluxo de AA totais, AAE e AANE para o intestino delgado, a digestibilidade aparente intestinal dos AA individuais apresentaram absorções diferentes, as de animais suplementados com FS como PDR. Além disso, a diversidade microbiana apresentou maior abundância relativa dos gêneros Christensenellaceae Uncultured, Lachnospiraceae_ND3007_group e Mycoplasmataceae e as metanogênicas Methanospaera para os tratamentos de FSP e GM. Adicionalmente, a concentração plasmática da lisina foi maior na suplementados com as fontes de PNDR. Nossos resultados corroboram com estudos realizados com ruminantes avaliando a digestibilidade intestinal de AA, diversidade microbiana e eficiência do uso de AA do farelo de soja protegido e glúten de milho, onde as fontes de PNDR apresentaram melhores resultados para tais variáveis (de Souza et al., 2020; Hassan, et al., 2021; Gargallo et al., 2022).

O consumo de PDR foi maior em animais suplementados com FS, tal característica é atribuída a maior concentração de PNDR nesse alimento em comparação com FSP e GM. O NRC (2001) classifica o farelo de soja como fonte de proteína rapidamente e extensivamente degradada no rúmen. Já o consumo de PNDR foi maior em animais suplementados com FSP e GM comparado com FS. Alimentos fontes de PNDR tem alterações na estrutura da proteína fazendo que a amina sofra troca de elétrons por aquecimento ou encapsulamento se tornando produtos estáveis (Shibao e Bastos, 2011). Tal característica proporciona um maior aporte de AA de origem alimentar para o intestino delgado (Liu et al., 2012; Wu et al., 2020), onde esses AA podem ou não serem digeridos e absorvidos pelo animal. O consumo de N foi diferente entre as suplementações proteicas ofertadas, a suplementação com GM forneceu 46,65 gramas a mais de N em comparação com FSP. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada a composição bromatológica do alimento uma vez que GM apresenta maior teor de proteína bruta. Diferentemente aos nossos resultados, Camargo et al (2022) ao avaliar os mesmos ingredientes, porém com baixa suplementação de bovinos de corte (0,3%PC), não encontrou diferença entre o consumo de N para animais suplementados com FSP e GM.

A suplementação com GM proporcionou um maior consumo de AA totais e AANE (kg/dia) em relação às demais suplementações. Souza et al. (2020), ao estudar fontes e níveis

de proteína para ruminantes reportou maior proporção AA totais na composição bromatológica na fonte proteica glúten de milho em comparação ao farelo de soja sem proteção. O consumo de AAE (kg/dia) foi maior na suplementação com GM comparado com FSP. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com ruminantes (Souza et al., 2020; Gargallo et al., 2022). Além disso, o consumo PB em nosso estudo teve uma tendência a ser maior no GM em comparação com FSP.

O presente estudo demonstrou que essa diferença no consumo dos AA são influenciadas por concentração dos AA individuais, pois, comparado as demais a suplementação, GM forneceu um maior consumo leucina, lisina, metionina, fenilalanina, alanina cistina, ácido glutâmico, prolina, serina e tirosina. Nossos ingredientes utilizados têm em sua composição concentrações maiores de treonina e valina ao comparar GM com FSP. Além disso, a diferença no consumo de PB da dieta refletiu no maior consumo desse AA em comparação dessas fontes proteicas. Diferente dos nossos resultados, Gargallo et al. (2022), teve maior concentração de treonina no farelo de soja protegido em comparação com o glúten de milho.

O pH ruminal foi maior na suplementação com GM em relação a FS, porém o N-NH₃ se comportou de maneira inversa ao se comparar essas duas fontes de suplementação. O pH ruminal e a concentração de N-NH₃ no rúmen são influenciados pela concentração da proteína que sofre degradação em ambiente ruminal. Essas proteínas são hidrolisadas pelas ureases microbianas em CO₂ e NH₃ no rúmen, o que pode levar a variações no ambiente ruminal como alteração de pH e N-NH₃ (Kang et al., 2015; Xia et al., 2018). Animais suplementados com GM apresentaram menor desaminação no ambiente ruminal, o que resultou em menor concentração de NH₃ e maior pH. Aliado a isso, animais suplementados com FS apresentaram maior consumo em relação as demais suplementações proteicas. de Souza et al. (2021), avaliando fontes e níveis de proteínas na dieta de bovinos confinados, observaram que animais alimentados com farelo de soja + ureia (fonte de maior PDR) apresentaram concentração de N-NH₃ superior a animais suplementados com GM. Comportamento este que se assemelha aos obtidos no presente estudo.

A concentração produção de isovalerato foi maior em animais suplementados com FS comparado com FSP e GM. Os ácidos graxos de cadeia ramificada são provenientes do catabolismo de AA (valina, isoleucina, leucina e prolina) e são por sua vez utilizados para a biossíntese destes mesmos AA (Liu et al., 2009). A digestibilidade aparente ruminal da proteína

bruta, foi maior para FS em comparação com GM isso pode ser devido a maior porcentagem de PDR presente no FS em comparação aos demais suplementos avaliados.

A digestibilidade intestinal do AA totais, AAE e AANE foi superior em GM comparado com FS. A digestibilidade intestinal de AA individuais como histidina, fenilalanina, valina, leucina, cistina, alanina, prolina, tirosina e ácido glutâmico foi maior na suplementação com GM. A digestão da PNDR, que passa inalterada pelo ambiente ruminal, se inicia no abomaso com ação da enzima pepsina. A liberação dessa enzima acidifica o meio fazendo com que essa PNDR fique disponível para ação enzimática no intestino delgado. Após ação dessas enzimas, AA e pequenos peptídeos são formados e em sua maioria são absorvidos pelo epitélio intestinal (Guimarães, 2015).

Fatores como concentração de proteína na dieta e porcentagem de degradação da mesma em ambiente ruminal influenciam o perfil e a digestibilidade do AA que chegam ao intestino delgado (Mariz et al., 2018; Huang et al., 2019). Os resultados de nossos estudos demonstraram que o consumo de PNDR foi maior nos animais suplementados com GM, e a cada 100g de ingestão ao dia, e sua digestibilidade intestinal dos AA totais, AAE e AANE foi superior comparado com FS.

Dos filos identificados em nosso estudo, independentemente da suplementação recebida Firmicutes representou mais da metade da abundância relativa em nossas amostras, Cidrini et al. (2022) reportou que a degradação ruminal da celulose tem sido atribuída principalmente às habilidades metabólicas desse filo. Nossos dados não têm diferenças na digestibilidade aparente ruminal da fibra, tendo comportamento diferente dos encontrados pelos autores.

O gênero *Methanosphaera* pertencente a archaeae apresentou maior abundância relativa ao fornecermos FSP e GM. Sabe-se que esse gênero é dependente de hidrogênio e metanol e que possui um conjunto de genes raramente observados em Archaea, os quais realizam o metabolismo do peptideoglicano (Hoedt et al., 2018). Nossos resultados indicam que as fontes de PNDR favorecem a maior abundância relativa. Já o gênero *Thermoplasmatales_Incetae_Sedis_Uncultured*, pertencentes as metanogênicas, apresentou maior abundância relativa com a suplementação com GM em relação a FS. Nossos resultados demonstram um ambiente ruminal desfavorável para o crescimento de metanogênicas ao suplementar FS em comparação com GM, pois, o FS resultou em maior concentração de N-NH₃ ruminal, o qual pode inibir o crescimento destes microrganismos. Estudos avaliando

metanogênicas em biodigestores reportaram que o sistema de digestão foi inibido quando por um alto teor de $\text{NH}_3\text{-N}$ no ambiente (Cai et al., 2021).

Da família Prevotallaceae identificamos o gênero Prevotallaceae_YAB2003_group e a espécie Prevotallaceae Uncultured Bacterium_AC2042 em maior abundância relativa nos animais suplementados com FS em comparação com GM, as características dessa família é sua diversidade no uso de substratos (Tan et al., 2022), porém em nosso estudo acreditamos que a maior proporção do N-NH_3 ruminal possa ter contribuído e o consumo de arginina foi maior para suplementação FS em comparação GM, podendo esses gêneros estar associados na degradação desse AA no ambiente ruminal. O gênero Fibrobacter foi identificado em maior abundância relativa nas suplementações com FS e FSP, acreditamos que possa estar relacionado com a disponibilidade de AA no ambiente ruminal, apesar da suplementação com GM ter maior consumo de AA, a digestibilidade intestinal foi maior para essa fonte em relação ao FS. Já para o FSP, o perfil de AA possa ter limitado o crescimento dessa população no ambiente ruminal em estudo com bovinos Nelores suplementados com tanino, autores observaram uma menor abundância relativa filos Firmicutes, Fusobacteria e Fibrobacteres (Cidrini et al., 2022), fato que pode indicar que são dependentes da presença de AA para o crescimento.

O gênero Christensenellaceae Uncultured proporcionou maior abundância relativa quando os animais foram suplementados com fonte de PNDR, sabe-se que o gênero Christensenellaceae R7, está envolvido nos metabolismos dos seguintes aminoácidos arginina, treonina, prolina, glicina e serina (Ogunade et al., 2019), além disso a família desse gênero tem um papel importante na formação de biofilme e degradação do amido e fibra em ambiente ruminal (Ribeiro et al., 2020). Em nossos estudos a suplementação com GM e FSP não diferenciou no consumo de arginina ($P=0,116$), porém para os demais AA treonina, prolina, glicina e serina foram maiores para GM.

Da família Lachnospiraceae nossos resultados encontram 13 gêneros significativos que variam de acordo com a suplementação proteica. Alves et al. (2020), correlacionou essa família negativamente com a retenção de nitrogênio em novilhos Nelores, sabe-se que ela se correlacionada com o metabolismo do triptofano e valina, degradações dos seguintes aminoácidos de leucina e isoleucina (Li et al., 2017). Em nosso estudo o gênero Lachnospiraceae_ND3007 esteve em maior abundância relativa nas suplementações com FSP e GM em comparação com FS. Estudo correlacionando a eficiência alimentar e a diversidade microbiana, observou que Lachnospiraceae_NK3A20 foram fortemente associados ao

metabolismo do ácido linoleico e degradação da lisina (Liu et al., 2022). A suplementação com GM proporcionou maior consumo de lisina em nosso estudo, nos levando acreditar que gêneros dessa família podem estar envolvidos a degradação de lisina em ambiente ruminal.

Nosso estudo encontrou 5 gêneros da família Ruminococcaceae significativos entre as suplementações. Essa família é conhecida por possuir atividade celulolítica e hemicelulolítica, produzindo acetato, butirato, formato e hidrogênio e estão associados com a alta eficiência alimentar (Liu et al., 2022). No presente estudo, a abundância relativa de Ruminococcaceae_UCG-010 Uncultured_rumen_bacterium foi maior na suplementação com FS em relação ao FSP e GM. Em estudo correlacionando a fermentação ruminal com a diversidade microbiana, autores observaram que bactérias no rúmen sintetizam ácidos graxos de cadeia ramificada ímpares por alongamento de propionato e valerato ou pela alteração de α -cetoácidos. O microorganismo Ruminococcaceae UCG-010 promoveu a síntese de ácidos graxos de cadeia ramificada ímpares através do valerato (Liu et al., 2022). Em nosso estudo a produção de isovalerato foi maior nos animais suplementados com FS, o que corrobora com o estudo anteriormente citado.

Em nosso estudo, a família Spirochateceae do gênero Treponema 2 apresentou maior abundância relativa em animais suplementados com FS em comparação a FSP e GM. Alves et al., (2020) correlacionou positivamente essa família com bovinos de alta retenção de nitrogênio. Em estudos com meio de cultura para o Treponema ssp., a suplementação com soro estimulou seu crescimento, pois foi fonte de ácidos graxos (Arruzura et al., 2021). Em nosso trabalho, a suplementação com FS apresentou maior proporção de AGCC total, atribuindo assim a diferença encontrada.

A família Mycoplasmataceae esteve em maior abundância relativa quando os animais receberam suplemento com FSP e GM. Em estudos sobre o genoma dessa família, tais resultados foram justificados por se tratar de microrganismo possui O GC 3, que é definido como uma fração de guaninas e citosinas na terceira posição do códon, tornando esses microrganismos mais eficientes em competir por substratos como AA (Tatarinova et al., 2016). Tais características nos leva acreditar que as suplementações com FSP e GM, por ter apresentarem maiores teores de PNDR (9,99 e 12,07%) a competição no ambiente ruminal pode limitar nutrientes, diminuindo as concentrações fazendo que essa família possa ser favorecida. Porém mais estudos precisam ser realizados para investigar a ação desse microrganismo no

ambiente ruminal, pois estudos com ruminantes associam já Mycoplasmataceae com doenças (Deeney et al., 2021).

A concentração plasmática de lisina foi maior em animais suplementados com fontes proteicas contendo maiores teores de PDNR (FSP e GM). De Souza et al. (2020), observou que as concentrações plasmáticas de AA são de difícil interpretação devido a vários fatores atrelados a interpretação dos resultados. Porém, observamos que a concentração bromatológica de lisina foi maior no FSP em 32,27% em comparado com as demais fontes proteicas GM e FS. Mostrando assim que a fonte de PNDR foi capaz de fornecer uma maior concentração de AA diretamente ao duodeno para serem absorvidos.

Portanto faz-se necessário estudos que avaliem o metabolismo de AA em ruminantes, já que estes estão sujeitos a transformações no ambiente ruminal e a predição de AA que atualmente é usada para cálculos na dieta, consideram em sua maioria um único valor para a digestibilidade de todos AA. Porém nossos resultados demonstram que cada AA possui uma digestibilidade aparente intestinal diferente.

5. CONCLUSÃO

A terminação intensiva a pasto com suplementação de diferentes fontes proteicas fornecedoras de PNDR favoreceu a abundância relativa ruminal dos gêneros Christensenellaceae Uncultured, Lachnospiraceae_ND3007_group e Mycoplasmataceae e as metanogênicas Methanospira. Além disso, o uso do GM como fonte proteica aumentou a digestibilidade aparente intestinal dos AA.,

6. REFERENCIAS

ABIEC (2022), Beff report -Perfil da Pecuária no Brasil 2022- disponível <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/> último acesso 28/07/2022

Alves, K. L. G. C., Granja-Salcedo, Y. T., Messana, J. D., de Souza, V. C., Ganga, M. J. G., Colovate, P. H. D., Kishi, L. T., Berchielli, T. T. (2021). Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle. **Anaerobe**, 67, 102316.

Antonopoulos, D. A., Aminov, R. I., Duncan, P. A., White, B. A., & Mackie, R. I. (2003). Characterization of the gene encoding glutamate dehydrogenase (gdhA) from the ruminal bacterium *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Archives of microbiology*, 179(3), 184-190.

AOAC. (1995) Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. Association of Official Analytical Methods Inc., Washington, D.C., USA.

Arrazuria, R., Caddey, B., Cobo, E. R., Barkema, H. W., & De Buck, J. (2021). Effects of different culture media on growth of *Treponema* spp. isolated from digital dermatitis. **Anaerobe**, 69, 102345.

Atasoglu, C., Valdés, C., Newbold, C. J., Wallace, R. J. (1999). Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and de novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 307-314.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. (2005) Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal. Dairy Science**. 88, p. E9-E21.

Batista E.D., Detmann E, Titgemeyer E.C., Valadares Filho S.C., Valadares, R.F.D., Prates, L.L., Paulino, M. F. (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.

Cai, Y., Zheng, Z., & Wang, X. (2021). Obstacles faced by methanogenic archaea originating from substrate-driven toxicants in anaerobic digestion. **Journal of Hazardous Materials**, 403, 123938.

Cecava, M. J., Merchen, N. R., Gay, L. C., & Berger, L. L. (1990). Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, 73(9), 2480-2488.

Cidrini, I. A., Granja-Salcedo, Y. T., Prados, L. F., Kishi, L. T., Siqueira, G. R., Resende, F. D. (2022). Effect of tannin extract associated with two levels of non-protein nitrogen in the supplement on performance, ruminal parameters, and microbial diversity of grazing Nellore cattle during the growing phase at dry season. **Animal Feed Science and Technology**, 286, 115269.

Dallantonia, E. E., da Rocha Fernandes, M. H. M., da Silva Cardoso, A., Leite, R. G., Ferrari, A., Ongaratto, F., Reis, R. A. (2021). Performance and greenhouse gas emission of Nellore and F1 Angus× Nellore yearling bulls in tropical production systems during backgrounding and finishing. **Livestock Science**, 251, 104646.

de Souza, V. C, Messana, J. D, Batista, E.D, Alves, K. L G. C., Titgemeyer, E. C., Pires, A V., Ferraz Junior, M. V., Silva, L. G., Negrão, J. A., Costa, V. E., Ganga, M.J. G., Colovate, P.H. D., Berchielli, T. T. (2021). Effects of protein sources and inclusion levels on nitrogen metabolism and urea kinetics of Nellore feedlot steers fed concentrate-based diets. **Journal of animal science**, 99(8), skab185.

de Souza, V. C., Messana, J. D., Batista, E. D., Alves, K. L. G. C., Dias, A. V. L., Campos, L. M., Lima, L. O., Granja-Salcedo, Y. T., Faria, L. R., Carvalho, G. M., Pires, A. V., Berchielli, T. T. (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**, 269, 114642.

Deeney, A. S., Collins, R., & Ridley, A. M. (2021). Identification of Mycoplasma species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005–2019. **BMC Veterinary Research**, 17(1), 1-12.

Detmann, E., Valente, E.E.L., Batista, E.D., Huhtanen, P., (2014). An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livest. Sci.** 162, 141–153.

Fenner, H. (1965) Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. *Journal of Dairy Science*, v.48, p. 249–251. for whole-body deposition. **J. Anim. Sci.** 96, 670–683.

Figueiras, J. F., Detmann, E., Paulino, M. F., Valente, T. N. P., Valadares Filho, S. D. C., Lazzarini, I. (2010). Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 1303-1312.

Fleming, A. J., Estes, K. A., Choi, H., Barton, B. A., Zimmerman, C. A., & Hanigan, M. D. (2018). Assessing bioavailability of ruminally protected methionine and lysine prototypes. **Journal of dairy science**, 102(5), 4014-4024.

Gargallo, S., Ferret, A., Calsamiglia, S. (2022). Ruminal Microbial Degradation of Individual Amino Acids from Heat-Treated Soyabean Meal and Corn Gluten Meal in Continuous Culture. **Animals**, 12(6), 688.

Granja-Salcedo YT, Ramirez-Uscategui RA, Machado EG, Messana JD, Kishi LT, Dias AVL, Berchielli TT (2017). Studies on bacterial community composition are affected by the time and storage method of the rumen content. **PloS one**, v12, p(4), e0176701

Guimarães T.P (2015) Exigências Proteicas para bovinos de corte. **Multi-Science Journal**.;1(1):90-9.

Hagen, S.R., Augustin, J., Grings, E., Tassinari, P., 1993. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. **Food Chem.** 46, 319–323.

Harvatine, K.J.; Allen, M.S. (2006) Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 677– 685.

Hassan, F. U., Guo, Y., Li, M., Tang, Z., Peng, L., Liang, X., & Yang, C. (2021). Effect of methionine supplementation on rumen microbiota, fermentation, and amino acid metabolism in in vitro cultures containing nitrate. **Microorganisms**, 9(8), 1717.

Henderson, G.; Cox, F.; Kittelmann, S.; Heidarian, M.V.; Zethof, M.; Noel, S.J.; Waghorn, G.C.; Janssen, P.H. (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.

Hoedt, E. C., Parks, D. H., Volmer, J. G., Rosewarne, C. P., Denman, S. E., McSweeney, C. S., ... & Morrison, M. (2018). Culture-and metagenomics-enabled analyses of the *Methanosphaera* genus reveals their monophyletic origin and differentiation according to genome size. **The ISME journal**, 12(12), 2942-2953.

Huang, J., Wu, T., Sun, X., Zou, C., Yang, Y., Cao, Y., ... & Lin, B. (2020). Effect of replacing conventional feeds with tropical agricultural by-products on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal microbiota of water buffaloes. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 104(4), 1034-1042.

Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche A., Guan, L.L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold C.J., Roehe, R., Dewhurst, R. J., Snelling, T. J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A. H., Scollan, N. D., Prado, R.M., Pilau, E. J., Mantovani, H. C., Attwood, G. T., Edwards, J. E., 23, McEwan, N. R., Morrisson, S., Mayorga, O. L., Elliott, C., Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Frontiers in microbiology**, 9, 2161.

Jayanegara, A., Dewi, S. P., Laylli, N., Laconi, E. B., Nahrowi, N., & Ridla, M. (2016). Determination of cell wall protein from selected feedstuffs and its relationship with ruminal protein digestibility in vitro. **Media Peternakan**, 39(2), 134-140.

Kang, S., Wanapat, M., Phesatcha, K., & Norrapoke, T. (2015). Effect of protein level and urea in concentrate mixture on feed intake and rumen fermentation in swamp buffaloes fed rice straw-based diet. **Tropical Animal Health and Production**, 47(4), 671-679.

Kozloski, G. V., Netto, D. P., Oliveira, L. D., Maixner, A. R., Leite, D. T., Maccari, M., Quadros, F. L. F. D. (2006). Chromium oxide use as a marker for measuring fecal production of grazing cattle: estimative variations due to sampling schedule. **Ciência Rural**, 36, 599-603.

Leventini, M. W., C. W. Hunt, R. E. Roffler, and D. G. Casebolt. (1990). Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. *J. Anim. Sci.* 68:4334–4344

Li, C., Li, J. Q., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. (2012). Forage proportion and particle length affects the supply of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, 95(5), 2685-2696.

Liu, Q., Wang, C., Huang, Y. X., Dong, K. H., Yang, W. Z., Zhang, S. L., & Wang, H. (2009). Effects of isovalerate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 93(6), 716-725.

Liu, Y., Wu, H., Liu, C., & Zhou, Z. (2022). Rumen Microbiome and Metabolome of High and Low Residual Feed Intake Angus Heifers. **Frontiers in veterinary science**, 341.

Mariz, L. D. S., Amaral, P. M., Valadares Filho, S. C., Santos, S. A., Detmann, E., Marcondes, M. I., Faciola, A. P. (2018). Dietary protein reduction on microbial protein, amino acid

digestibility, and body retention in beef cattle: 2. Amino acid intestinal absorption and their efficiency for whole-body deposition. **Journal of Animal Science**, 96(2), 670-683.

Matsuaki, M.; Takizawa, S.; Ogawa, M. Plasma insulin, metabolite concentrations, and carcass characteristics of Japanese Black, Japanese Brown, and Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.3287-3293, 1997.

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

Mott, G. O.; Lucas, H. L. The design conduct and interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. **In: International Grassland Congress**, 6, (1952), Pennsylvania State College, 1952. p.1380-1395.

Nichols, K., Bannink, A., Pacheco, S., Van Valenberg, H. J., Dijkstra, J., & Van Laar, H. (2018). Feed and nitrogen efficiency are affected differently but milk lactose production is stimulated equally when isoenergetic protein and fat is supplemented in lactating dairy cow diets. **Journal of dairy science**, 101(9), 7857-7870.

NRC. (2001) Nutrient requirements of beef cattle, n. 8. rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C.

Ogunade, I., Schweickart, H., McCoun, M., Cannon, K., & McManus, C. (2019). Integrating 16S rRNA sequencing and LC–MS-based metabolomics to evaluate the effects of live yeast on rumen function in beef cattle. **Animals**, 9(1), 28.

Ribeiro Júnior, C. S., Messana, J. D., Granja-Salcedo, Y. T., Canesin, R. C., Fiorentini, G., San Vito, E., ... & Berchielli, T. T. (2016). Parameters of fermentation and rumen microbiota of Nellore steers fed with different proportions of concentrate in fresh sugarcane containing diets. **Archives of Animal Nutrition**, 70(5), 402-415.

Ribeiro, G. O., Gruninger, R. J., Jones, D. R., Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Wang, Y., McAllister, T. A. (2020). Effect of ammonia fiber expansion-treated wheat straw and a recombinant fibrolytic enzyme on rumen microbiota and fermentation parameters, total tract digestibility, and performance of lambs. **Journal of animal science**, 98(5), skaa116.

Roth, M. T. P., Resende, F. D., Oliveira, I. M., Fernandes, R. M., Custódio, L., Siqueira, G. R. (2017). Does supplementation during previous phase influence performance during the growing and finishing phase in Nellore cattle? **Livestock Science**, 204, 122-128.

Saro, C.; Ranilla, M. J.; Carro, M.D. (2012) Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by realtime PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Journal of Animal Science**, v.90, p.4487–4494.

Serafim, J. A., Silveira, R. F., & Vicente, E. F. (2021). Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index Detectors via High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, 14(7), 1387-1393.

Shibao, J., Bastos, D.H.M. (2011) Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, 24(6), 895-904.

Soest, P. V. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of official Agricultural Chemists**, 46(5), 829-835.

Tan, P., Liu, H., Zhao, J., Gu, X., Wei, X., Zhang, X., Ma, X. (2021). Amino acids metabolism by rumen microorganisms: Nutrition and ecology strategies to reduce nitrogen emissions from the inside to the outside. **Science of the Total Environment**, 800, 149596.

Tatarinova, T. V., Lysnyansky, I., Nikolsky, Y. V., & Bolshoy, A. (2016). The mysterious orphans of Mycoplasmataceae. **Biology direct**, 11(1), 1-15.

Valente, T.N.P.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C.; Cunha, M.D.;Queiroz, A.C.; Sampaio, C.B. (2011) In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle 59 feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40(3), 666–675.

Wang, L., Zhang, K., Zhang, C., Feng, Y., Zhang, X., Wang, X., Wu, G. (2019). Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. **Scientific reports**, 9(1), 1-9.

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**, 270, 114684.

Xia, C., Rahman, M. A. U., Yang, H., Shao, T., Qiu, Q., Su, H., & Cao, B. (2018). Effect of increased dietary crude protein levels on production performance, nitrogen utilisation, blood metabolites and ruminal fermentation of Holstein bulls. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 31(10), 1643.

Zang, Y., Silva, L. H. P., Ghelichkhan, M., Miura, M., Whitehouse, N. L., Chizzotti, M. L., Brito, A. F. (2019). Incremental amounts of rumen-protected histidine increase plasma and muscle histidine concentrations and milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **Journal of dairy science**, 102(5), 4138-4154.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Mediana e rango interquartil (IQR) dos Índices de riqueza e diversidade de novilhos Nelore em terminação a pasto suplementados com diferentes fontes de proteína na dieta.

Índices				
Índices	Suplemento			P-valor
	FS	FSP	GM	
Riqueza				
ACE	112,500±17,000	116,000±32,250	114,000±54,500	0,922
Chao1	112,500±17,000	116,000±32,250	114,000±54,500	0,922
Diversidade				
Fisher	14,264±1,671	14,391±3,733	14,393±5,214	0,912
Shannon W	3,678±0,217	3,607±0,141	3,603±0,316	0,717
Simpson	0,955±0,007	0,952±0,003	0,0954±0,011	0,827

FS=fonte proteica farelo de soja; FSP=fonte proteica de farelo de soja protegido; GM= fonte proteica glúten de milho 60; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis pós teste de Dunns.