

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

**RESPOSTAS PRODUTIVAS E METABÓLICAS DE BOVINOS
EM PASTEJO SUPLEMENTADOS COM ISOÁCIDOS E
UREIA**

Bianca Rodrigues Domingos
Zootecnista

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

**RESPOSTAS PRODUTIVAS E METABÓLICAS DE BOVINOS
EM PASTEJO SUPLEMENTADOS COM ISOÁCIDOS E
UREIA**

**Discente: Bianca Rodrigues Domingos
Orientador: Prof. Dr. Flávio Dutra de Resende**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.**

D671r Domingos, Bianca Rodrigues
Respostas produtivas e metabólicas de bovinos em pastejo
suplementados com isoácidos e ureia / Bianca Rodrigues Domingos. --
Jaboticabal, 2025
51 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Flávio Dutra de Resende


1. Ácidos graxos de cadeia ramificada. 2. Aminoácidos de cadeia
ramificada. 3. Isobutirato. 4. Isovalerato. 5. 2-metilbutirato. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS PRODUTIVAS E METABÓLICAS DE BOVINOS EM PASTEJO SUPLEMENTADOS COM ISOÁCIDOS E UREIA

AUTORA: BIANCA RODRIGUES DOMINGOS
ORIENTADOR: FLÁVIO DUTRA DE RESENDE


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

 Documento assinado digitalmente
FLAVIO DUTRA DE RESENDE
Data: 22/10/2025 20:43:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. FLÁVIO DUTRA DE RESENDE (Participação Virtual)
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / APTA ColinaSP

 Documento assinado digitalmente
EDENIO DETMANN
Data: 22/10/2025 16:33:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EDENIO DETMANN (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Viçosa (UFV) - Viçosa/MG

 Documento assinado digitalmente
ROGERIO DE PAULA LANA
Data: 22/10/2025 16:56:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ROGÉRIO DE PAULA LANA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Viçosa (UFV) - Viçosa/MG

Jaboticabal, 22 de Outubro de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bianca Rodrigues Domingos, nascida em 30 de janeiro de 1999 em Belo Horizonte, Minas Gerais. Filha de Gilmar José Domingos e Grace Mônica Rodrigues Domingos, possui graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa – UFV (2017-2022), onde foi bolsista de iniciação científica (2020-2022) sob orientação da Profa. Dra. Luciana Navajas Rennó. Ingressou em 2023 no Mestrado em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista – UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal. Sob orientação do Prof. Dr. Flávio Dutra de Resende, desenvolveu o projeto de pesquisa na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Apta Regional de Colina.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilmar e Grace, pelo amor e apoio incondicionais e por acreditarem plenamente na minha capacidade.

Às minhas irmãs, Barbara e Pabline, pelo amor, apoio e companheirismo de toda a vida.

À minha avó Marlene (*in memoriam*) e à minha bisavó Geralda (*in memoriam*), por serem a força divina que me guia.

À toda minha família – Anderson, Andreia, Antônio, Cauã, Cibele, Cristina, Gabriel, Giovanna, Glauber, João Miguel, Júlia, Kátia, Luiz, Matheus, Paola, Taiana e Tayná – por viverem os meus sonhos comigo. A nossa união é o que dá sentido à vida.

Ao meu namorado Gabriel e à sua família, pelo amor, incentivo e parceria em todos os momentos.

Aos colegas da Apta – Amanda, Anna Lidia, Fernanda Rigon, Fernanda Scheeren, Gilyard, Gustavo Bisio, Gustavo Marinho, Hiam, Igor, Isadora, José Maria, Leandro, Luciana, Mariana, Mateus Abreu, Matheus Rodrigues, Rafael Assunção, Rafael Cantalice e Stéfany – por tornarem os dias mais leves e por toda ajuda na execução da pesquisa.

Aos funcionários da Apta – Adenilson, Antônio Carlos, Chico, Juninho, Lori, Luizão, Luizinho, Marcelo, Marquinhos, Miltinho, Regina, Roberto, Rogério, Sr. Miltão, Sueli, Thaís, Toga, Toinzinho e Verde – pela amizade que levarei para a vida e pela ajuda sempre concedida.

Aos amigos de Colina – Janaine, Felipe, Dona Nice, Leo, Gustavo, Bugaia, Lourdes, Adriano, Dani, Geovane, Rafaela, Inês, Lorena, Suseti, Luiz Felipe, Edilene, Sr. Adilson e Dona Adelize – por terem me acolhido como membro da família. O carinho de vocês tornou todo o processo muito mais feliz.

Aos professores Flávio Dutra e Gustavo Rezende, pela oportunidade de integrar a equipe da Apta Colina e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos professores Edenio Detmann e Rogério Lana, pelo gentil aceite em integrar a banca de defesa.

À Universidade Estadual Paulista (Unesp) e aos docentes, pela relevante contribuição à minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão da bolsa de estudos.

Às empresas Trouw Nutrition e Suprikem, pelo apoio financeiro e pela
contribuição na idealização da pesquisa.

A todos, meu profundo agradecimento!

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

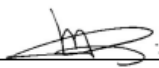
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Utilização de ureia na nutrição de bovinos de corte.....	2
2.2 Degradação ruminal da fibra insolúvel	6
2.3 Papel dos isoácidos na nutrição de ruminantes	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Tratamentos.....	14
3.2 Animais, delineamento experimental e manejo.....	15
3.2.1 Experimento 1	15
3.2.2 Experimento 2	15
3.3 Procedimentos experimentais e coletas de amostras.....	17
3.3.1 Experimento 1	17
3.3.2 Experimento 2	19
3.4 Análises laboratoriais.....	20
3.5 Análises estatísticas	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Desempenho e características de carcaça	22
4.2 Consumo voluntário, digestibilidade e balanço de N	23
4.3 Características ruminais	25
4.4 Características sanguíneas.....	26
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS.....	34

CERTIFICADO Nº 013/2023 – CEUA

Certificamos que o projeto apresentado dia 15 de dezembro de 2023 intitulado “**INCLUSÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA RAMIFICADA EM SUPLEMENTOS NA TERMINAÇÃO DE BOVINOS EM PASTEJO NA ESTAÇÃO CHUVOSA**”, foi registrado com o protocolo nº 013/2023, está sob a responsabilidade do Pesquisador Científico **Dr. Flávio Dutra de Resende** e envolve a produção, a manutenção e a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica e encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de oito de outubro de 2008; do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009; e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo então **APROVADO** pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Apta Regional**, na XXII Reunião Ordinária realizada no dia **18 de dezembro de 2023**.

Finalidade: (X) Pesquisa científica – () Ensino	
Vigência da autorização	15/01/2024 a 15/07/2024
Espécie/linhagem e/ou raça	Nelore
Nº de animais	104
Sexo/Idade/Peso aprox.	Machos/ 30 meses / 400 Kg
Localização/Origem	Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento de Colina
Responsável Técnico	Dr. Gustavo Rezende Siqueira



Maria Izabel Merino de Medeiros
Coordenadora CEUA- APTA REGIONAL



Secretaria de
Agricultura e Abastecimento



SÃO PAULO
GOVERNO DO ESTADO

RESPOSTAS PRODUTIVAS E METABÓLICAS DE BOVINOS EM PASTEJO SUPLEMENTADOS COM ISOÁCIDOS E UREIA

RESUMO - Objetivou-se compreender como isoácidos interagem com o nível de ureia do suplemento e seus efeitos sobre o desempenho, características de carcaça, consumo voluntário, digestibilidade e metabolismo de bovinos Nelore terminados a pasto. O estudo foi dividido em dois experimentos: no Experimento 1, oitenta bovinos Nelore não castrados foram alocados em área de *Urochloa brizantha* cv. Marandu para avaliação do desempenho produtivo e características de carcaça. Os tratamentos foram designados às unidades experimentais (piquetes) segundo delineamento em blocos casualizados, utilizando o peso inicial como fator de blocagem. No Experimento 2, 8 bovinos Nelore castrados e fistulados no rúmen foram alocados em baias individuais e alimentados com feno de *Urochloa brizantha* cv. Marandu para avaliação do consumo voluntário, digestibilidade e respostas metabólicas, em delineamento quadrado latino 4 × 4 completo e duplicado. O estudo foi realizado em esquema fatorial 2 × 2, sendo Fator 1: suplemento com teor de ureia de 3,1% ou 5,7%; e Fator 2: suplemento sem inclusão ou com inclusão de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada (Isomix[®], Suprikem, Limeira, SP, Brasil) na dose de 2,5 g/kg de suplemento. Os suplementos foram fornecidos na quantidade de 3 g/kg de peso corporal. Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,03$) foi observada no peso corporal final (Pf), ganho médio diário (GMD) e peso de carcaça quente (PCQ). Os isoácidos aumentaram o GMD em 100 g/d quando adicionados ao suplemento com alta ureia, resultando em maior Pf e PCQ nesse grupo. O consumo de MS de feno e MS total não foram alterados ($P \geq 0,29$) pelos tratamentos. Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,09$) foi observada na digestibilidade da FDN, com maior digestibilidade quando isoácidos foram adicionados no suplemento com alta ureia, em comparação à adição no suplemento com baixa ureia. Não foi observado efeito de tratamento na excreção fecal e urinária de N e na retenção de N ($P > 0,10$). A concentração de AGV, pH e proporção molar de acetato não foram diferentes entre os tratamentos ($P \geq 0,12$), e interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,02$) foi observada na concentração de nitrogênio amoniacal ruminal. Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,04$) foi observada na concentração de nitrogênio ureico no soro. Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,10$) foi observada na concentração plasmática de aminoácidos totais, aminoácidos não essenciais, histidina, treonina, aspartato, glutamato, prolina + asparagina, serina, ornitina e citrulina. Em todos os casos, a concentração foi aumentada com adição de isoácidos no suplemento com alta ureia, mas permaneceu inalterada com a adição no suplemento com baixa ureia. Efeito de inclusão de isoácidos ($P < 0,04$) foi observado na alanina, com aumento na concentração com a adição de isoácidos. O desempenho produtivo superior observado quando isoácidos são incluídos em suplemento com alta ureia pode ser atribuído à melhora do *status* de N e do estado anabólico geral no metabolismo animal, observados pela maior concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, nitrogênio ureico no soro e aminoácidos plasmáticos, ao mesmo tempo em que a excreção de N na urina não foi aumentada. As respostas produtivas e metabólicas ao fornecimento de isoácidos para bovinos alimentados com gramíneas tropicais são dependentes do nível de ureia do suplemento, de modo que benefícios no desempenho são observados somente com maior nível de ureia. Ademais, a suplementação com isoácidos em baixa dose apresenta potencial para aumentar o aproveitamento da fibra

e melhora o estado anabólico geral dos animais, efeitos também condicionados à composição do suplemento.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia ramificada, aminoácidos de cadeia ramificada, isobutirato, isovalerato, 2-metilbutirato

PRODUCTIVE AND METABOLIC RESPONSES OF GRAZING CATTLE SUPPLEMENTED WITH ISOACIDS AND UREA

ABSTRACT – This study aimed to evaluate how isoacids interact with the urea content of the supplement and their effects on performance, carcass traits, voluntary intake, digestibility, and metabolism of Nellore cattle finished on pasture. The study was divided into two experiments. In Experiment 1, eighty non-castrated Nellore bulls were allocated to *Urochloa brizantha* cv. Marandu paddocks for the evaluation of productive performance and carcass traits. Treatments were assigned to experimental units (paddocks) in a randomized block design, using initial body weight as the blocking factor. In Experiment 2, eight rumen-fistulated, castrated Nellore steers were allocated to individual pens and fed *Urochloa brizantha* cv. Marandu hay to evaluate voluntary intake, digestibility, and metabolic responses, in a duplicated 4 × 4 Latin square design. The study followed a 2 × 2 factorial arrangement, with Factor 1: supplement containing 3.1% or 5.7% urea; and Factor 2: supplement without or with inclusion of an additive composed of branched-chain fatty acid salts (Isomix[®], Suprikem, Limeira, SP, Brazil) at 2.5 g/kg of supplement. Supplements were provided at 3 g/kg of body weight. An interaction between urea level and isoacids inclusion ($P < 0.03$) was detected for final body weight, average daily gain (ADG), and hot carcass weight. The inclusion of isoacids increased ADG by 100 g/d when added to the high-urea supplement, resulting in greater final weight and carcass weight in this group. Hay DMI and total DMI were not affected ($P \geq 0.29$). An interaction between urea level and isoacids inclusion ($P < 0.09$) was observed for NDF digestibility, with higher digestibility when isoacids were added to the high-urea supplement, compared to the low-urea supplement. No treatment effect was observed on fecal and urinary N excretion and N retention ($P > 0.10$). Total VFA concentration, ruminal pH, and molar proportion of acetate did not differ among treatments ($P \geq 0.12$). An interaction between urea level and isoacids inclusion ($P < 0.02$) was observed for ruminal ammonia–N concentration. An interaction between urea level and isoacids inclusion ($P < 0.04$) was observed for serum urea–N concentration. An interaction ($P < 0.10$) was also observed for plasma concentrations of total amino acids, non-essential amino acids, histidine, threonine, aspartate, glutamate, proline + asparagine, serine, ornithine, and citrulline. In all cases, concentrations increased when isoacids were added to the high-urea supplement, but remained unchanged in the low-urea supplement. The inclusion effect of isoacids ($P < 0.04$) was detected for alanine. The superior productive performance observed when isoacids were included in the high-urea supplement may be attributed to improvements in N status and the overall anabolic state of the animals, as indicated by greater ruminal ammonia–N, serum urea–N, and plasma amino acid concentrations, while urinary N excretion remained unchanged. Productive and metabolic responses to isoacid supplementation in cattle fed tropical grasses depend on the urea level in the supplement, with performance benefits observed only at higher urea concentrations. Moreover, low-dose isoacid supplementation has the potential to improve fiber utilization and enhance the overall anabolic status of the animals, effects that are also influenced by supplement composition.

Keywords: branched-chain fatty acids, branched-chain amino acids, isobutyrate, isovalerate, 2-methylbutyrate

1. INTRODUÇÃO

A adoção de programas de suplementação em sistemas de produção de bovinos em pastejo objetiva a correção das restrições nutricionais apresentadas pelas gramíneas tropicais, otimizando o uso da forragem e o desempenho animal (Detmann et al., 2014). O maior aproveitamento do recurso nutricional basal também está atrelado ao aumento da eficiência dos processos fermentativos ruminais. Para isso, é fundamental assegurar o suprimento adequado de compostos essenciais ao crescimento e à atividade dos microrganismos ruminais.

Os ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR) isobutirato (IB), isovalerato (IV) e 2-metilbutirato (2MB) são fatores de crescimento essenciais a várias espécies de bactérias ruminais, sobretudo às fibrolíticas (Firkins et al., 2024). Também chamados de isoácidos, os AGVCR são produzidos no rúmen a partir da fermentação dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) valina, leucina e isoleucina. Ao serem absorvidos pelas bactérias, os isoácidos são reconvertidos em seus AACR correspondentes (Andries et al., 1987).

Em determinadas condições alimentares, como dietas com baixo teor de proteína verdadeira degradável no rúmen ou elevado teor de nitrogênio não proteico (NNP), a fermentação ruminal de AACR pode ser insuficiente para a produção de isoácidos, limitando o crescimento e atividade de bactérias fibrolíticas (Tedeschi et al., 2000). Nesse contexto, o fornecimento de isoácidos como aditivo alimentar se torna estratégia promissora para otimizar o funcionamento ruminal.

Diversos estudos indicam que a suplementação com isoácidos eleva a digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e a síntese de proteína microbiana. Esses efeitos resultam em melhorias no desempenho animal, como o aumento do ganho médio diário (GMD) e da produção de leite e seus componentes (Liu et al., 2009a; Wang et al., 2015; Redoy et al., 2025). Contudo, ainda existem lacunas quanto às respostas de bovinos ao fornecimento de isoácidos quando alimentados com gramíneas tropicais, bem como a relação dessas respostas com a composição do suplemento.

Assim, o objetivo foi compreender como isoácidos interagem com o nível de ureia do suplemento e seus efeitos sobre o desempenho, características de carcaça,

consumo voluntário, digestibilidade e metabolismo de bovinos Nelore terminados a pasto.

Considerando que o maior nível de ureia no suplemento acarreta maior limitação de isoácidos no rúmen, hipotetizou-se que a inclusão de isoácidos em suplemento com alto nível de ureia aumenta a digestibilidade da fibra e altera o metabolismo animal, com conseqüente aumento do ganho de peso e melhora das características de carcaça de bovinos terminados a pasto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Utilização de ureia na nutrição de bovinos de corte

A suplementação é ferramenta fundamental na otimização do uso do recurso nutricional basal em sistemas de produção a pasto. Com ela, em primeiro momento, é possível corrigir limitações nutricionais apresentadas pelas gramíneas tropicais. A depender da meta produtiva estabelecida, o suplemento também pode ser meio direto de fornecimento de nutrientes, permitindo o alcance de taxas de ganho de peso superiores (Detmann et al., 2010). Na fase de terminação, a suplementação diminui o tempo necessário para atingir o peso de abate, reduzindo a permanência do animal na propriedade, além de ser meio de produção de carcaças mais pesadas e com nível de acabamento superior, condições exigidas pelos frigoríficos e mercado consumidor (Reis et al., 2012).

A ureia é um importante ingrediente em suplementos para ruminantes. Fonte de NNP, seus efeitos e fatores que influenciam sua utilização são discutidos desde a década de 1950 (Reid, 1953), apesar de seu uso na nutrição ser reportado em pesquisas publicadas 50 anos antes, em uma época em que sua capacidade de substituir a proteína verdadeira da dieta ainda era questionada.

Ao adentrar o rúmen, a ureia é rapidamente hidrolisada por bactérias ruminais em 2 moléculas de amônio e CO₂. Em condições de pH ruminal fisiológico, a amônia estará presente predominantemente em sua forma protonada, ou seja, na forma do íon amônio (Huntington e Archibeque, 1999). Por questões de simplificação, a

denominação amônia será usada no texto na maior parte do tempo, mesmo em momentos em que ela estaria no rúmen em sua forma protonada. Além do nitrogênio (N) vindo da ureia, parte da proteína verdadeira dietética que adentra o rúmen também é transformada em amônia pelo catabolismo de aminoácidos (Tan e Murphy, 2004).

No rúmen, a amônia constitui a fonte preferencial de N para as bactérias que degradam fibra, uma vez que essas apresentam atividade limitada de sistemas de transporte de aminoácidos (Allison, 1969). O excesso de proteína degradável no rúmen faz com que a concentração de amônia exceda a capacidade de assimilação pelos microrganismos (Tan e Murphy, 2004). Nessa situação, a amônia deixa o rúmen por difusão passiva, sendo destinada à circulação porta-hepática e ao fígado. Antes de passar pelas células epiteliais ruminais, amônio é convertido em amônia, assumindo novamente a forma ionizada após a difusão. Parte da amônia também pode deixar o rúmen com a digesta e ser absorvida no intestino delgado (Huntington e Archibeque, 1999; Kozloski, 2021).

Ao chegar no fígado, a amônia entra no Ciclo da Ornitina (Figura 1), também chamado de Ciclo da Ureia. No interior da mitocôndria do hepatócito, a primeira etapa do ciclo se dá com a formação do carbamoil-fosfato pela junção de amônio e bicarbonato. Carbamoil-fosfato é condensado à ornitina, formando citrulina, que deixa a mitocôndria com destino ao citosol das células hepáticas. A citrulina se junta ao aspartato, originando argininosuccinato, que é então transformado em arginina e fumarato. Por fim, a quebra da molécula de arginina, com incorporação de uma molécula de água, gera ureia e ornitina, que retorna à mitocôndria para dar continuidade ao ciclo (Kozloski, 2021). A ureia adentra a corrente sanguínea e pode retornar ao trato gastrointestinal (TGI) por difusão pelo epitélio ruminal, pela saliva, ou ser excretada na urina.

A reciclagem da ureia é um importante mecanismo de suprimento de N para a microbiota ruminal, permitindo a manutenção da viabilidade dos microrganismos mesmo em condições dietéticas restritas. A reutilização da amônia que escapa do rúmen e é absorvida no intestino é possível em decorrência desse processo (Huntington e Archibeque, 1999; Reynolds e Kristensen, 2008; Nichols et al., 2022). A fração não reciclada da ureia é eliminada via urina, e a excreção intensiva de N na urina é frequentemente associada a problemas ambientais. Porém, é importante

ressaltar que a síntese acentuada de ureia também acarreta consequências metabólicas ao animal. O Ciclo do Ácido Cítrico, conhecido também por Ciclo de Krebs, tem íntima relação metabólica com o Ciclo da Ornitina.

Como relatado anteriormente, no Ciclo da Ornitina, argininosuccinato é transformado em arginina e fumarato. O fumarato liberado no citosol do hepatócito é um intermediário do Ciclo do Ácido Cítrico (Figura 1). Este é transformado em malato e volta para a mitocôndria, onde é convertido em oxaloacetato, podendo dar início a uma nova volta do ciclo. Entretanto, o oxaloacetato também pode ser desviado para a síntese de ureia, pois sua junção com glutamato forma α -cetogluturato e aspartato, que é enviado para o citosol. O aspartato é um intermediário essencial no Ciclo da Ornitina, pois é provedor de um dos dois grupos amino que compõe a molécula de ureia. Assim, um dos grandes problemas do aumento excessivo da síntese de ureia é o desvio dos intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico, o que compromete o metabolismo energético no fígado e a produção de ATP (Shambaugh, 1977; Pesi et al., 2018; Kozloski, 2021).

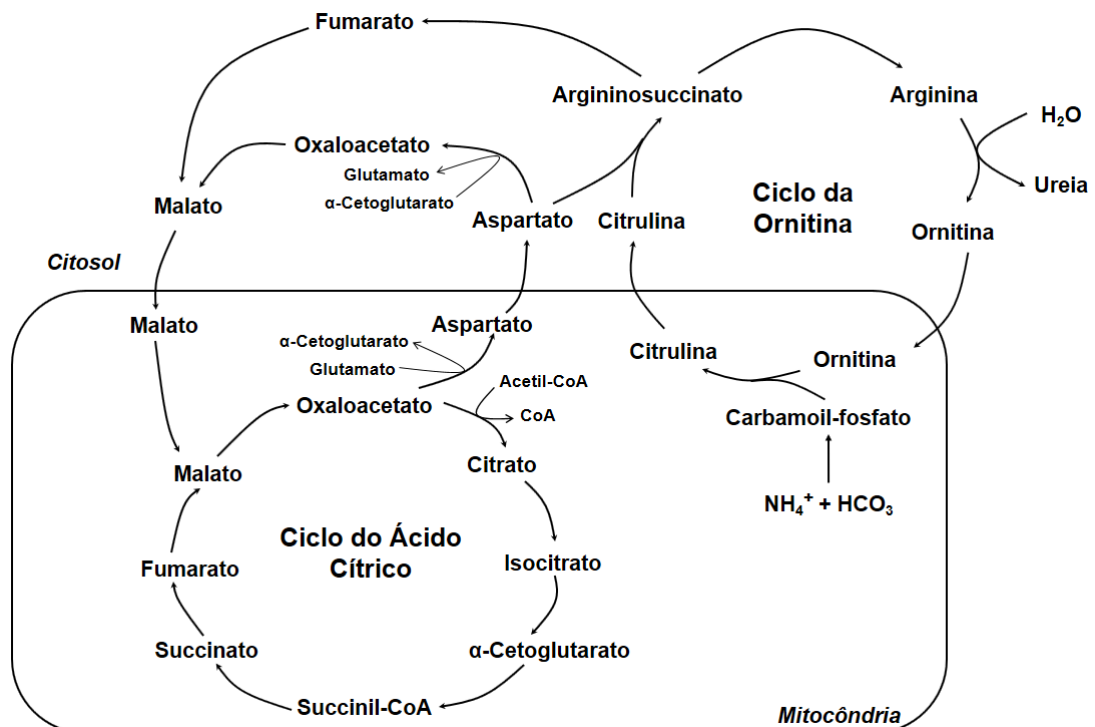


Figura 1. Interconexão entre o Ciclo da Ornitina e o Ciclo do Ácido Cítrico. Adaptado de Nelson e Cox, 2014.

O teor de ureia em suplementos foi objeto de estudo para compreender possíveis efeitos contraproducentes em altas inclusões. Moraes et al. (2009) avaliaram diferentes níveis de ureia em substituição ao farelo de algodão em suplemento proteico-energético. O consumo de matéria seca (CMS) e digestibilidade ruminal da FDN foram aumentados com inclusão de até 2,4% de ureia na matéria natural, mas reduziram com nível de 3,6%.

Esses resultados indicam que é preciso ter atenção ao utilizar níveis superiores de ureia, haja vista que a substituição da proteína verdadeira por NNP pode ocasionar deficiência de aminoácidos, peptídeos e outros compostos necessários ao crescimento microbiano no rúmen, como AGVCR. Além disso, o aumento linear da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR), N sérico e N urinário observados no estudo com o aumento do nível de ureia, evidencia que o excesso de amônia no rúmen diminui o aproveitamento do N dietético por sua maior excreção.

Nesse sentido, a definição de uma relação ideal entre proteína verdadeira e NNP em suplementos é importante para evitar impactos negativos no desempenho animal. Utilizando gramínea tropical de baixa qualidade como substrato em estudo *in vitro*, Detmann et al. (2011) relataram que a proporção de 2/3 da proteína bruta (PB) na forma de ureia aumentou a taxa de degradação da FDN, a concentração de NAR e a eficiência microbiana. Em estudo *in vivo* que utilizou pasto com aproximadamente 10% de PB, o maior valor de digestibilidade da FDN foi observado também com 2/3 da PB na forma de ureia. Entretanto, maior consumo de N, concentração de NAR e fluxo intestinal de N microbiano, e menor excreção urinária de N foram observados com 1/3 de ureia, resultando em balanço de N superior. Esses resultados sugerem que, quando os animais consomem pasto de média a alta qualidade, a proporção de 1/3 da PB na forma de ureia seja mais adequada (Costa et al., 2011).

Fernandes et al. (2016) observaram que a proporção de ureia pode afetar o consumo de suplemento, a depender da qualidade do pasto. Suplementos que continham 1/2 e 2/3 da PB na forma de ureia foram menos consumidos à medida que a rebrota do pasto ocorria. A combinação do alto teor de proteína solúvel presente em folhas recém-emitidas com o rápido aumento da amônia ruminal proveniente de suplementos com alto NNP, causa desbalanço metabólico devido à concentração excessiva de amônia no organismo. Esse cenário resulta em desconforto animal,

aumento do incremento calórico e comprometimento do metabolismo energético hepático (Poppi e McLennan, 1995; Detmann et al., 2007, 2009). Assim, é primordial que a ureia seja utilizada no suplemento em proporção adequada, evitando possíveis efeitos desfavoráveis ao desempenho animal.

2.2 Degradação ruminal da fibra insolúvel

Os ruminantes evoluíram com a capacidade de extrair energia de alimentos fibrosos e utilizar nitrogênio de fontes não proteicas para produzir proteína de alto valor biológico. Essa condição só é possível pela manutenção de ampla comunidade de microrganismos simbiotes nos compartimentos do estômago que realizam digestão e fermentação dos alimentos ingeridos, fornecendo ao hospedeiro proteína microbiana e energia na forma de AGV (Weimer, 2022; Detmann, 2023).

Do ponto de vista de nutrição de ruminantes, a fibra pode ser definida como como a fração do alimento que é indigestível ou de lenta digestão e que ocupa espaço no TGI dos animais (Hintz et al., 1996). A parede celular vegetal é a principal fonte de fibra na alimentação de bovinos. Celulose, hemicelulose e lignina, além da pectina concentrada na região da lamela média, são seus principais componentes, e os mais importantes do ponto de vista nutricional. O arranjo e composição da parede celular difere entre espécies e estádios fisiológicos de plantas, o que impacta na capacidade dos microrganismos de terem acesso aos substratos. Além disso, os polímeros têm características físicas e químicas distintas que determinam como esses interagem com o TGI do hospedeiro (Wilson, 1993; Detmann, 2023).

Considerando que o rúmen apresenta pH próximo a 7,0, a celulose, hemicelulose e lignina permanecem insolúveis neste ambiente, característica que lhes confere a capacidade de exercer os efeitos de fibra para o animal. Por outro lado, devido às características químicas, a pectina é passível de ser solubilizada no rúmen, não tendo capacidade de exercer os efeitos físicos de fibra no TGI (Detmann, 2023).

A parede celular vegetal é o maior reservatório de energia química na biosfera. Pensando em nutrição de bovinos de corte, produzidos no Brasil predominantemente em sistemas a pasto, diferenças na extensão da degradação da fibra contribuem

grandemente para as diferenças no valor nutricional das dietas (Weimer, 2022). Por isso, o estudo desses processos e de como podem ser melhorados é ponto chave para otimizar o uso do recurso basal e, conseqüentemente, aumentar o desempenho animal.

A degradação ruminal da fibra é realizada por bactérias, protozoários e fungos. As bactérias desempenham papel central nesse processo, pois são encontradas no rúmen em maior quantidade e possuem grande diversidade metabólica (Cheng et al., 1991). No entanto, é importante ressaltar que ocorrem complexas interações entre os diferentes tipos de microrganismos ruminais, não podendo ser excluída a influência destes na degradação. A partir das técnicas e equipamentos desenvolvidos por Hungate (1944), se tornou possível o cultivo de bactérias anaeróbias *in vitro*. Assim, foram isoladas as espécies de bactérias *Fibrobacter* (antes chamada de *Bacteroides*) *succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, consideradas as mais relevantes espécies fibrolíticas no rúmen. Estudos mostram que essas espécies podem ser encontradas quase universalmente nos ruminantes (Weimer, 2022).

Estas bactérias são denominadas fibrolíticas primárias, e têm características comuns entre si e que as diferenciam de outras espécies de bactérias ruminais. Possuem grande especialização, ou seja, utilizam substancialmente fibra insolúvel e produtos de sua hidrólise como substrato para crescimento. Em contraste, bactérias fibrolíticas secundárias ou não fibrolíticas têm capacidade de utilizar mono e dissacarídeos variados para se multiplicarem. É relatado que algumas cepas de *R. albus* tenham capacidade de utilizar arabinose e xilose, que são produtos da hidrólise da hemicelulose, e que *F. succinogenes* e *R. flavefaciens* sejam capazes de digerir hemicelulose, apesar de não conseguirem fermentar seus açúcares (Thurston et al., 1994; Hungate, 1996; Firkins, 2023).

Ainda, destaca-se que as bactérias fibrolíticas primárias têm necessidade de adesão às partículas de alimento, característica associada a vantagens competitivas pois bactérias aderidas têm acesso preferencial aos produtos da hidrólise. A colonização deve ocorrer rapidamente, visto que há competição com bactérias não fibrolíticas pela adesão inicial, e que essas estão presentes no rúmen em quantidade maior que as fibrolíticas mesmo em dietas ricas em fibra (Russell, 2002; Firkins et al., 2024). Adicionalmente, a efetividade das enzimas microbianas se torna maior com a

adesão pela concentração no substrato. Se fossem liberadas no fluido ruminal, as enzimas poderiam sofrer ação de proteases antes de atingir o alimento (Weimer, 1996).

Nas espécies de *Ruminococcus*, a adesão bacteriana à fibra ocorre principalmente por intermédio de estruturas denominadas celulosomos, que são sistemas multienzimáticos complexos ancorados à parede celular das bactérias e que se ligam ao substrato (Lynd et al., 2002; Andrade, 2017). Não existem evidências de que *F. succinogenes* produza celulosomos. Contudo, estudos sugerem que proteínas do domínio fibro-slime desempenhem papel importante na adesão dessa bactéria à fibra, apesar dos mecanismos ainda não serem bem esclarecidos (Toyoda et al., 2009; Burnet et al., 2015).

A resultante do processo de digestão extracelular são moléculas simples com tamanho suficiente para serem absorvidas e metabolizadas pelos microrganismos. Os produtos da hidrólise são fermentados para produção de ATP, que são usados para funções de manutenção ou crescimento bacteriano. A oxidação dos açúcares é realizada de maneira incompleta pelos microrganismos devido à ausência de oxigênio no rúmen, tendo como resultado a liberação dos AGV. Esse processo é fundamental para o hospedeiro, uma vez que os AGV constituem a fonte primária de energia no metabolismo de ruminantes.

Os principais produtos da digestão da celulose são celobiose (duas moléculas de glicose ligadas por ligação β -1,4) e glicose. Esses açúcares entram nas células microbianas e são direcionados para oxidação na Via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), onde cada molécula de glicose é transformada em duas moléculas de piruvato. Em condição ruminal fisiológica, o piruvato é transformado principalmente em acetato, propionato e butirato.

A hemicelulose é composta por diferentes combinações de açúcares e tipos de ligações químicas, o que torna sua estrutura amorfa. Essa heterogeneidade estrutural confere à hemicelulose um padrão de degradação distinto ao da celulose, fazendo com que ela seja digerida e fermentada por bactérias nutricionalmente versáteis, como *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Prevotella* spp., e por fungos (Weimer, 2022).

Na hidrólise da hemicelulose, além de hexoses, são produzidos açúcares de 5 carbonos denominados pentoses. Ao adentrar as bactérias, as pentoses são oxidadas

principalmente pela Via das Pentoses Fosfato (PPP). Três pentoses darão origem à duas hexoses e uma triose, que seguirão para oxidação na Via EMP, também formando piruvatos e AGV (Russell, 2002; Kozloski, 2021).

A lignina não pode ser degradada no rúmen em decorrência da ausência de oxigênio. Além disso, sua presença na parede celular reduz a degradação da celulose e hemicelulose, seja por formar fortes ligações químicas com esses polímeros e/ou por criar uma barreira física que impede o acesso das enzimas microbianas ao substrato (Moore e Jung, 2001; Detmann, 2023). Assim, a fração da fibra que é potencialmente degradável no rúmen está relacionada com o conteúdo de lignina da parede celular (Gomes et al., 2011).

Para que o processo de digestão e fermentação ruminal ocorra de maneira otimizada, é fundamental que o ambiente ruminal contenha os compostos essenciais demandados pelos microrganismos para sua multiplicação, como o N na forma de amônia e AGVCR requeridos por bactérias fibrolíticas.

2.3 Papel dos isoácidos na nutrição de ruminantes

O termo isoácidos é usado para chamar coletivamente IB, IV e 2MB, que são os AGVCR. A descoberta de sua importância e investigação de como atuam no ambiente ruminal se iniciou na década de 1950. Estudo de Hungate (1950) relatou que fatores de crescimento ainda desconhecidos eram requeridos por *F. succinogenes* e não encontrados em totalidade nos alimentos consumidos pelos animais, apesar de serem, em parte, produzidos por outros microrganismos ruminais.

Ao pesquisarem esses fatores em culturas de bactérias, Bryant e Doetsch (1955) identificaram que se tratava de AGVCR. Esses são naturalmente produzidos no rúmen a partir da desaminação e descarboxilação oxidativa dos AACR valina, leucina e isoleucina, dando origem a IB, IV e 2MB, respectivamente (Figura 2).

A necessidade de isoácidos por bactérias fibrolíticas primárias advém do fato dessas terem capacidade reduzida de utilização de aminoácidos exógenos, além de não conseguirem sintetizar AACR a partir dos precursores comumente utilizados por outras bactérias. Estudos relatam atividade de vias de biossíntese de AACR mesmo

quando o meio de cultura continha proteína verdadeira hidrolisada, demonstrando possível ineficiência no sistema de transporte de aminoácidos. Ademais, é descrito que *R. flavefaciens* tem limitação na síntese da fração isopropílica que é encontrada nesses aminoácidos (Allison et al. 1962; Allison e Bryant, 1963).

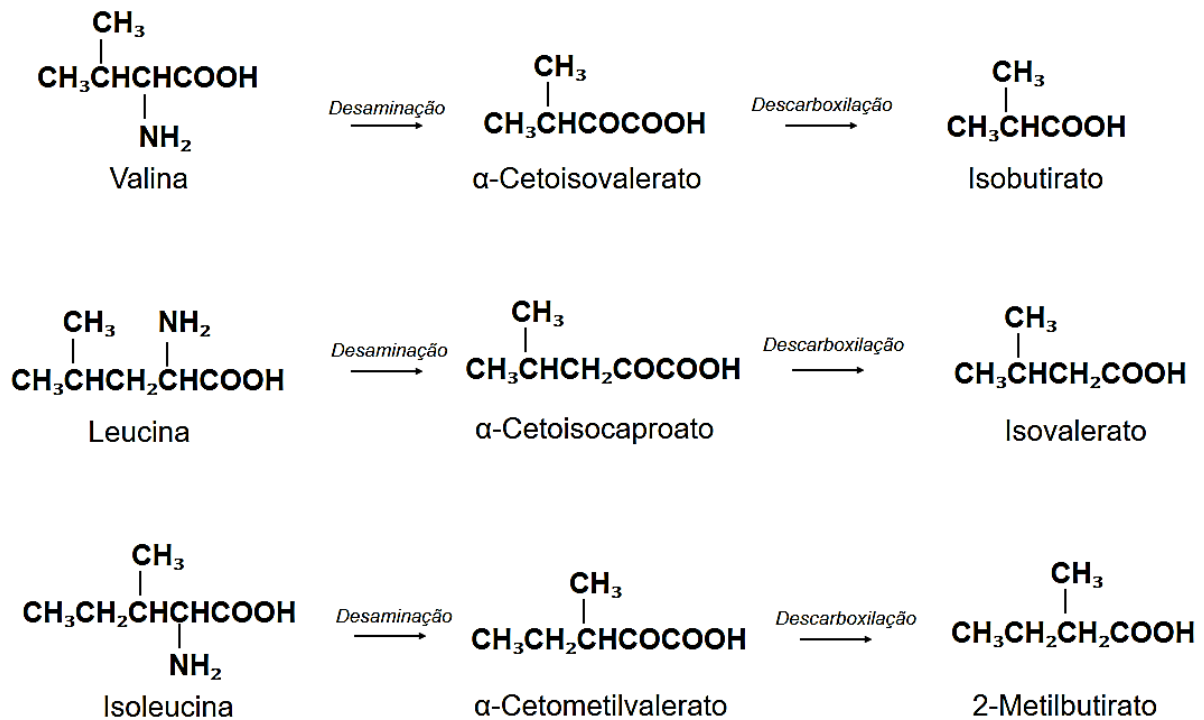


Figura 2. Transformação de AACR em AGVCR por bactérias ruminais não fibrolíticas. Adaptado de Kozloski (2021) e Firkins et al. (2024).

No interior de bactérias que têm capacidade de hidrolisar proteína e fermentar aminoácidos, os AACR sofrem ação da enzima aminotransferase de cadeia ramificada e são convertidos em cetoácidos de cadeia ramificada (CACR; Figura 3). Em bactérias entéricas, é descrito que a enzima cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada junto com dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD^+) seriam responsáveis por converter o cetoácido em AGVCR-CoA. No entanto, em bactérias ruminais, é mais provável que a cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada atue associada à ferredoxina para a transferência de elétrons, permitindo a produção de ATP (Allison et al., 1984; Roman-Garcia et al., 2021b). Atrelado a esse processo há liberação de H_2 , que pode ser transferido entre espécies microbianas para a produção de metano, ou, em caso de uso de supressores de metanogênese na dieta, ser destinado a

compostos reduzidos como o propionato (Beauchemin et al., 2020). Hino e Russell (1985) relataram que a inibição da formação de metano impediu a síntese de AGVCR. Por fim, o AGVCR-CoA sofre ação de uma CoA-transferase, formando AGVCR (Firkins et al., 2024).

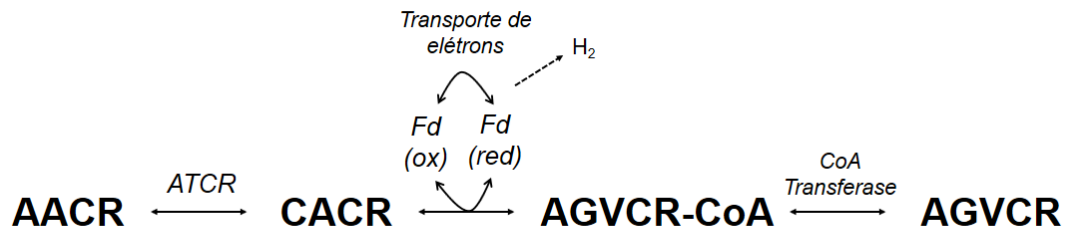


Figura 3. Mecanismo provável de transformação de AACR em AGVCR por bactérias ruminais não fibrolíticas. AACR = aminoácido de cadeia ramificada; CACR = cetoácido de cadeia ramificada; AGVCR = ácido graxo volátil de cadeia ramificada; ATCR = aminotransferase de cadeia ramificada; Fd = ferredoxina que é oxidada (ox) ou reduzida (red). Adaptado de Firkins et al. (2024).

Ao serem disponibilizados no ambiente ruminal e absorvidos pelas bactérias degradadoras de fibra, os isoácidos podem ter dois destinos: ou são reconvertidos nos AACR correspondentes e destinados à síntese proteica ou sofrem alongamento da cadeia carbônica. Para a transformação dos AGVCR em AACR, estes devem receber um grupamento amino e um carbono, ou seja, processo inverso do que origina os isoácidos.

O alongamento da cadeia carbônica forma ácidos graxos de cadeia ramificada que não são voláteis, encontrados em fosfolípídeos da membrana bacteriana com importante papel no controle de sua fluidez. Apesar de não ser totalmente elucidada a maneira como esse controle ocorre, sabe-se que bactérias anaeróbias precisam manter uma proporção entre ácidos graxos de cadeia reta e de cadeia ramificada em sua membrana para que ela tenha capacidade de se manter íntegra frente às diferentes condições do ambiente ruminal (Mitchell et al., 2023a; Firkins et al., 2024).

Muitos estudos relatam os efeitos do fornecimento de isoácidos como aditivo alimentar na dieta de animais ruminantes. A digestibilidade da FDN foi aumentada em 8,8 pontos percentuais com adição de AGVCR e valerato em estudo *in vitro* com culturas em lote, em meio de cultura contendo feno de capim-orchard e milho moído

na proporção 1:1. Contudo, quando feno de alfafa substituiu o de capim como substrato, nenhum incremento na digestibilidade da fibra foi observado (Roman-Garcia et al., 2021a). Possivelmente, a proteína contida na alfafa adicionou AACR suficientes no meio para serem precursores de AGVCR e suprirem a necessidade bacteriana por isoácidos. Isso não é comumente observado com o uso de gramíneas, visto que essas geralmente têm menor teor de PB.

Jiang et al. (2023), em estudo *in vivo* com iaques confinados, relataram que a adição de aproximadamente 2 g/d de isoácidos na dieta não somente aumentou a digestibilidade da FDN em 7,4 pontos percentuais, como também aumentou o desempenho em 230 g/d e o CMS. Todavia, diferenças não foram encontradas na concentração e proporção molar de AGV, concentração de NAR e produção de proteína microbiana, indicando que isoácidos podem gerar efeitos além da modificação da fermentação ruminal.

Roman-Garcia et al. (2021a) também avaliaram os impactos da adição dos isoácidos em conjunto ou combinados dois a dois. As melhores respostas na degradabilidade da FDN, independentemente do substrato usado como meio de cultura, foram encontradas com os três AGVCR em conjunto e com as combinações de IB + 2MB e IV + 2MB. Esses resultados sugerem que IB e IV poderiam se substituir no ambiente ruminal, mas deveriam sempre ser equilibrados com 2MB. No entanto, Mitchell et al. (2023b) contrariaram essa teoria ao mostrar que o IV não foi capaz de suprir o papel do IB em vacas lactantes. Considerando que a proteína do milho é rica em leucina, que é o aminoácido precursor de IV, podemos assumir que em dietas ricas em milho não há necessidade de suplementação de IV, com foco residindo sobre o fornecimento de IB e 2MB.

Em consonância com as descobertas dos trabalhos supracitados, Redoy et al. (2025) forneceram IB + 2MB para vacas em lactação recebendo dietas com alta e baixa forragem, sendo 21 e 17% de FDN de forragem, respectivamente. Os efeitos dos isoácidos na dieta com alta forragem consistiram no incremento de 12,5 pontos percentuais na digestibilidade da FDN e aumento de 7% da produção de leite, além de maior produção dos componentes do leite. Já em dieta com baixa forragem, houve aumento de 400 g/d no GMD das vacas, indicando uma possível mudança na partição de energia nesses animais, com favorecimento da deposição de tecidos. Esses dados

reforçam como o teor de fibra da dieta pode ser fator determinante no sucesso da suplementação com isoácidos, haja vista que o foco primário é o favorecimento de bactérias fibrolíticas. Além disso, ressalta os possíveis efeitos dos isoácidos no metabolismo intermediário, com aumento da deposição muscular.

Estudos foram conduzidos para compreender as respostas do fornecimento de cada AGVCR para novilhos. Diferentemente do observado em vacas lactantes, resultados positivos foram encontrados com todos os três AGVCR fornecidos separadamente. Utilizando novilhos Simental Chinês, Liu et al. (2009a) adicionaram IV na dieta composta por palha de milho e concentrado na proporção 60:40. A digestibilidade da FDN foi aumentada, juntamente com a concentração de AGV e proporção de acetato. Menor concentração de NAR e maior excreção de derivados de purina evidenciam que o IV promoveu maior assimilação de N no rúmen e síntese de proteína microbiana.

Wang et al. (2015) desenvolveram trabalho similar, mas com o fornecimento de IB. Foi relatado que novilhos que receberam o AGVCR possuíram maior população de bactérias que degradam celulose e hemicelulose, acompanhado de maior atividade das enzimas que digerem esses polímeros. Em relação ao 2MB, sua suplementação promoveu aumento da população de bactérias fibrolíticas e amilolíticas, resultando em maior taxa de degradação da matéria seca (MS) e FDN da palha de milho, além de maior síntese de proteína microbiana (Wang et al., 2018).

Os dados indicam que não somente o teor de fibra da dieta deve ser considerado, mas também sua qualidade. Nos estudos supracitados, embora quase metade da dieta fosse composta por concentrado, a fibra proveniente da palha de milho apresentava baixa qualidade. Nessas condições, mesmo a suplementação com cada AGVCR individualmente favoreceu a multiplicação e atividade das bactérias ruminais, impactando positivamente o desempenho animal.

Os resultados de aumento da população de bactérias e enzimas fibrolíticas com o fornecimento de isoácidos são de suma importância quando consideramos que o aumento da digestibilidade da FDN está intimamente relacionado com o aumento do consumo voluntário, produção de N microbiano, matéria orgânica digerida e ganho de peso de bovinos consumindo dieta a base de forragem tropical (Detmann et al., 2024).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de manejo e coletas realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Apta Regional, protocolo nº 013/2023.

O estudo foi realizado na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (Apta) Regional de Colina, SP, dividido em dois experimentos. No Experimento 1, que compreendeu o período entre novembro de 2023 e maio de 2024, foram realizadas avaliações de desempenho produtivo e características de carcaça. No Experimento 2, que aconteceu de abril a julho de 2024, foram avaliados consumo voluntário, digestibilidade e respostas metabólicas. Os mesmos tratamentos foram aplicados em ambos os experimentos.

3.1 Tratamentos

O estudo foi realizado de acordo com esquema fatorial 2×2 , sendo Fator 1: suplemento com teor de ureia de 3,1% (Baixa ureia) ou 5,7% (Alta ureia); e Fator 2: suplemento sem inclusão (Sem) ou com inclusão (Com) de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada (Isomix[®], Suprikem, Limeira, SP, Brasil). Sendo assim, os tratamentos avaliados foram:

1. Baixa ureia Sem: suplemento com 3,1% de ureia sem inclusão de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada;
2. Baixa ureia Com: suplemento com 3,1% de ureia com a inclusão de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada;
3. Alta ureia Sem: suplemento com 5,7% de ureia sem a inclusão de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada;
4. Alta ureia Com: suplemento com 5,7% de ureia com a inclusão de aditivo composto por sais de ácidos graxos de cadeia ramificada.

Os suplementos (Tabela 1) foram fornecidos na quantidade de 3 g/kg de peso corporal (PC), para atender aproximadamente 40% da exigência de PB de um animal

com 390 kg e GMD de 800 g/d, de acordo com o sistema BR-CORTE (Valadares Filho et al., 2023). A dose do aditivo utilizada foi de 2,5 g/kg de suplemento, segundo recomendação do fabricante.

3.2 Animais, delineamento experimental e manejo

3.2.1 Experimento 1

Foram utilizados oitenta bovinos Nelore não castrados, com PC inicial de 378 \pm 37 kg no experimento de avaliação do desempenho e características de carcaça, que teve duração de 162 dias. Estes foram alocados em área experimental composta por *Urochloa brizantha* cv. Marandu, dividida em 16 piquetes de 1,8 hectares, com cochos cobertos e bebedouros. Os suplementos foram fornecidos diariamente às 08:00.

Os tratamentos foram designados às unidades experimentais (piquetes) segundo delineamento em blocos casualizados, utilizando o PC inicial como fator de blocagem. Ao início do experimento, todos os animais foram vermifugados para controle de endo e ectoparasitas.

3.2.2 Experimento 2

Foram utilizados 8 bovinos Nelore castrados e fistulados no rúmen, com PC inicial de 477 \pm 32 kg no experimento de avaliação do consumo voluntário, digestibilidade e respostas metabólicas. Estes foram alocados em baias individuais cobertas, com piso de concreto, equipadas com comedouros e bebedouros individuais. A alimentação foi composta por feno de *Urochloa brizantha* cv. Marandu (Tabela 1), com fornecimento *ad libitum* (ajustado para 50% de sobras em relação ao ofertado) fracionado em três tratos, às 07:00, 12:00 e 17:00. Cochos separados foram utilizados para fornecimento do suplemento, que foi realizado diariamente às 07:00, antes do fornecimento de feno.

O delineamento experimental adotado foi o quadrado latino 4 × 4 completo e duplicado. Os animais foram alocados nas baias 20 dias antes do início do período experimental para adaptação às instalações e manejo alimentar, e foram vermifugados para controle de endo e ectoparasitas. O experimento foi constituído por 4 períodos com duração de 21 dias, sendo os 14 dias iniciais destinados à adaptação dos animais (Machado et al., 2016) e os 7 últimos dias para coletas.

Tabela 1. Ingredientes e composição química dos suplementos e feno fornecidos para bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		Feno
	Sem	Com	Sem	Com	
<i>Ingredientes, g/kg</i>					
Farelo de gérmen de milho	631	631	788	788	-
Farelo de algodão	222	222	-	-	-
Ureia	31,1	31,1	57,0	57,0	-
Núcleo ¹	116	113	156	153	-
Isomix®	-	2,5	-	2,5	-
<i>Composição, g/kg</i>					
MS	905	899	891	893	925
MO	801	781	812	802	935
PB	284	275	297	273	41,3
FDN	145	137	142	131	752
FDNi	75,5	75,9	54,6	58,1	256

¹Composição do núcleo: 26,4 g/kg Ca, 2,95 g/kg Mg, 13 g/kg Na, 6 g/kg P, 3 g/kg S, 2,4 mg/kg Co, 28 mg/kg Cu, 3 mg/kg I, 27,3 mg/kg Mn, 0,8 mg/kg Se, 104 mg/kg Zn, 80 mg/kg monensina; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas contaminantes; FDNi: fibra insolúvel em detergente neutro indigestível. O feno foi fornecido apenas aos animais fistulados no Experimento 2.

3.3 Procedimentos experimentais e coletas de amostras

3.3.1 Experimento 1

Ao início e final do experimento de avaliação do desempenho e características de carcaça, os animais foram pesados após jejum de sólidos e líquidos por 16 horas. Pesagens intermediárias sem jejum foram realizadas a cada 35 dias para ajuste no fornecimento de suplemento. O GMD foi calculado a partir das pesagens inicial e final em jejum.

Método *put and take* foi adotado para equilíbrio da oferta de forragem (OF) entre os piquetes (Tabela 2; Mott e Lucas, 1952). A estimativa da massa de forragem foi feita a partir da leitura das alturas normal e comprimida de 50 pontos em cada piquete, com uso do *rising plate meter*. Três amostras de forragem nas alturas médias foram coletadas por piquete com corte rente ao solo, utilizando aro metálico de área conhecida.

Para avaliação da composição química da forragem consumida pelos animais, amostras foram coletadas por simulação de pastejo (De Vries, 1995) e analisadas quanto ao teor de MS, matéria orgânica (MO), PB, FDN, fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) utilizando espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS; Tabela 2).

Tabela 2. Oferta de forragem e composição química da forragem consumida por bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia	
	Sem	Com	Sem	Com
OF, kg MS/100 kg PC	5,1	5,1	4,4	4,7
<i>Composição, g/kg</i>				
MS	426	448	435	384
MO	930	928	927	929
PB	106	98,8	99,3	103
FDN	679	687	686	683
FDNi	196	210	209	198
DIVMS	668	663	659	674

OF: oferta de forragem; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDNi: fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

Ao final do período experimental, os animais foram abatidos em frigorífico comercial (Minerva Foods®, Barretos, SP, Brasil). No momento do abate, as carcaças foram divididas e pesadas, e o peso de carcaça quente (PCQ) foi utilizado para cálculo do rendimento de carcaça quente (RC; Equação 1):

$$RC = (PCQ/PC) * 100 \quad (1)$$

Onde: RC = rendimento de carcaça quente (%), PCQ = peso de carcaça quente (kg) e PC = peso corporal em jejum (kg).

As meia carcaças foram resfriadas em câmara fria de 0 a 3° C por 24 horas. Após o resfriamento, foram coletadas amostras do *longissimus thoracis* na seção entre 12ª e 13ª costelas da meia carcaça esquerda, para posterior mensuração da área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) com utilização de gabarito quadriculado e paquímetro, respectivamente (Cañeque e Sañudo, 2005).

3.3.2 Experimento 2

No experimento de avaliação do consumo voluntário e metabolismo, os animais fistulados foram pesados ao início e final de cada período experimental para ajuste no fornecimento de suplemento e para cálculo do consumo em relação ao PC. O consumo voluntário de feno foi quantificado do 15º ao 18º dia de cada período, com mensuração da quantidade de feno ofertado do 15º ao 17º dia e das sobras de feno do 16º ao 18º dia. Em cada dia de avaliação foram coletadas amostras de feno ofertado e sobras para posterior realização de análises químicas. Não houve sobra de suplemento em nenhum tratamento e período experimental.

Coleta de fezes foi realizada durante 72 h, das 07:00 do 16º dia às 07:00 do 18º dia, para determinação da digestibilidade. As fezes foram coletadas imediatamente após defecação e armazenadas em balde plástico com tampa. Ao final de cada período de 24 h as fezes foram pesadas, manualmente homogeneizadas, e amostras foram coletadas, secas em estufa com circulação de ar a 55º C por 72 h, e armazenadas para posteriores análises.

Concomitantemente à coleta de fezes foi realizada coleta total de urina. Funis coletores foram acoplados aos animais e ligados por mangueiras a galões plásticos de 20 L que continham 0,5 L de ácido sulfúrico (H_2SO_4) com concentração de 20%. Ao final de cada período de 24 h, o volume de urina foi mensurado e homogeneizado. Uma alíquota de 40 ml foi coletada e armazenada a -20º C para posterior quantificação da concentração de N total (método de Kjeldahl; método INCT-CA N-001/2; Detmann et al., 2021).

No 19º dia foram coletadas amostras de digesta ruminal, na interface líquido-sólida do *mat* ruminal, antes da suplementação (0 h), 6, 12 e 18 h após a suplementação. As amostras foram filtradas em 3 camadas de tecido sintético. Uma alíquota de 50 ml de líquido ruminal foi misturada a 1 ml de H_2SO_4 com concentração de 50%, e depois armazenada a -20º C para análise de NAR. Uma segunda alíquota, de 14 ml, foi armazenada a -20º C para quantificação de acetato, propionato, butirato, valerato, isobutirato e isovalerato. O pH foi mensurado no líquido ruminal imediatamente após a coleta, com uso de potenciômetro digital (DM-22, Digimed, SP, Brasil).

No 21º dia, amostras de sangue foram coletadas antes da suplementação (0 h) e 5 h após a suplementação, via punção da veia jugular, utilizando tubos a vácuo (Vacuplast® Collect Line, SP, Brasil) contendo ativador de coágulo e heparina de sódio. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 4000 × g por 15 minutos a 4º C, e então o soro e plasma foram armazenados em *ependorfs* a -20º C para posteriores análises.

Amostras dos suplementos foram coletadas mensalmente em ambos os experimentos para análise da composição química.

3.4 Análises laboratoriais

Amostras de feno ofertado, sobras e fezes foram processadas em moinho de facas utilizando peneira de 2 mm. Parte desse material foi novamente processado utilizando peneira de 1 mm, e então as amostras foram proporcionalmente compostas por animal para cada período experimental. Amostras de suplemento foram processadas em moinho de facas utilizando peneira de 1 mm, e compostas por tratamento.

Amostras de feno ofertado, sobras, fezes e suplementos foram analisadas quanto o teor de MS (secas em estufa a 105º C por 3 horas; Quirino et al., 2023), cinzas (queima em mufla a 550º C por 3 horas; método INCT-CA M-001/2), N total (método de Kjeldahl; método INCT-CA N-001/2), FDN (utilizando autoclave, α -amilase termoestável e sacos de tecido não tecido; método INCT-CA F-002/2), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN; método INCT-CA N-004/2) e cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN; método INCT-CA M-002/2) de acordo com os procedimentos analíticos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA; Detmann et al., 2021). Além disso, o conteúdo de FDN_i das amostras de feno ofertado, sobras e suplemento foi quantificado a partir de incubação ruminal *in situ* por 288 h (utilizando sacos de tecido não tecido e autoclave; método INCT-CA F-009/2; Detmann et al., 2021). A PB foi calculada pela multiplicação da concentração de N total por 6,25.

A concentração de NAR foi quantificada por método de reação colorimétrica de indofenol catalisada (método INCT-CA N-006/1), segundo Detmann et al. (2021). A concentração de AGV foi avaliada por cromatografia gasosa (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japão) utilizando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, EUA; 60 m, 0,25 mm \varnothing , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol), de acordo com Palmquist e Conrad (1971).

As amostras de sangue foram analisadas em laboratórios comerciais para determinar a concentração de proteínas totais (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol), ureia (método da urease UV), creatinina (método colorimétrico), glicose (método enzimático), insulina (método de quimioluminescência), IGF-1 (método de quimioluminescência) e aminoácidos plasmáticos (cromatografia líquida acolplada à espectrometria de massas, LC-MS/MS). A concentração de globulina foi calculada pela subtração entre a concentração de proteínas totais e albumina.

A análise da concentração de aminoácidos plasmáticos foi realizada apenas nas amostras coletadas 5 h após a suplementação. Além da análise individual, os aminoácidos (AA) foram agrupados de acordo com a função, da seguinte maneira: aminoácidos essenciais (AAE): arginina, histidina, leucina + isoleucina, glutamina + lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina; aminoácidos não essenciais (AANE): alanina, aspartato, glutamato, glicina, prolina + asparagina, serina, tirosina, ornitina e citrulina; aminoácidos de cadeia ramificada (AACR): valina e leucina + isoleucina (Lopes et al., 2020).

3.5 Análises estatísticas

Os dados do Experimento 1 foram analisados segundo delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 2×2 , considerando o grupo de animais em cada piquete como unidade experimental. O teor de ureia, inclusão de isoácidos e interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos foram considerados efeitos fixos, e os erros associados às unidades observacionais e às unidades experimentais foram considerados efeitos aleatórios.

Os dados do Experimento 2 foram analisados de acordo com delineamento quadrado latino duplo 4×4 , em arranjo fatorial 2×2 . Os efeitos de tratamentos foram assumidos como fixos, enquanto os efeitos de quadrado latino (QL), animal aninhado ao QL e período aninhado ao QL foram considerados aleatórios. As variáveis relacionadas às características sanguíneas, tomadas no mesmos animais ao longo do tempo, foram analisadas como medidas repetidas. Para isso, a escolha da melhor estrutura da matriz de (co)variância foi baseada no menor valor do AICC (critério de Akaike com correção). No último período experimental do Experimento 2, um animal fistulado apresentou mudança no padrão de comportamento sem razão aparente, resultando em queda acentuada no consumo. Em decorrência desse fato, os dados do tratamento baixa ureia sem isoácidos, nesse QL e período específicos, foram removidos da análise.

Em ambos os experimentos, quando significativas, as interações foram desdobradas por meio do comando slice. A significância estatística foi declarada quando $P < 0,10$. Todas as análises foram realizadas pelo procedimento MIXED do SAS.

4 RESULTADOS

4.1 Desempenho e características de carcaça

Foi observada interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,03$) no peso corporal final (Pf), GMD e PCQ (Tabela 3). Os isoácidos alteraram o GMD quando adicionados ao suplemento com alta ureia, com incremento de 100 g/d que resultou em maior Pf e PCQ. Em contrapartida, melhorias de desempenho não ocorreram com adição de isoácidos no suplemento com baixa ureia. Não houve efeito dos tratamentos ($P \geq 0,33$) no RC, AOL e EGS.

Tabela 3. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa Ureia		Alta Ureia		EPM	Valor P		
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U × I
Pf, kg	570	564	561	577	17,9	0,63	0,25	0,010
GMD, kg/d	1,18	1,14	1,13	1,23	0,027	0,53	0,28	0,006
PCQ, kg	314	311	309	319	13,0	0,62	0,18	0,020
RC, %	55,1	55,2	55,2	55,2	0,65	0,75	0,78	0,95
AOL, cm ²	75,4	74,6	77,6	79,7	3,51	0,33	0,85	0,69
EGS, mm	2,38	2,25	1,92	2,00	0,351	0,36	0,95	0,78

Pf: peso corporal final; GMD: ganho médio diário; PCQ: peso de carcaça quente; RC: rendimento de carcaça quente; AOL: área de olho de lombo; EGS: espessura de gordura subcutânea; EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U × I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos.

4.2 Consumo voluntário, digestibilidade e balanço de N

O consumo de MS feno, MS total, MO, FDN, fibra insolúvel em detergente neutro digerida (FDND) e matéria orgânica digerida (MOD) não foram alterados ($P \geq 0,29$) pelo teor de ureia e inclusão de isoácidos (Tabela 4). No entanto, efeito de inclusão de isoácidos ($P < 0,10$) foi observado no consumo de PB, que foi reduzido quando isoácidos foram adicionados aos suplementos. Além disso, o teor de ureia afetou o consumo de FDNi ($P < 0,07$), com aumento no suplemento com alta ureia. O consumo de MS feno e MS total em relação ao PC não foram afetados ($P \geq 0,14$) pelo teor de ureia e inclusão de isoácidos, mas o consumo de FDNi em relação ao PC aumentou ($P < 0,04$) no suplemento com alta ureia.

Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,09$) ocorreu na digestibilidade da FDN. A adição de isoácidos no suplemento com alta ureia aumentou a digestibilidade da FDN em 2,6 pontos percentuais, em comparação à adição no suplemento com baixa ureia. A digestibilidade da MO e PB se mantiveram inalteradas ($P \geq 0,16$).

O teor de MOD da dieta não foi afetado ($P > 0,10$) pelos tratamentos, mas interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,06$) foi observada na relação

PB:MOD. Menor relação PB:MOD ocorreu com a adição de isoácidos no suplemento com alta ureia, mas a relação se manteve igual no suplemento com baixa ureia.

O consumo de N foi reduzido ($P < 0,10$) pela inclusão de isoácidos (Tabela 5). A excreção fecal de N, excreção urinária de N, retenção de N e eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) não foram afetados ($P \geq 0,10$) pelos tratamentos.

Tabela 4. Consumo voluntário e digestibilidade de bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		EPM	Valor P		
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U × I
<i>Consumo, kg/d</i>								
MS feno	7,64	7,66	7,56	7,90	0,399	0,61	0,29	0,34
MS total	9,12	9,13	9,03	9,36	0,452	0,67	0,29	0,33
MO	8,83	8,81	8,77	9,07	0,444	0,54	0,42	0,32
PB	0,85	0,83	0,85	0,83	0,037	0,81	0,099	0,68
FDN	5,91	5,94	5,91	6,16	0,301	0,39	0,29	0,39
FDNi	1,53	1,61	1,67	1,79	0,008	0,063	0,20	0,80
FDND	3,87	3,83	3,89	4,12	0,206	0,16	0,37	0,22
MOD	5,40	5,33	5,42	5,71	0,295	0,14	0,38	0,17
<i>Consumo, g/kg PC</i>								
MS feno	15,4	15,6	15,4	16,1	0,03	0,39	0,15	0,47
MS total	18,3	18,6	18,4	19,0	0,03	0,43	0,14	0,53
FDNi	3,12	3,28	3,40	3,65	0,026	0,035	0,21	0,75
<i>Digestibilidade, g/kg</i>								
MO	615	606	616	633	8,5	0,16	0,67	0,20
FDN	662	646	657	672	14,8	0,24	0,98	0,087
PB	667	653	675	667	18,5	0,36	0,37	0,80
MOD ¹	595	584	598	613	8,1	0,103	0,84	0,18
PB:MOD ²	157	157	159	146	2,8	0,12	0,046	0,055

¹g/kg MS; ²g/kg; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas contaminantes; PB: proteína bruta; FDND: fibra insolúvel em detergente neutro digerida; MOD: matéria orgânica digerida; EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U × I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos.

Tabela 5. Balanço de nitrogênio de bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		EPM	Valor P		
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U × I
<i>g/d</i>								
N consumido	135	133	136	133	5,9	0,81	0,097	0,67
N fecal	44,9	46,1	44,2	44,3	2,24	0,42	0,68	0,71
N urinário	38,6	32,5	34,6	35,8	2,29	0,88	0,27	0,105
N retido	51,7	54,6	57,8	52,9	3,39	0,40	0,71	0,14
EUN	0,38	0,41	0,42	0,40	0,015	0,42	0,75	0,20

EUN: eficiência de utilização do nitrogênio (g N retido/g N consumido); EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U × I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos.

4.3 Características ruminais

Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,01$) ocorreu na concentração média de NAR, com aumento de 1,62 mg/dL quando isoácidos foram adicionados ao suplemento com alta ureia, mas sem alteração com a adição no suplemento com baixa ureia (Tabela 6). A concentração média de AGV se manteve inalterada ($P \geq 0,28$) entre os tratamentos, mas interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,03$) foi observada na proporção molar de isobutirato, com redução da proporção com adição de isoácidos no suplemento com alta ureia. Além disso, a proporção de propionato foi aumentada ($P < 0,03$) com a inclusão de isoácidos nos suplementos.

Tabela 6. Características ruminiais de bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		EPM	Valor P		
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U x I
pH	6,40	6,52	6,46	6,43	0,044	0,70	0,35	0,13
NAR, mg/dL	4,07	3,48	3,98	5,60	0,516	0,022	0,21	0,014
AGV, mM	71,8	70,7	69,6	74,0	5,21	0,83	0,52	0,28
<i>mM/100 mM</i>								
Acetato	73,9	73,1	73,6	73,6	0,33	0,74	0,12	0,16
Propionato	15,5	15,9	15,6	15,8	0,29	0,87	0,027	0,30
Butirato	8,44	8,69	8,45	8,41	0,107	0,18	0,30	0,17
Valerato	0,67	0,69	0,70	0,68	0,022	0,33	0,92	0,16
Isobutirato	0,63	0,65	0,67	0,64	0,027	0,29	0,72	0,020
Isovalerato	0,87	0,91	0,92	0,88	0,042	0,62	0,97	0,13

NAR: nitrogênio amoniacal ruminal; AGV: ácidos graxos voláteis; EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U x I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos.

4.4 Características sanguíneas

Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P < 0,04$) foi observada na concentração de nitrogênio ureico no soro (NUS), com aumento de 2,3 mg/dL quando isoácidos foram adicionados ao suplemento com alta ureia e manutenção no suplemento com baixa ureia (Tabela 7). Interação entre teor de ureia e horário de coleta ($P < 0,01$) também ocorreu no NUS, com maior concentração no suplemento com alta ureia 5 h após a suplementação (12,7 vs. 11,6 mg/dL). Ainda, interação entre inclusão de isoácidos e horário de coleta ($P < 0,09$) foi observada no NUS, com maior concentração 5 h após a suplementação quando isoácidos foram adicionados ao suplemento (12,8 vs. 11,4 mg/dL). Interação entre inclusão de isoácidos e horário de coleta ($P < 0,07$) foi observada na concentração sérica de proteínas totais e albumina, com aumento na concentração de proteínas totais (7,7 vs. 7,3 g/dL) e albumina (3,9 vs. 3,3 g/dL) 5 h após a suplementação em suplementos com isoácidos. Embora interação entre inclusão de isoácidos e horário de coleta ($P < 0,07$) tenha sido

detectada na concentração sérica de globulina, o desdobramento da interação não revelou nenhum efeito ($P>0,10$).

Interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P<0,10$) foi observada na concentração plasmática de AA totais, AANE, histidina, treonina, aspartato, glutamato, prolina + asparagina, serina, ornitina e citrulina (Tabela 8). Em todos os casos, a concentração foi aumentada com adição de isoácidos no suplemento com alta ureia, mas permaneceu inalterada com a adição no suplemento com baixa ureia. Efeito de inclusão de isoácidos ($P<0,04$) foi observado na alanina, com aumento na concentração com a adição de isoácidos, independentemente do teor de ureia do suplemento. Apesar de interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos ($P<0,10$) ter ocorrido na concentração de tirosina, nenhum efeito foi indicado no desdobramento da interação ($P>0,10$).

Tabela 7. Características sanguíneas de bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		EPM	Valor P						
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U × I	H	U × H	I × H	U × I × H
Proteínas totais, g/dL	7,60	7,54	7,59	7,73	0,220	0,66	0,82	0,63	0,12	0,69	0,024	0,79
Albumina, g/dL	3,46	3,40	3,46	3,48	0,145	0,62	0,80	0,58	0,18	0,93	0,018	0,60
Globulina, g/dL	4,14	4,14	4,13	4,25	0,121	0,70	0,65	0,68	0,18	0,35	0,066	0,78
NUS, mg/dL	9,87	9,63	9,16	11,5	0,776	0,30	0,074	0,032	<0,001	0,004	0,086	0,64
Glicose, mg/dL	65,0	63,8	63,7	64,1	1,38	0,69	0,76	0,53	0,003	0,68	0,105	0,65
Insulina, µUI/mL	0,37	0,31	0,33	0,28	0,072	0,42	0,23	0,98	0,99	0,67	0,42	0,14
IGF-1, ng/mL	262	246	248	248	16,4	0,37	0,23	0,25	0,095	0,36	0,82	0,63

NUS: Nitrogênio ureico no soro; EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U × I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos; H: efeito do horário de coleta; U × H: interação entre teor de ureia e horário de coleta; I × H: interação entre inclusão de isoácidos e horário de coleta; U × I × H: interação entre teor de ureia, inclusão de isoácidos e horário de coleta.

Tabela 8. Concentração plasmática de aminoácidos em bovinos Nelore em terminação recebendo suplementos com dois teores de ureia e sem ou com inclusão de isoácidos

Item	Baixa ureia		Alta ureia		EPM	Valor P		
	Sem	Com	Sem	Com		U	I	U × I
<i>µmol/L</i>								
AA totais	735	705	648	757	48,7	0,62	0,28	0,068
AAE	342	327	297	345	22,9	0,46	0,36	0,107
AANE	394	378	351	412	22,9	0,79	0,24	0,051
AACR	157	149	136	152	11,3	0,35	0,63	0,20
<i>Essenciais</i>								
Arginina	59,5	58,8	53,1	61,2	2,89	0,50	0,22	0,15
Histidina	44,7	39,9	34,6	44,2	4,49	0,39	0,48	0,045
Leu+Isoleu ¹	75,1	72,8	66,2	73,2	4,08	0,37	0,61	0,33
Gln+Lis ²	19,0	19,5	18,3	21,8	1,24	0,57	0,16	0,29
Metionina	13,6	12,7	11,7	14,2	0,92	0,81	0,43	0,106
Fenilalanina	25,5	24,4	21,3	25,2	1,52	0,32	0,41	0,16
Treonina	9,74	9,06	8,26	9,34	0,681	0,18	0,65	0,064
Triptofano	13,5	13,9	13,8	16,5	1,47	0,18	0,17	0,30
Valina	79,9	76,4	70,3	79,3	6,07	0,48	0,57	0,20
<i>Não essenciais</i>								
Alanina	81,8	87,8	76,3	85,0	5,44	0,21	0,039	0,67
Aspartato	10,2	8,98	7,69	9,69	0,758	0,19	0,59	0,028
Glutamato	59,1	56,3	60,7	76,5	2,88	0,003	0,049	0,008
Glicina	75,0	62,5	59,0	63,7	7,19	0,30	0,58	0,24
Pro+Asn ³	47,8	45,2	42,6	52,3	3,98	0,74	0,21	0,044
Serina	31,1	30,2	24,8	29,6	1,50	0,053	0,25	0,098
Tirosina	31,9	28,4	28,0	32,7	1,94	0,92	0,79	0,093
Ornitina	27,6	26,6	23,4	27,2	1,51	0,12	0,24	0,052
Citrulina	31,4	31,6	28,3	35,3	2,40	0,87	0,084	0,095

¹Leucina + Isoleucina; ²Glutamina + Lisina; ³Prolina + Asparagina; EPM: erro padrão da média; U: efeito do teor de ureia; I: efeito da inclusão de isoácidos; U × I: interação entre teor de ureia e inclusão de isoácidos.

5 DISCUSSÃO

A inclusão de isoácidos aumentou o GMD em 100 g/d no suplemento com alta ureia. Em dietas com alto teor de NNP ou com proteína verdadeira de baixa degradação ruminal, é esperada menor produção de AGVCR por bactérias ruminais (Andries et al., 1987). No presente estudo, o farelo de algodão que compunha o suplemento com baixa ureia foi substituído pelo aumento na quantidade de ureia e gérmen de milho no suplemento com alta ureia. Assim, apesar da porcentagem de proteína ter se mantido inalterada, a quantidade de proteína verdadeira no suplemento com alta ureia foi menor que no baixa ureia.

A redução do suprimento ruminal de aminoácidos, e conseqüentemente de AGVCR, com a substituição de parte da proteína verdadeira pode explicar o menor desempenho produtivo observado com o suplemento alta ureia sem isoácidos. Nesse sentido, ao adicionar isoácidos nesse suplemento, as bactérias que degradam fibra passaram a ter acesso aos AGVCR, além de N na forma de amônia proveniente da ureia, sendo ambos compostos essenciais à multiplicação. Essas condições estimulam o crescimento e atividade de bactérias fibrolíticas, como relatado por Wang et al. (2015, 2018). No suplemento com baixa ureia, os AACR do farelo de algodão foram suficientes como substrato para a produção ruminal de AGVCR, justificando a manutenção do desempenho quando isoácidos foram adicionados.

A ausência de efeito dos isoácidos sobre o CMS se alinha com resultados de estudos anteriores com vacas lactantes, nos quais o fornecimento de AGVCR manteve o CMS mesmo com aumento da produção de leite. Dentre outros fatores, a manutenção do CMS foi atribuída à dose e qualidade dos isoácidos utilizados, além do estágio fisiológico dos animais (Liu et al., 2009; Redoy et al., 2025; Park et al., 2025). No presente estudo, o consumo diário médio de aditivo foi de 3,7 g por animal, dose que pode ser considerada baixa quando comparada a trabalhos previamente publicados, o que explica a manutenção do CMS. Contudo, apesar da baixa dose, observou-se aumento na digestibilidade da FDN quando isoácidos foram fornecidos em associação à alta ureia, em comparação à sua adição ao suplemento com baixa ureia. Esse resultado reforça o potencial dos isoácidos em estimularem a atividade de bactérias fibrolíticas em condições de menor disponibilidade de proteína verdadeira degradável no rúmen.

A relação PB:MOD da dieta é utilizada para compreender os efeitos metabólicos da suplementação de N no consumo de MO. É sugerido que aumento na ingestão de forragem ocorra com aumento da relação PB:MOD até 216 g/kg (Reis et al., 2016), o que é comumente realizado por intermédio da suplementação proteica. Contudo, redução na relação PB:MOD ocorreu com a inclusão de isoácidos no suplemento com alta ureia. Apesar de não ter sido detectada diferença estatística, o consumo de MOD foi 5% superior com este suplemento, ao mesmo tempo em que o consumo de PB não foi aumentado. Entretanto, nessa situação, a redução da relação PB:MOD não é indicativo de déficit de PB na dieta, uma vez que o maior desempenho produtivo foi observado nesse grupo, associado à maior concentração de NAR, NUS e AA totais.

É provável que os efeitos dos isoácidos sobre as características ruminais tenham relação dose-dependente. Quando fornecidos em altas doses, os AGVCR aumentam a concentração de AGV e a proporção molar de acetato, associados a incrementos na digestibilidade da fibra acima de 7 pontos percentuais (Liu et al. 2008, 2009a, 2009b, 2018; Wang et al., 2015, 2018). Contudo, quando fornecidos em doses inferiores, os isoácidos não alteram as características ruminais, mesmo que melhora no desempenho produtivo seja observado (Jiang et al., 2023; Park et al., 2025). No presente estudo, a baixa dose de isoácidos não foi suficiente para aumentar a concentração de AGV e proporção molar de acetato, efeito condizente com o menor impacto na digestibilidade da fibra. O aumento na proporção molar de propionato com inclusão de isoácidos e redução na proporção molar de isobutirato com a adição de isoácidos no suplemento com alta ureia foram marginais, não tendo relevância do ponto de vista biológico.

O fornecimento de AGVCR em doses elevadas também reduz a concentração de NAR, em razão do estímulo à assimilação de amônia pelas bactérias ruminais, efeito frequentemente associado ao aumento na excreção de derivados de purina na urina (Oltjen et al., 1971; Wang et al., 2015, 2018). No entanto, baixas doses de isoácidos não se mostraram capazes de alterar a concentração de NAR (Jiang et al., 2023; Park et al., 2025). No presente estudo, a adição de isoácidos no suplemento com alta ureia aumentou a concentração de NAR em 1,62 mg/dL, sugerindo que os isoácidos estimularam a atividade ureolítica de bactérias ruminais. De fato, maior atividade da enzima urease foi detectada em ovelhas suplementadas com isoácidos (Moharrery, 2004).

Quando a concentração de amônia no rúmen excede a capacidade de utilização pelos microrganismos, essa entra na circulação porta-hepática e é direcionada ao fígado para a síntese de ureia (Huntington e Archibeque, 1999; Kozloski, 2021). No presente estudo, a maior concentração de NAR no suplemento alta ureia com isoácidos foi refletida em aumento de 2,34 mg/dL no NUS. Ainda, aumento na concentração de aspartato, citrulina, glutamato e ornitina, que são importantes intermediários do Ciclo da Ureia, evidenciam a maior ureogênese neste tratamento, decorrente da maior liberação de amônia no rúmen. Contudo, embora a concentração de NUS tenha sido maior, não foi observado aumento na excreção urinária de N, sugerindo que o nitrogênio foi mantido no organismo do animal.

Além dos aminoácidos relacionados à síntese de ureia, o suplemente alta ureia com isoácidos apresentou concentração plasmática de AA totais e AANE superiores em cerca de 17%, acompanhado de incremento na concentração de histidina, treonina, prolina + asparagina e serina, indicativo de melhora no *status* de N no metabolismo animal. O *status* de N é definido como a disponibilidade de compostos nitrogenados para atender as funções fisiológicas no metabolismo do hospedeiro. Quando este é melhorado, as moléculas de NNP podem ser direcionadas para vias metabólicas prioritárias, enquanto os AA ficam disponíveis para vias anabólicas, como a síntese de proteína muscular (Detmann et al., 2014, 2017; Reis et al., 2020; de Oliveira et al., 2020). Além de serem as unidades estruturais básicas da síntese de proteínas, os AA também exercem funções importantes como sinalizadores de vias metabólicas (Meijer, 2003).

No suplemento com alta ureia, a inclusão de isoácidos aumentou a concentração plasmática de AACR em aproximadamente 12%, embora diferença estatística não tenha sido detectada. Esse incremento pode ser atrelado à maior deposição de tecido muscular observada nesse grupo, visto que os AACR, especialmente a leucina, desempenham papel central na ativação da via do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Essa via está relacionada com o estímulo da síntese proteica, redução da proteólise e aumento da captação de glicose pelo tecido muscular (Zhang et al., 2017). Ainda, há evidências de que alguns AANE, como glutamato e prolina, também atuam como sinalizadores na ativação da via da mTOR, contribuindo com a deposição muscular (Wu et al., 2013).

Dentre todos os aminoácidos avaliados, o glutamato apresentou aumento mais expressivo, com concentração 26% maior no suplemento com alta ureia quando

isoácidos foram incluídos. Por desempenhar múltiplas funções no metabolismo do nitrogênio, o glutamato é considerado o aminoácido de maior versatilidade metabólica, e o incremento observado indica alterações relevantes no metabolismo proteico. Através de reações de desaminação e transaminação, o glutamato recebe grupamentos amino de aminoácidos, destinados à ureogênese por intermédio da formação de aspartato, e doa grupamentos amino para a síntese de AANE. Ademais, o glutamato é precursor de N-acetilglutamato, ativador obrigatório da enzima que inicia o ciclo da ureia, contribuindo diretamente para a regulação da taxa de síntese ureica (Brosnan, 2000; Milano et al., 2000; Newsholme et al., 2003).

Diferentemente do observado no presente estudo, pesquisas anteriores não relataram alterações na concentração plasmática de AA quando isoácidos foram suplementados (Misra e Thakur, 2000; Jiang et al., 2023; Park et al, 2025). No entanto, nesses estudos as dietas apresentavam maior proporção de concentrado e maiores níveis de proteína verdadeira. Os resultados aqui obtidos sugerem que, em condições nas quais a dieta não fornece elevado suprimento de proteína verdadeira degradável no rúmen, como ocorre com bovinos mantidos em pasto tropical e suplementados com alto nível de NNP, o fornecimento de isoácidos tem potencial de incrementar o aproveitamento da fibra, melhorar o *status* de N e o estado anabólico geral do animal. Esses efeitos resultam em maior deposição de tecido muscular em função da maior disponibilidade de AA para a síntese proteica e, possivelmente, da ativação de vias de sinalização associadas ao anabolismo proteico.

6 CONCLUSÃO

As respostas produtivas e metabólicas ao fornecimento de isoácidos para bovinos alimentados com gramíneas tropicais são dependentes do nível de ureia do suplemento, de modo que benefícios no desempenho são observados somente com maior nível de ureia. Ademais, a suplementação com isoácidos em baixa dose apresenta potencial para aumentar o aproveitamento da fibra e melhora o estado anabólico geral dos animais, efeitos também condicionados à composição do suplemento.

7 REFERÊNCIAS

- Allison MJ (1969) Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 5, p. 797-807, 1969.
- Allison MJ, Baetz AL, Wiegel J (1984) Alternative pathways for biosynthesis of leucine and other amino acids in *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides fragilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 48:1111-1117.
- Allison MJ, Bryant MP (1963) Biosynthesis of branched-chain amino acids from branched-chain fatty acids by rumen bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 101(2), 269-277.
- Allison MJ, Bryant MP, Doetsch RN (1962) Studies on the Metabolic Function of Branched-Chain Volatile Fatty Acids, Growth Factors for Ruminococci I: Incorporation of Isovalerate into Leucine. **Journal of Bacteriology**, 83(3), 523-532.
- Andrade GB (2017) Estudos estruturais de dockerinas e cohesinas em *Ruminococcus flavefaciens* e sua aplicação no desenvolvimento de matrizes auto montáveis de proteínas. 2017. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2017. doi:10.11606/D.76.2017.tde-14092017-105719.
- Andries JI, Buysse FX, De Brabander DL, Cottyn BG (1987) Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances - A review. **Animal Feed Science and Technology**, 18(3), 169-180.
- Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ, Wang M (2020) Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. **Animal**, 14:s2–s16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>.
- Brosnan JT (2000). Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. **The Journal of nutrition**, 130(4), 988S-990S.
- Bryant MP, Doetsch RN (1955) Factors necessary for the growth of *Bacteroides succinogenes* in the volatile acid fraction of rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, 38(4), 340-350.
- Burnet MC, Dohnalkova AC, Neumann AP, Lipton MS, Smith RD, Suen G, Callister SJ (2015) Evaluating models of cellulose degradation by *Fibrobacter succinogenes* S85. **PLoS One**, 10(12), e0143809.
- Cañeque V, Sañudo C (2005) Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los ruminantes. Madrid: **INIA**, 448 p. (Serie Ganadera, 3).
- Cheng KJ, Forsberg CW, Minato H, Costerton JW (1991) Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**, Academic Press, pp. 595-624.

Costa VAC, Detmann E, Paulino MF, Valadares Filho SC, Carvalho IPCD, Monteiro LP (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 Oliveira CV, Silva TE, Batista ED, et al. (2020) Urea supplementation in rumen and post-rumen for cattle fed a low-quality tropical forage. **British Journal of Nutrition**, 124(11), 1166-1178.

De Vries MFW (1995). Estimating forage intake and quality in grazing cattle: a reconsideration of the hand-plucking method. **Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives**, v. 48, n. 4, p. 370-375.

Detmann E (2023) Entendendo as vaquinhas. **Suprema Gráfica e Editora**, 404 p.

Detmann E, Batista ED, Silva TE, et al. (2017) Nutrição de bovinos de corte sob sistema de pastejo com foco na eficiência de utilização de nitrogênio (Nutrition of beef cattle under grazing focusing on the efficiency of nitrogen utilization). **Proceedings of the 10th Simpósio de Pecuária de Corte**, Lavras, Brazil, pp. 43–72.

Detmann E, Costa e Silva LF, Rocha GC, Palma MNN, Rodrigues JPP (2021) Métodos para análise de alimentos. 2. ed. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA), Visconde do Rio Branco: **Suprema**, 350p.

Detmann E, de Sousa LCO, Lima NS, Franco MO (2024) What is the impact of neutral detergent fibre digestibility on productive performance of beef cattle fed tropical forages? **Livestock Science**, 290, 105608.

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

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

Detmann E, Paulino MF, Valadares Filho SC, Lana RP (2007) Fatores controladores de consumo em suplementos múltiplos fornecidos ad libitum para bovinos manejados a pasto. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 73-93.

Detmann E, Queiroz ACD, Zorzi K, Mantovani HC, Bayão GFV, Gomes MPC (2011) Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 1272-1279.

Detmann E, Valente EE, Batista ED, et al. (2014) An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, 162, 141–153.

Fernandes RM, Almeida CMD, Carvalho BC, Neto JAA, Mota VAC, Resende FD, Siqueira GR (2016) Effect of supplementation of beef cattle with different protein levels and degradation rates during transition from the dry to rainy season. **Tropical Animal Health and Production**, 48, 95-101.

Firkins JL (2023) Viewing a role for isoacids in dairy nutrition through a new lens. In: **Proceedings from 2023 Cornell Dairy Nutrition Conference**. Ithaca, NY

Firkins JL, Mitchell E, White AF (2024) Invited Review: Role for isoacids in dairy nutrition. **Applied Animal Science** 40.4, 466-477.

Gomes DI, Detmann E, Valadares Filho SDC, Fukushima RS, de Souza MA, Valente TN, ..., de Queiroz AC (2011). Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**, 168(3-4), 206-222.

Hino T e Russell JB (1985) Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. **Applied and Environmental Microbiology**. 50:1368-1374. doi: 10.1128/AEM.50.6.1368- 1374.1985.

Hintz RW, Mertens DR, Albrecht KA (1996). Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. **Journal of AOAC International**, 79(1), 16-22.

Hungate RE (1944) Studies on cellulose fermentation: I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. **Journal of bacteriology**, v. 48, n. 5, p. 499-513.

Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 14, n. 1, p. 1-49.

Hungate RE (1966) The Rumen and Its Microbes. **Academic Press**, New York, NY

Huntington GB, Archibeque SL (1999) Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. In: **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1-11.

Jiang F, Gao Y, Peng Z, Ma X, You Y, Hu Z, He A and Liao Y (2023) Isoacids supplementation improves growth performance and feed fiber digestibility associated with ruminal bacterial community in yaks. **Frontiers in Microbiology**. 14:1175880. doi: 10.3389/fmicb.2023.1175880

Kozloski GV (2021) Bioquímica dos ruminantes. 3ª ed. rev. e ampl. Santa Maria: **Editora da UFSM**, 216p.

Liu Q, Wang C, Guo G, Huo WJ, Zhang YL, Pei CX, Zhang SL, Wang H (2018) Effects of branched-chain volatile fatty acids supplementation on growth performance, ruminal fermentation, nutrient digestibility, hepatic lipid content and gene expression of dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 237, p. 27-34.

Liu Q, Wang C, Huang Y, Dong K, Wang H, Yang W (2008) Effects of isobutyrate on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. **Archives of Animal Nutrition**, 62(5), 377-388.

Liu Q, Wang C, Huang YX, Dong KH, Yang WZ, Zhang S, Wang H (2009a). 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 Q, Wang C, Yang WZ, Zhang B, Yang XM, He DC, Zhang P, Dong KH, Huang YX (2009b) Effects of isobutyrate on rumen fermentation, lactation performance and plasma characteristics in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, 154(1-2), 58-67.

Liu Q, Wang C, Zhang YL, Pei CX, Zhang SL, Liu HQ, Guo G, Huo YJ, Yang WZ, Wang H (2016) Effects of 2-methylbutyrate supplementation on growth performance and ruminal development in pre-and post-weaned dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**, 216, 129-137.

Lopes RC, Sampaio CB, Trece AS, Teixeira PD, Gionbelli TRS, Santos LR, ..., Gionbelli MP (2020). Impacts of protein supplementation during late gestation of beef cows on maternal skeletal muscle and liver tissues metabolism. **Animal**, 14(9), 1867-1875.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66(3), 506-577.

Machado MG, Detmann E, Mantovani HC, Valadares Filho SC, Bento CB, Marcondes MI, Assunção, AS (2016) Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.222, p.132148.

Milano GD, Hotston-Moore A, Lobleby GE (2000). Influence of hepatic ammonia removal on ureagenesis, amino acid utilization and energy metabolism in the ovine liver. **British Journal of Nutrition**, 83(3), 307-315.

Misra AK e Thakur SS (2000) Influence of isobutyric acid supplementation on nutrient intake, its utilization, blood metabolites and growth performance of crossbred calves fed wheat straw based low protein diets. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, 14(2), 200-205.

Mitchell KE, Kienzle SL, Lee C, Socha MT, Kleinschmit DH, Firkins JL (2023a) Supplementing branched-chain volatile fatty acids in dual-flow cultures varying in dietary forage and corn oil concentrations. II: Biohydrogenation and incorporation into bacterial lipids. **Journal of Dairy Science**, 106:7548–7565.

Mitchell KE, Socha MT, Kleinschmit DH, Moraes LE, Roman-Garcia Y, Firkins JL (2023b) Assessing milk response to different combinations of branched-chain volatile fatty acids and valerate in Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, 106:4018–4029. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22545>.

Moharrery, A. (2004). Effect of isoacid on some rumen enzymes. **Journal of Animal and Feed Sciences**, 13, 159-162.

Moore KJ e Jung HJG (2001). Lignin and fiber digestion. **Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives**, 54(4), 420-430.

Moraes EHBKD, Paulino MF, Moares KAKD, Valadares Filho SC, Zerboudakis JT, Detmann E (2009) Uréia em suplementos protéico-energéticos para bovinos de corte durante o período da seca: características nutricionais e ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 770-777.

Mott GO e Lucas HL (1952). The design, conduct and interpretation of grazing trials on cultivated and improved pastures. In: **International grassland congress** (Vol. 6, No. 1952, pp. 1380-1395).

Nelson DL e Cox MM (2014) Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 1220p.

Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R (2003). Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, 21(1), 1-9.

Nichols K, de Carvalho IPC, Rauch R, Martín-Tereso J (2022) Unlocking the limitations of urea supply in ruminant diets by considering the natural mechanism of endogenous urea secretion. **Animal**, 16, 100537.

Oltjen RR, Slyter LL, Williams EE, Jern DL (1971) Influence of the branched-chain volatile fatty acids and phenylacetate on ruminal microorganisms and nitrogen utilization by steers fed urea or isolated soy protein. **Journal Nutrition**, 101(1), 101-112.

Palmquist DL e Conrad HR (1971) Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal Dairy Science**. 54:1025–1033, 1971.

Park K, Clark KL, Firkins JL, Kleinschmit DH, Socha MT, Lee C (2025) Effects of isobutyrate and 2-methylbutyrate at different levels of rumen degraded protein on ruminal nutrient digestibility, microbial protein synthesis, and milk production in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Aug;108(8):8476-8490. doi: 10.3168/jds.2025-26507

Parker DS, Lomax MA, Seal CJ, Wilton JC (1995) Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society** 54, 549–563.

Pesi R, Balestri F, Ipata PL (2018) Metabolic interaction between urea cycle and citric acid cycle shunt: A guided approach. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 46, n. 2, p. 182-185.

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

Quirino DF, Lima NSA, Palma MNN, Franco MO, Detmann E (2023) Evaluation of heating times for loss on drying at 105°C for estimation of laboratory dry matter in animal feeds. **Journal of AOAC International**, 106(2), 261–266. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsad004>

Redoy MRA, Ahmed S, Urbina JB, Kleinschmit DH, Socha MT, Salunke P, Uddin ME (2025). Supplementation of isoacids to lactating dairy cows fed low-or high-forage diets: Effects on performance, digestibility, and milk fatty acid profile. **Journal of Dairy Science**, 108(2), 1408-1418.

Reid JT (1953) Urea as a protein replacement for ruminants: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 36, n. 9, p. 955-996.

Reis RA, Ruggieri AC, Oliveira AA, Azenha MV, Casagrande DR (2012) Suplementação como estratégia de produção de carne de qualidade em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 13, 642-655.

Reis WL, Palma MN, Paulino MF, Rennó LN, Detmann, E (2020) Investigation on daily or every three days supplementation with protein or protein and starch of cattle fed tropical forage. **Animal Feed Science and Technology**, 269, 114650.

Reynolds CK, Kristensen NB (2008) Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. **Journal of Animal Science**, 86: E293–305.

Roman-Garcia Y, Denton BL, Mitchell KR, Lee C, Socha MT, Firkins JL (2021a) Conditions stimulating NDF degradation by dosing branched chain volatile fatty acids. I: Comparison with branched chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures. **Journal of Dairy Science**, 104:6739-6755. doi: 10.3168/jds.2020-20054.

Roman-Garcia Y, Mitchell KE, Denton BL, Lee C, Socha MT, Wenner BA, Firkins JL (2021b) Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on NDF degradation and microbial function in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, 104:9853–9867. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20335>.

Shambaugh GE (1977) Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. **The American journal of clinical nutrition**, v. 30, n. 12, p. 2083-2087.

Sollenberger LE e Cherney, DJR (1995) Evaluating forage production and quality. In: Barnes RF, Miller DA, Nelson CJ (Eds.) **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: University Press, v.2, p.97-110.

Tan Z e Murphy MR (2004) Ammonia production, ammonia absorption, and urea recycling in ruminants. A review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 13, n. 3, p. 389-404.

Tedeschi LO, Fox DG, Russell JB (2000) Accounting for ruminal deficiencies of nitrogen and branched-chain amino acids in the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. In: **Proceedings of Cornell nutrition conference for feed manufacturers**. New York: Cornell University, p. 224-238.

Thurston N, Dawson KA, Strobel HJ (1994) Pentose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 60:1087.

Toyoda A, Lio W, Mitsumori M, Minato H (2009) Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(6), 1667-1673.

Valadares Filho SDC, Saraiva DT, Benedeti PDB, Silva, FAS, Chizzotti ML (2023) Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados – BR-CORTE. 4. ed. Visconde do Rio Branco, MG: **Suprema**, xxi, 480 p.

Wang C, Liu Q, Guo G, Huo WJ, Pei CX, Zhang SL, Yang WZ (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 C, Liu Q, Zhang YL, Pei CX, Zhang SL, Wang YX, Zang WZ, Bai YS, Shi ZG, Liu XN (2015) Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 123-131.

Weimer PJ (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. **Journal of Dairy Science**, 79(8), 1496-1502.

Weimer PJ (2022) Degradation of Cellulose and Hemicellulose by Ruminal Microorganisms. **Microorganisms**, 10, 2345. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122345>.

Wilson JR (1993) Organization of forage plant tissues. In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility; Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J., Eds.; **American Society of Agronomy**; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America: Madison, WI, USA, p. 1–32.

Wu G, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang W, Liu C, ..., Yin Y (2013). Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. **Amino acids**, 44(4), 1107-1113.

Zhang S, Zeng X, Ren M, Mao X, Qiao S (2017). Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, 8(1), 10.