

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Avaliação de Tamponantes, Metionina Rúmen-Protegida e *Aspergillus* spp.
como Aditivos em Dietas para vacas leiteiras: Abordagens *In Vivo*, *In Situ* e *In
Vitro***

Laura Valadão Vieira

Pelotas, 2025

Laura Valadão Vieira

**Avaliação de Tamponantes, Metionina Rúmen-Protegida e *Aspergillus* spp.
como Aditivos em Dietas para vacas leiteiras: Abordagens *In Vivo*, *In Situ* e *In
Vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Clínica Médica Veterinária).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa
Coorientador: Eliza Rossi Komninou

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

V657a Vieira, Laura Valadão

Avaliação de tamponantes, metionina rúmen-protégida e *Aspergillus spp.* como aditivos em dietas para vacas leiteiras : abordagens *in vivo*, *in situ* e *in vitro* [recurso eletrônico] / Laura Valadão Vieira ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Eliza Rossi Komninou, coorientadora. — Pelotas, 2025.

176 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Enzimas fibrolíticas. 2. Função hepática. 3. Metabolismo do nitrogênio. 4. Moduladores ruminais. 5. Síntese proteica. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Komninou, Eliza Rossi, coorient. III. Título.

CDD 636.214

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Laura Valadão Vieira

Avaliação de Tamponantes, Metionina Rúmen-Protegida e *Aspergillus* spp. como Aditivos em Dietas para vacas leiteiras: Abordagens *In Vivo*, *In Situ* e *In Vitro*

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11/08/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rodrigo Almeida
Doutor em Ciência Animal e Pastagens pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Dr. Matheus Gomes Lopes
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Jéssica Halfen
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

**A todos aqueles interessados pela Nutrição de Ruminantes, pela pesquisa
científica e que, um dia, irão ler esta tese.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Reni Valadão Vieira e Manoel Renato Farias Vieira, que são meus primeiros e sempre professores. Aos docentes das escolas 1º de Maio, Bernardo Arriada e Gonzaga. Ao corpo docente da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), especialmente da Faculdade de Veterinária, do Programa de Pós-graduação (PPG) em Zootecnia e do PPG em Veterinária.

Ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária - NUPEEC HUB, grupo de pesquisa no qual permaneci por 8 anos. Ao meu orientador, professor Dr. Marcio Nunes Corrêa. À minha coorientadora, professora Dra. Eliza Rossi Komninou e aos demais professores do NUPEEC HUB.

Aos professores da University of Wisconsin - Madison, EUA, onde realizei meu estágio de doutorado sanduíche e em especial ao meu supervisor, professor Dr. Luiz Felipe Ferraretto. Aos meus colegas em todas as etapas acadêmicas, especialmente aos que fizeram parte da construção desta tese: doutoranda Magna Fabrícia Savela, mestrando Muryllo Botelho Medeiros, graduandos em Zootecnia Diego Rodrigues Saraiva, Mario Toyo Vieira e Rafaela Ortiz Zitzke, e graduando em Medicina Veterinária Noéliton Freitas. Aos membros da minha banca de doutorado. A todos os pesquisadores que, ao publicarem seus dados, fornecem informações que embasam pesquisas futuras.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Doutorado Acadêmico para Inovação (DAI). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A estas instituições, fica o meu agradecimento.

A todos, muito obrigada!

Resumo

VIEIRA, Laura Valadão. **Avaliação de Tamponantes, Metionina Rúmen-Protegida e *Aspergillus spp.* como Aditivos em Dietas para vacas leiteiras: Abordagens *In Vivo*, *In Situ* e *In Vitro*.** 2025. 176f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Essa tese objetivou abordar os resultados de três estudos distintos. O primeiro deles, utilizando uma abordagem *in vivo*, avaliou a inclusão de um blend de tamponantes composto por calcário calcítico, óxido de magnésio, algas calcárias e bicarbonato de sódio (BBA), comparado ao uso isolado de bicarbonato de sódio, na dieta de 36 vacas da raça Holandês (BBA, n=18; Bicarbonato de Sódio, n=18). O segundo estudo, com abordagem *in vitro*, avaliou os efeitos de uma formulação contendo *Aspergillus oryzae* e *A. niger* sobre a digestibilidade ruminal de três dietas totalmente misturadas (TMRs) incubadas por 12, 30, 48 e 120 horas em ambiente ruminal simulado. O terceiro estudo, com uma abordagem *in situ*, avaliou a resistência ruminal de um produto a base de metionina rúmen-protegida durante 10 horas de incubação em novilhos fistulados, adotando um delineamento experimental cross-over 3x4, com três tratamentos (Controle; Metionina rúmen-protegida [RPMet]; Metionina sem proteção [UnMet]) e quatro períodos, totalizando quatro animais por grupo. Os resultados do primeiro estudo indicaram que as vacas suplementadas com BBA apresentaram maior pH fecal ($P < 0,05$) e maior eficiência alimentar ($P < 0,05$) em comparação às vacas que receberam apenas bicarbonato de sódio. No segundo estudo, houve tendência ($P = 0,07$) para uma maior digestibilidade da matéria seca e aumento significativo na digestibilidade da matéria orgânica ($P = 0,04$) em uma TMR em que a silagem de milho foi substituída parcialmente pela palha de trigo. No terceiro estudo, observou-se que, ao final da incubação, $94,05 \pm 1,42\%$ da dose de RPMet resistiu à degradação ruminal, enquanto apenas $20,30 \pm 1,22\%$ da dose de UnMet permaneceu resistente após 10 horas ($P < 0,01$). Os resultados desta tese indicam que a inclusão de tamponantes e do co-cultivo de *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus niger* melhoraram parâmetros de estabilidade ruminal, digestibilidade e eficiência alimentar. Além disso, a RPMet avaliada apresentou alta resistência à degradação ruminal, evidenciando o seu potencial de absorção intestinal.

Palavras-chave: enzimas fibrolíticas; função hepática; metabolismo do nitrogênio; moduladores ruminais; síntese proteica

Abstract

VIEIRA, Laura Valadão. **Evaluation of Buffers, Protected Methionine and *Aspergillus* spp. as Additives in Diets for Dairy Cows: In Vivo, In Situ, and In Vitro Approaches.** 2025. 176f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

This dissertation aimed to address the findings of three distinct studies. The first study, using an *in vivo* approach, evaluated the inclusion of a buffer blend composed of calcitic limestone, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate (BBA), compared with the isolated use of sodium bicarbonate, in the diet of 36 Holstein cows (BBA, n = 18; Sodium Bicarbonate, n = 18). The second study, conducted *in vitro*, assessed the effects of a formulation containing *Aspergillus oryzae* and *A. niger* on ruminal digestibility of three total mixed rations (TMRs), incubated for 12, 30, 48, and 120 hours under simulated ruminal conditions. The third study, using an *in situ* approach, evaluated the ruminal resistance of a rumen-protected methionine (RPMet) product during 10 hours of incubation in fistulated steers, adopting a 3 × 4 crossover design with three treatments (Control; RPMet; unprotected methionine [UnMet]) and four periods, totaling four animals per group. The results of the first study indicated that cows supplemented with BBA exhibited higher fecal pH ($P < 0.05$) and greater feed efficiency ($P < 0.05$) compared with cows receiving sodium bicarbonate alone. In the second study, there was a trend ($P = 0.07$) toward greater dry matter digestibility and a significant increase in organic matter digestibility ($P = 0.04$) in a TMR where corn silage was partially replaced by wheat straw. In the third study, it was observed that, after 10 hours of incubation, $94.05 \pm 1.42\%$ of the RPMet dose resisted ruminal degradation, whereas only $20.30 \pm 1.22\%$ of the UnMet dose remained resistant ($P < 0.01$). Overall, the findings of this dissertation indicate that the inclusion of buffers and the co-culture of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* improve ruminal stability parameters, digestibility, and feed efficiency. Moreover, the evaluated RPMet product demonstrated high resistance to ruminal degradation, highlighting its potential for intestinal absorption.

Keywords: fiber-degrading enzymes; liver function; nitrogen metabolism; ruminal modulators; protein synthesis

Lista de Figuras

Figura 1 Ciclo de 1 carbono extraído do artigo de Coleman et al. (2020).....	58
Figura 2 Formação da glutationa adaptado de Brosnan et al. (2007).....	61

ARTIGO 1

Fig 1 Weekly values of pH values referring of the ruminal fluid of the CONTROL group (sodium bicarbonate) and BBA (commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate) groups.....	83
--	----

ARTIGO 2

Figura 1 Cronograma de incubações.....	130
--	-----

ARTIGO 3

Figura 1 Estabilidade ruminal de metionina ao longo das horas de incubação	140
--	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados da utilização do <i>A. oryzae</i> na dieta de ruminantes, adaptado de Uwineza et al. (2024).....	48
----------	---	----

ARTIGO 1

Table 1	Ingredients and chemical composition of the experimental diets (% dry Matter basis).....	78
Table 2	Average percentage of particles sizes of TMR as assessed using Penn State sieves.....	80
Table 3	Feeding behavior, animal behavior, and feed efficiency (FE) by dairy cows in the CONTROL and BBA groups. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).....	81
Table 4	Average pH and fecal starch from the dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).....	82
Table 5	Quantification of volatile fatty acids (VFA) in the rumen of dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).....	84
Table 6	Mean blood gas parameters of dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the mean).....	84

Table 7	Mean metabolic parameters of dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).....	85
Table 8	Mean milk production and composition from dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean).....	86

ARTIGO 2

Tabela 1	Composição das dietas experimentais.....	125
Tabela 2	Composição do concentrado comercial (% MS).....	126
Tabela 3	Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de <i>Aspergillus Oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> (AOAN) em uma TMR formulada com silagem de milho.....	127
Tabela 4	Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de <i>Aspergillus Oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> (AOAN) em uma TMR com substituição parcial de silagem de milho por casca de soja.....	128

Tabela 5	Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de <i>Aspergillus Oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> (AOAN) em uma TMR com substituição parcial de silagem de milho por palha de trigo.....	129
----------	--	-----

ARTIGO 3

Tabela 1	Média \pm erro padrão (EP) dos níveis séricos de gama glutamil transferase, aspartato aminotransferase, albumina, proteínas plasmáticas totais e haptoglobina e níveis plasmáticos de glicose e metionina em animais tratados com RPMet (n = 4), UnMet (n = 4), Controle (n = 4).....	139
Tabela 2	Média \pm erro padrão (EP) do pH e da digestibilidade ruminal da matéria seca para os grupos RPMet (n = 4), UnMet (n = 4), Controle (n = 4).....	141

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADF	Acid detergent fibre
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGV	Ácidos graxos voláteis
NA	<i>Aspergillus niger</i>
AO	<i>Aspergillus oryzae</i>
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOAN	<i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> (co-cultura)
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BBA	Blend de tamponantes
BHA	Butilhidroxianisol
BHB	β-hidroxibutirato
BHT	Butilhidroxitolueno
BW	Body weight
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNF	Carboidratos não fibrosos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COM	Controle
CP	Crude protein
DAI	Doutorado Acadêmico para Inovação
dFDN	Digestibilidade da fibra em detergente neutro
DFM	Direct- Fed Microbials
DIM	Dias em lactação (days in milk)
DM	Dry matter

DMI	Consumo de matéria seca (dry matter intake)
dMO	Digestibilidade da matéria orgânica
dMS	Digestibilidade da matéria seca
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Ether extract
EP	Erro padrão
EUA	Estados Unidos da América
FABP	Proteínas de ligação a ácidos graxos
FDA	Fibra em detergente ácida
FDN	Fibra em detergente neutro
FDN _i	Fibra em detergente neutro indigestível
FDN _{Fe}	Fibra em detergente neutro fisicamente efetivo
FE	Eficiência alimentar (feed efficiency)
GGT	Gama-glutamil transferase
GRP78	Proteína 78 regulada pela glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMB	Hidroximetilbutirato
HMTBA	2-hidroxi-4-(metiltio) butanoico
HMTBA-Ca	2-hidroxi-4-(metiltio) butanoico com sal de cálcio
HMTBi	2-hidroxi-4-(metiltio) butanoico com éster isopropílico
Hp	Haptoglobina
IκB α	Fator nuclear Kappa β inibidor
IL-6	Interleucina-6
IL- β	Interleucina- β
JMP	Statistical Analysis Software (JMP Pro 14)
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal kinase
LC-MS	Cromatografia líquida e espectrometria de massas
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MM	Materia mineral (mineral matter)
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
mTor	Alvo da rapamicina em mamíferos

NASEM	Nutrient requirements of dairy cattle
NDF	Neutral detergent fibre
NEB	Negative energy balance
NEFA	Ácidos graxos não esterificados (Non-Esterified Fatty Acids)
NFC	Non-fibre carbohydrates
NF-K β	Fator nuclear Kappa β
NIR	Espectroscopia de infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy)
NRC	National Research Council
NUPEEC HUB	Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
OM	Organic matter
PB	Proteína Bruta
pCO ₂	Pressão de gás carbônico
PDR	Proteína degradável no rúmen
pH	Potencial de hidrogênio
PKa	Contante de dissociação
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
PON1	Paraoxonase
PPG	Programa de Pós-Graduação
PPT	Proteínas plasmáticas totais
PV	Peso vivo
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
RPMet	Metionina rúmen-protégida
S/N	Sem número
S6KI	S6 ribossômica
SAM	S-adenosilmetionina
SEM	Erro padrão da média (Standard Error of the Mean)
SER	Sterol Regulatory Element
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol-1
TLR4	Toll-like receptor 4
TMR	Dieta totalmente misturada (Total Mixed Ration)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

TPPs	Total plasma proteins
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UnMet	Metionina não protegida
USA	American United
USDA	United States Department of Agriculture
VFA	Ácidos graxos voláteis (Volatile Fatty Acids)
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WI	Wisconsin

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
±	Mais ou menos
®	Registered trademark
TM	Trademark
1 Animal _m	Indica o animal como um efeito aleatório
1N NaOH	Solução de Hidróxido de Sódio
Aj	Efeito aleatório
°C	Graus celcius
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
C ₂ H ₁₀ I ₂ N ₂	Diiodeto de etilenodiamônio
Cisteína Hcl	Sal cloridrato da cisteína
CLA	Ácido linoleico conjugado
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₂ . 6H ₂ O	Cloreto de cobalto(II) hexahidratado
CoCO ₃	Carbonato de cálcio
Cm	Centímetros
Cu ₂ (OH) ₃ Cl	Oxicloreto de cobre
EU	Unidades endógenas
EU/mL	Unidades Endotóxicas por mililitro

FeCl ₃ . 6H ₂ O	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
G	Gramas
g/100g	Gramas por 100g
g/dia	Gramas por dia
g/dL	Gramas por decilitro
g/kg/MS	Gramas por quilogramas de matéria seca
g/Tone	Gramas por tonelada
H	Hora
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
IU/g	Unidade Internacional por grama
IU/mg	Unidade Internacional por miligrama
J	Período
K	Potássio
Kg	Quilogramas
kg/day	Quilogramas por dia
Kg/meal	Quilogramas por refeição
Kg/min	Quilogramas por minuto
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
L	Litros
Meals/day	Refeições por dia
mEq/L	Miliequivalente por litro
Mg	Magnésio
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilogramas
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptaidratado
MHz	Mega-hertz
Min/day	Minutos por dia
Min/meal	Minutos por refeição
mL	Milílitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mm/L	Milimolar por litro
mmHg	Milímetros de mercúrio

mmol/L	Milimoles por litro
MnCl ₂ . 4H ₂ O	Cloreto de manganês (II tetrahidratado)
MnSO ₄	Sulfato de manganês
mOsm/L	Milosmoles por litro
N	Nitrogênio
n/day	Número de vezes por dia
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
Na ₂ S·9H ₂ O	Sulfeto de sódio nonahidratado
<i>P</i>	Probabilidade
P	Efeito fixo do tempo
Psi	Unidade de pressão
S	Enxofre
T _{pik}	Interação entre tratamento e tempo
U/L	Unidade por litro
U/mL	Unidade por mililitro
W	Estatístico de Shapiro-Wilk
Y _{ijklm}	Variável contínua
Y _{ijk}	Variável contínua
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
μ	Média geral
μM	Micromolar
μmol/L	Micromoles por litro
ε _{ijk}	Erro aleatório
θ _i	Efeito fixo da hora de coleta
T _i	Efeito fixo do tratamento
T _{ij}	Efeito fixo do período
φ _{ij}	Interação entre tratamento e hora de coleta

Sumário

1	Introdução.....	20
2	Revisão de literatura.....	23
2.1	Acidose ruminal: uma revisão.....	23
2.1.1	Fatores de risco associados ao desenvolvimento de acidose ruminal.....	24
2.1.2	Patogenia da Acidose ruminal e Impactos na Eficiência Produtiva.....	27
2.1.3	Diagnóstico de acidose ruminal.....	37
2.1.4	Métodos de prevenção.....	39
2.1.5	Tamponantes ruminais como ferramentas de prevenção da acidose ruminal.....	39
2.2	Uso dos fungos do gênero <i>Aspergillus</i> como Aditivo Nutricional para bovinos leiteiros: uma novidade?.....	41
2.2.1	Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>.....	42
2.2.2	Produção de Enzimas pelos <i>Aspergillus</i> spp.....	43
2.2.3	Uso de <i>Aspergillus</i> na dieta de ruminantes.....	45
2.2.4	Efeitos sobre a digestibilidade e microbiota ruminal.....	46
2.2.5	Potencial do <i>A. niger</i> e Co-cultivo com <i>A. oryzae</i>.....	49
2.2.6	<i>Aspergillus</i> spp. como estratégia para estresse térmico e estabilidade do pH ruminal.....	50
2.2.7	Considerações finais.....	51
2.3	Benefícios da suplementação com metionina rúmen-protégida para bovinos leiteiros.....	51
2.3.1	Metionina para bovinos leiteiros.....	53
2.3.2	Produtos comerciais.....	56

2.3.3 Metionina rúmen-protégida: benefícios para o período de transição e metabolismo lipídico.....	58
2.3.4 Efeito da metionina protégida da degradação ruminal sobre o consumo da matéria seca.....	61
2.3.5 Metionina rúmen-protégida: benefícios para a produção de leite e o teor de proteína no leite.....	62
2.3.6 Metionina: benefícios para síntese de gordura no leite.....	64
2.3.7 Efeito da metionina na população de microrganismos ruminais.....	65
2.3.8 Efeito da metionina para síntese proteica e metabolismo celular.....	66
2.3.9 Efeito da metionina rúmen-protégida no aproveitamento de nitrogênio.....	66
2.3.10 Efeito da metionina no desenvolvimento embrionário.....	67
2.3.11 Efeito da metionina protégida da degradação ruminal para o sistema imunológico.....	67
3 Artigos.....	68
3.1 Artigo 1.....	68
3.2 Artigo 2.....	102
3.3 Artigo 3.....	131
4 Considerações finais.....	147
Referências.....	149
Anexos.....	170
Anexo A.....	171
Anexo B.....	174

1 Introdução

Por razões relacionadas à fisiologia, forragens são os principais alimentos incluídos na dieta de ruminantes (GUO et al., 2022). As principais implicações fisiológicas estão relacionadas à ruminação e à salivação (BEAUCHEMIN, 2018; SERVA et al., 2021).

Os bovinos utilizam principalmente a língua para fazer a seleção e apreensão dos alimentos e estes, ao chegarem no rúmen, podem assumir dois trajetos: retornarem para a boca, para o processo de ruminação, o que normalmente acontece com partículas maiores, ou prosseguirem pelo trato digestório para omaso, abomaso e intestino (BEAUCHEMIN, 2018; REDDY e HYDER, 2023). O separador de partículas da Penn State, um conjunto de quatro peneiras desenvolvido pela Universidade da Pensilvânia, determina que essas partículas maiores possuem um tamanho $>19\text{mm}$ ou entre 8 a 19 mm e normalmente correspondem à porção volumosa da dieta, que ao chegarem no rúmen formam o mat ruminal, ocasionando a distensão da parede desse órgão. Esse estiramento ativa mecanorreceptores que, por sua vez, estimulam o processo de ruminação (CACCAMO et al., 2014; YANG e BEAUCHEMIN, 2006).

Na ruminação, as partículas maiores que estão localizadas na porção dorsal do rúmen, formando o mat ruminal, através de uma abertura da cárdia, retornam à boca para serem novamente mastigadas. Esse processo ocorre continuamente até que a partícula atinja um tamanho inferior a 1 mm (tamanho do orifício retículo omasal) e, assim, possa seguir para os demais compartimentos do trato digestório (WEIMER e HALL, 2020; LOCKARD et al., 2021).

Durante o processo de ruminação, ocorre o estímulo para a produção de saliva, que, por sua vez, lubrifica o bolo alimentar para que ocorra a deglutição. Sendo a saliva um líquido rico em tamponantes bicarbonato de sódio, fosfato e amônia, componentes que no rúmen, contribuem para a manutenção do pH dentro dos valores fisiológicos (DHIMAN et al., 2002; BEAUCHEMIN, 2018; AKULA et al., 2023).

O ambiente ruminal, em condições saudáveis, deve ser livre de oxigênio, apresentar uma temperatura de aproximadamente $39,2^{\circ}\text{C}$ e pH entre 6,0 a 7,0, condições essenciais para a sobrevivência dos microrganismos comensais (bactérias,

archeas, vírus, protozoários e fungos) que realizam digestão de nutrientes no rúmen, uma ação mediada por enzimas (PUNIYA et al., 2015; OWENS e BASALAN, 2016). Curtos momentos de acidez ruminal podem ocorrer algumas horas após a alimentação, caracterizando uma maior taxa de fermentação, no entanto, em menos de 5 horas, o rúmen deve ser capaz de voltar ao fisiológico, mantendo o pH na faixa de 6 e 7 (CASTRILLO et al., 2013; FANIYI et al., 2019; MINAMI et al., 2020).

Embora a fibra seja extremamente importante na dieta de vacas leiteiras, por garantir as condições ideais do ambiente ruminal, dietas compostas exclusivamente por fibras não suprem as demandas energéticas de vacas com elevada produção leiteira. A complexação entre lignina, celulose e hemicelulose (carboidratos estruturais das plantas), reduz a digestibilidade da fibra, fazendo com que o tempo de retenção ruminal seja insuficiente para o aproveitamento adequado dos nutrientes (NOUSIAINEN et al., 2009; ELGHANDOUR et al., 2023).

A lignina é um componente indigerível da parede celular, cuja fração corresponde a um dos componentes da fibra em detergente ácido (FDA), enquanto a fibra em detergente neutro (FDN) representa os carboidratos estruturais potencialmente digestíveis, (celulose, hemicelulose), além da própria FDA (KHUDYAKOVA e KOSOLAPOVA, 2022; STYPINSKI et al., 2024). Na formulação de dietas, a fração FDNi refere-se à porção indigestível da FDN, enquanto FDN_{fe} representa a fração da FDN capaz de estimular fisicamente a ruminação (KHUDYAKOVA e KOSOLAPOVA, 2022; CAVALLINI et al., 2023).

Alguns estudos buscaram alcançar níveis semelhantes de energia metabolizável em vacas alimentadas exclusivamente com forragem, no entanto, dietas altamente volumosas resultam em maior gasto energético na ruminação e maior preenchimento intestinal, o que será um fator limitador para o consumo (DONG et al., 2015). Reconhece-se que vacas leiteiras apresentam maior potencial produtivo quando suas dietas são adensadas em energia, por meio da inclusão de concentrado (PAUL, 1981).

Logo, ofertar uma quantidade excessiva de volumoso torna-se inviável, especialmente considerando que um dos objetivos da pesquisa se concentra em aumentar a eficiência alimentar, ou seja, reduzir o consumo de matéria seca sem comprometer e até elevando, a produção de leite (BRITO et al., 2021). A meta de eficiência alimentar gira em torno de 1,5 kg ou mais de leite para cada 1 kg de matéria seca consumida (DONG et al., 2015).

Para aumentar a eficiência alimentar, inicialmente, misturar concentrados com uma fonte de volumoso era a estratégia principal para atender às demandas energéticas de vacas em lactação (COPPOCK et al., 1980). Posteriormente, o primeiro artigo sobre dieta totalmente misturada (TMR) foi publicado no *Journal of Dairy Science* na década de 1950 (SCHINGOETHE, 2017). A TMR é projetada para fornecer nutrientes necessários para atender tanto às exigências nutricionais da vaca quanto da sua microbiota (DEVRIES e GILL, 2012).

As TMRs podem ser compostas por mais de um tipo de volumoso e diferentes tipos de concentrados formulados de acordo com as necessidades nutricionais dos animais. A umidade, de dietas de vacas de alta produção, deve ser superior a 45% da matéria seca, garantindo que os ingredientes sejam adequadamente misturados, o que evita a seleção alimentar no cocho e garante a ingestão uniforme de todos os componentes (SCHINGOETHE, 2017). Durante a fermentação ruminal da TMR, o volumoso é o principal substrato para a síntese de acetato e butirato, enquanto os concentrados são a principal fonte de propionato. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato constituem a principal fonte de energia para ruminantes (WANG et al., 2024).

Adicionalmente, visando aprimorar a eficiência alimentar, tamponantes, probióticos, incluindo os fungos *Aspergillus Oryzae* e *A. niger* e metionina protegida da degradação ruminal, podem ser incluídos nas TMRs. Detalhamentos específicos sobre essas estratégias serão apresentados nos tópicos subsequentes. Assim, o objetivo desta tese é apresentar os resultados obtidos em três estudos distintos: o primeiro avaliou a utilização de um blend de tamponantes composto por calcário calcítico, óxido de magnésio, algas calcárias e bicarbonato de sódio (BBA), comparado ao uso isolado de bicarbonato de sódio; o segundo avaliou a capacidade de uma formulação contendo *Aspergillus oryzae* e *A. niger* (AOAN) em melhorar a digestibilidade ruminal de três diferentes TMRs; e o terceiro, avaliou a estabilidade ruminal de uma metionina protegida.

2 Revisão de literatura

2.1 Acidose ruminal: uma revisão

O termo acidose ruminal é utilizado para definir a acidificação do pH do rúmen, geralmente decorrente da fermentação rápida de carboidratos (MONTEIRO e FACIOLA, 2020). No entanto, esse distúrbio vai além da queda do pH ruminal, provocando diversas alterações fisiológicas, incluindo a acidificação de outras porções do trato gastrointestinal (STEELE et al., 2016; NASROLLAHI, 2023).

Os primeiros relatos sobre acidose ruminal datam da década de 1940 (MERRILL, 1952; TURNER e HODGETTS, 1959). Entretanto, a classificação em suas formas subaguda e aguda, baseada na intensidade e na gravidade do distúrbio, foi proposta apenas décadas mais tarde (BRITTON e STOCK; 1987). Posteriormente, Cooper et al. (1999), definiram que a acidose ruminal subaguda é caracterizada pela manutenção do pH ruminal abaixo de 5,6 por 3 ou mais horas consecutivas, enquanto a forma aguda ocorre quando o pH atinge valores ainda mais baixos, inferiores a 5,2 (MONTEIRO e FACIOLA, 2020; ORTOLANI et al., 2021; GOLDER e LEAN; 2024).

Com o avanço dos conhecimentos em nutrição de ruminantes, ficou claro que a alimentação com fibras exerce um papel fundamental na prevenção da acidose ruminal. Para tanto, recomenda-se que a TMR contenha, no mínimo, 25% de fibra digestível na matéria seca (MS) e, adicionalmente que pelo menos 30% da TMR apresente partículas fisicamente efetivas, ou seja, com tamanho entre 8 a 19 mm, (ORTOLANI et al., 2021; CHRISTODOULOPOULOS, 2025; GRANT e COTANCH, 2023). Ainda assim, mesmo com esse conhecimento consolidado, estudos recentes demonstram que uma proporção significativa de vacas leiteiras apresenta algum grau de acidose nos primeiros 100 dias de lactação, com uma prevalência de 26,1% (GOLDER et al., 2023; GOLDER e LEAN, 2024). Além disso, estima-se que 83% das fazendas leiteiras possuam pelo menos um caso de acidose ruminal subaguda em vacas no início da lactação (HUOT et al., 2023).

Isso se deve, provavelmente, ao fato de ser praticamente inviável atingir elevados níveis de produção leiteira ofertando dietas compostas exclusivamente por fibras (STEELE et al., 2016; CHRISTODOULOPOULOS, 2025).

Embora a fibra desempenhe um papel crucial na manutenção da homeostase ruminal (por ser fermentada mais lentamente no rúmen e estimular a mastigação, a ruminação e a salivação, processos que favorecem o tamponamento do pH), a inclusão de concentrados na dieta torna-se indispensável para fornecer a energia exigida pela lactação (MONTEIRO e FACIOLA, 2020; RICCI et al., 2021; GRANT e COTANCH, 2023).

As maiores incidências de acidose ruminal subaguda tendem a ocorrer no início da lactação, período no qual a inclusão de elevados teores de concentrados na dieta se sobrepõe a uma microbiota ruminal ainda em processo de adaptação para digerir carboidratos rapidamente fermentáveis (RICCI et al., 2021). Entretanto, a acidose ruminal também ocorre em vacas no meio da lactação, geralmente associada a erros de manejo nutricional e operacional, cujos fatores de risco estarão nas seções subsequentes deste texto (VOULGARAKIS et al., 2023). Sendo assim, a presente revisão aborda aspectos importantes sobre fatores de risco, patogenia, sinais clínicos, perda em eficiência, diagnóstico e prevenção de acidose ruminal, com foco em adequações de manejo e utilização de tamponantes na dieta.

2.1.1 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de acidose ruminal

Alimentos concentrados são ricos em carboidratos não fibrosos (CNF), como amido, açúcares e pectina, que são rapidamente fermentados pelos microrganismos ruminais (GOLDER et al., 2023; PEREZ et al., 2024). A fermentação desses carboidratos gera, entre outros compostos, os ácidos graxos voláteis (AGV), também chamados de AGCC, que representam a principal fonte de energia para os ruminantes (PEREZ et al., 2024). No caso específico dos concentrados, o principal AGV produzido é o propionato (EVCI, 2024).

Em condições ideais de equilíbrio entre oferta de fibra e concentrado na dieta, a fermentação ruminal ocorre de forma eficiente, com manutenção do pH na faixa considerada ideal entre 5,8 a 6,8, a depender da dieta utilizada.

Nessas condições, aproximadamente 99% dos AGV produzidos no rúmen encontram-se na forma dissociada (ionizada), ou seja, como acetato, butirato e propionato e apenas cerca de 1% na forma não dissociada (ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico) (VOULGARAKIS et al., 2023; ORTOLANI et al., 2021). A forma dissociada é absorvida lentamente do rúmen para o sangue, devido a necessidade de proteínas carreadoras e está associada ao fluxo concomitante de íons bicarbonato do sangue para o rúmen, contribuindo para o tamponamento ruminal (BERCHIELLI et al., 2011). Aproximadamente metade do bicarbonato que chega no rúmen para o tamponamento vem do sangue e a outra metade da saliva. A forma não dissociada dos AGV passa para o sangue de forma rápida, por difusão passiva, do lugar mais concentrado, para o menos concentrado, sem a necessidade de proteínas transportadoras (BERCHIELLI et al., 2011; ORTOLANI et al., 2021).

Uma dieta desbalanceada quanto a oferta de volumoso e concentrado, pode causar acidose ruminal. Assim, a acidose aguda está mais associada à ingestão de grandes quantidades de alimentos concentrados em um curto período de tempo sem a prévia adaptação ruminal, enquanto a subaguda ocorre quando os animais consomem alimentos moderadamente fermentáveis por um longo período (EVCI, 2024).

É importante destacar que a velocidade da fermentação dos carboidratos no rúmen é altamente variável, como pode ser observado no Quadro 1. O amido do milho, por exemplo, tende a ser rapidamente fermentado, e seu risco acidogênico aumenta com processamentos como moagem, tratamento térmico e armazenamento com alta umidade, que tornam o amido mais acessível aos microrganismos (VIEIRA-NETO et al., 2021). Ainda assim, independente da fonte, a acidose ruminal poderá ocorrer se a oferta de carboidratos rapidamente fermentáveis for superior a 50% da MS da TMR (MONTEIRO e FACIOLA, 2020; EVCI, 2024; CHRISTODOULOUPOULOS, 2025).

Quadro 1. pH, tempo de fermentação ruminal, produção de AGV. Adaptado de Ortolani et al. (2021).

Tipo de alimentação	pH ruminal	Maior taxa de fermentação ruminal	Quantidade de ácido no líquido ruminal	Principal ácido produzido
Volumoso	6,3 a 7,1	7 horas após a alimentação	65mM/L	Ácido acético
60% volumoso: 40% concentrado	5,9 a 6,7	5 horas após a alimentação	85mM/L	Ácido acético e ácido propiônico Ácido lático é produzido, mas prontamente convertido a propiônico

Diminuição na oferta de forragens podem ocorrer por erros de manejo ou de forma acidental. Considerando esse fato, alguns fatores de risco para o desenvolvimento de acidose envolvem diminuição na partícula de alimentos, atraso na oferta da dieta, problemas no vagão misturador -o que pode tornar os bocados não homogêneos-, inadequada adaptação de animais a novas dietas, jejum prolongado, diminuição na oferta de proteína ou nitrogênio não proteico na dieta, além de, ausência de tamponantes em dietas com alto amido (GOLDER e LEAN, 2024; ORTOLANI et al., 2021).

O jejum prolongado por exemplo, pode levar a um consumo excessivo de concentrado na refeição subsequente, além de provocar um aumento do pH ruminal, aproximando-o de 7. Isso faz com que ocorra a redução populacional das bactérias que consomem ácido lático, tornando os animais propensos ao desenvolvimento de acidose ao se alimentarem com carboidratos de rápida fermentação (ORTOLANI et al., 2021).

A limitação de proteína ou de fontes de nitrogênio não proteico também é relevante, pois estes compostos são digeridos no rúmen em amônia, peptídeos e aminoácidos (BERCHIELLI et al., 2011). A amônia desempenha papel tamponante ao captar hidrogênios livres, além de ser utilizada na síntese de proteína microbiana. Esta por sua vez, funciona como um sumidouro seguro de hidrogênios no rúmen (EVCI, 2024; GOLDER e LEAN, 2024).

A adaptação dos animais à dieta é outro fator crucial. Segundo Ortolani et al. (2021), animais adaptados precisam consumir abruptamente 3% do peso vivo (PV) em concentrado para desenvolverem acidose aguda, enquanto animais não adaptados à dieta podem desenvolver a doença com a ingestão de apenas 1% do PV em concentrado.

2.1.2 Patogenia da Acidose ruminal e Impactos na Eficiência Produtiva

Quando altas proporções de concentrado estão disponíveis na dieta, a fermentação se torna mais rápida e o pH diminui. À medida que o pH se aproxima do valor de pKa (constante de dissociação) dos AVG, ocorre aumento na proporção de AGV na forma não dissociada, que é rapidamente absorvida por difusão passiva através do epitélio ruminal para o sangue. Esse mecanismo favorece a ocorrência de lesões de epitélio ruminal, diminuindo papilas e aumentando também os riscos de acidose metabólica (BERCHIELLI et al., 2011; MONTEIRO e FACIOLA, 2020).

Além disso, a fermentação desse tipo de alimento aumenta a viscosidade do líquido ruminal, prejudicando a eructação e eliminação de CO₂, molécula que ao interagir com a água no interior do rúmen forma ácido carbônico que se dissocia em bicarbonato e hidrogênio. Segundo Nashollahi (2023), esse processo contribui adicionalmente para a redução do pH ruminal, reforçando o papel acidogênico das dietas ricas em concentrados.

Quando alimentos concentrados predominam na dieta, bactérias atuam no processo de digestão rápida, conduzida principalmente por bactérias amilolíticas. A *Streptococcus bovis*, é uma bactéria que geralmente está presente em baixas concentrações no rúmen, se prolifera rapidamente quando há maior disponibilidade de amido.

Suas enzimas amilases degradam o amido em glicose (VOULGARAKIS et al., 2023; EVCI, 2024) que, por sua vez, serve de substrato para multiplicação exponencial dessa bactéria (CHEN et al., 2016). O principal produto da fermentação realizada por *S. bovis* é o ácido lático.

De forma semelhante, bactérias do gênero *Lactobacillus spp.*, também se proliferam sob condições de dietas com alto concentrado participando da conversão da glicose (proveniente da degradação do amido), em ácido lático (VOULGARAKIS et al., 2023). Por outro lado, os protozoários ciliados, outro grupo de microrganismos ruminais, fermentam o amido de maneira significativamente mais lenta. Esse processo envolve a fagocitose do grânulo de amido, que é digerido em ácido acético e butírico (BERCHIELLI et al., 2011). Através da enzima amilase, os protozoários podem levar até 16 horas para completar a digestão do amido, segundo Evci (2024). No entanto, sua eficiência é máxima em pH próximo de 6,0, e, portanto, durante episódios de acidose subaguda, sua participação na regulação do pH torna-se limitada (ELMHADI et al., 2022).

Ainda que o animal esteja passando por um quadro de acidose ruminal subaguda, o ácido lático formado durante a fermentação do amido é convertido pela via do acrilato em propionato, através da ação das bactérias *Megasphaera eldsenii* e *Selenomonas ruminantium*. Nessas condições, as concentrações de propionato durante acidose ruminal podem chegar a valores superiores a 30Mm/L (GOLDER e LEAN; 2024). Além disso, a *M. eldsenii* também converte ácido lático em outros ácidos graxos, como acetato, butirato, valerato e coproato, todos considerados sumidouros seguros de hidrogênio no rúmen. A elevação da concentração de valerato, um ácido graxo de cadeia ramificada, pode se tornar maior do que 2,4mM, fazendo dele um marcador sensível e específico para o diagnóstico de acidose ruminal (STEWART et al., 1997; NASHOLLAHI et al., 2017; SILBERBERG et al., 2024).

Essa dinâmica ocorre porque *M. eldsenii* e *S. ruminantium*, apresentam atividade ótima em pH próximo de 5,5. No entanto, quando o pH ruminal atinge valores iguais ou inferiores a 5,3, uma situação compatível com a acidose ruminal aguda, a atividade dessas bactérias é severamente inibida ou completamente nula (ORTOLANI et al., 2021). Esse fenômeno é agravado por dois outros fatores críticos. O primeiro é que as bactérias que consomem o ácido lático podem levar semanas para crescerem, enquanto *S. bovis* pode duplicar a população a cada 12 minutos.

O segundo fator, é o aumento expressivo da população de *Lactobacillus* sp. quando o pH atinge concentração igual ou menor a 5,3. Essa combinação de eventos favorece a rápida progressão do quadro de acidose ruminal aguda, caracterizada pelo acúmulo de ácido lático no rúmen, em concentrações que podem ultrapassar 40 a 100mM (MONTEIRO e FACIOLA, 2020; ORTOLANI et al., 2021; EVCI, 2024).

O ácido lático possui um pKa de 3,8, portanto, quanto mais próximo desse valor estiver o pH do rúmen, maior a proporção do ácido lático na forma não dissociada, o que favorece sua rápida absorção através do epitélio ruminal. No rúmen, ocorre a formação de dois estereoisômeros de ácido lático: o L-lactato e o D-lactato (BERCHIELLI et al., 2011). A forma L é idêntica à formada durante o exercício muscular e é rapidamente metabolizada no fígado e tecido cardíaco. Por outro lado, a forma D, não é produzida por tecidos de mamíferos, o que torna seu acúmulo especialmente preocupante, uma vez que sua metabolização é limitada. Além disso, parte do D-lactato absorvido ultrapassa a barreira hematoencefálica, causando depressão mental, apatia e decúbito, frequentemente observados em quadros de acidose aguda (BERCHIELLI et al., 2011; ORTOLANI et al., 2021).

Tanto na acidose subaguda quanto na aguda, observa-se aumento significativo da osmolaridade ruminal, conceito que se refere à concentração de solutos dissolvidos no líquido ruminal. Os principais solutos do rúmen responsáveis por esse aumento em condições de acidose são, AGV, o lactato e a glicose (EVCI, 2024). Normalmente, quando a alimentação é predominantemente composta por volumosos a osmolaridade do rúmen é de 240-265 mOsm/L e quando composta por concentrados pode chegar a 280-300 mOsm/L (OWENS et al., 1998). O aumento da pressão osmótica ruminal é detectada pelas paredes do retículo e do rúmen e isso inibe a ingestão de alimentos (KACHHADIA et al., 2023). Além disso, a digestão ruminal é inibida com o aumento da pressão osmótica, causando estagnação ruminal, o que leva ao acúmulo de ácidos e aumenta os riscos do desenvolvimento de acidose aguda (EVCI, 2024). Quando a osmolaridade ruminal excede a do plasma sanguíneo que varia de 285 a 310 mOsm/L (sendo as proteínas o principal soluto plasmático), ocorre um deslocamento de água do compartimento vascular para o interior do rúmen. Esse movimento hídrico compromete a absorção de AGV para a corrente sanguínea, agravando o desequilíbrio osmótico e ácido-base (EVCI, 2024). O acúmulo de ácidos no rúmen também estimula a atividade da enzima lactato desidrogenase, que converte piruvato em lactato, tornando a recuperação da acidose mais difícil (MILLEN et al., 2016).

Nos casos de acidose aguda, a osmolaridade ruminal frequentemente supera a osmolaridade plasmática. O influxo de água do sangue para o rúmen provoca lesões no epitélio, que podem resultar em um prejuízo na absorção de AGV por meses ou anos mesmo após a recuperação do animal (HUO et al., 2023).

Essas lesões também aumentam a permeabilidade do epitélio, permitindo a passagem paracelular de toxinas bacterianas para a corrente sanguínea, contribuindo para a elevação da osmolaridade plasmática. Essas toxinas são provenientes, em sua maioria, da lise de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., além de *Clostridium* spp (gram +) e *Fusobacterium necrophorum*. Essas bactérias, embora utilizem glicose derivada da fermentação do amido para o crescimento, são sensíveis ao pH ácido e à ação de outras bactérias que se proliferem durante a acidose, como *Bifidobacterium* (MARTINEZ et al., 2013).

O gênero *Bifidobacterium* pertencente às gram-positivas é produtor de ácido láctico e apresenta crescimento favorecido no rúmen em condições de acidose ruminal subaguda. Além disso, essas também são importantes produtoras de bacteriocinas, compostos antimicrobianos que contribuem para a morte de bactérias, com uma atuação ótima em uma faixa de pH de 4,8 a 5,5 (MARTINEZ et al., 2013).

Em resumo, a microbiota ruminal em condições fisiológicas é composta por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em situações de acidose ruminal ocorre um desequilíbrio, com predominância de gram-positivas, especialmente do filo *Firmicutes*, que inclui espécies como *S. bovis* e *Lactobacillus* spp., enquanto a população de gram-negativas sofre declínio (MONTEIRO e FACIOLA, 2020). Uma pesquisa sobre a população de bactérias de vacas alimentadas com alto concentrado foi conduzida por ZHANG et al. (2020) e os resultados são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Perfil microbiano ruminal de vacas alimentadas com 70% de concentrado na dieta. Adaptado de Kozloski (2009) e Zhang et al. (2020)

Espécie	Gram	Concentração Ruminal	Produtos da fermentação
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	-	Diminuiu	Acetato
<i>Ruminococcus albus</i>	+	Aumentou	Acetato
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	Aumentou	Acetato
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	Aumentou	Lactato
<i>Bifidobacterium</i> sp.	+	Aumentou	Lactato
<i>Clostridium leptum</i>	+	Aumentou	Utilizadoras de Lactato através do qual produzem butirato

Algumas substâncias com potencial tóxico que aumentam no rúmen durante a acidose são os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana, liberados a partir da morte de bactérias gram-negativas, e a histamina, resultante da descarboxilação de aminoácidos como a histidina, em um processo favorecido pela lise de *Clostridium* spp. e por condições de pH ácido (VOULGARAKIS et al., 2023; EVCI, 2024). A toxicidade do LPS está diretamente relacionada à composição do seu lipídeo A, que é o que ativa a resposta imune (MONTEIRO e FACIOLA, 2020). Vacas com acidose ruminal subaguda apresentam um aumento no LPS ruminal de 24.547 EU, para 128.825 EU/mL, enquanto na acidose aguda essa concentração pode chegar a 408 EU/mL (ANDERSEN et al., 1994; LI et al., 2012). O aumento do LPS ruminal está associado ao desenvolvimento de rumenite, abscessos hepáticos e trombose da veia cava caudal e epistaxe, além de broncopneumonia e laminita (ZHAO et al., 2018, ORTOLANI et al., 2021).

Embora o LPS seja um ponto importante, a histamina e outros fragmentos microbianos devem ser considerados na patogenia de acidose (STEELE et al., 2016). Tanto a histamina, quanto o LPS ocasionam lesões vasculares nas lâminas do casco, gerando claudicação, dor e reações inflamatórias (ORTOLANI et al., 2021).

O LPS se liga a receptores específicos na membrana das células do epitélio ruminal, sendo o principal o TLR4 - toll-like receptor 4 -, o que desencadeia um processo de sinalização celular. Uma das vias de sinalização ocorre através do fator nuclear Kappa β (NF- $K\beta$), que está normalmente no citoplasma das células, inativo, ligado ao seu inibidor o $I\kappa B\alpha$ (ZHAO et al., 2018). Após o estímulo como o LPS, o $I\kappa B\alpha$ é degradado, liberando o NF- $K\beta$, que no núcleo das células, estimula a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina - 6 (IL-6), interleucina β (IL- β) (ELMHADI et al., 2022).

A produção de citocinas inflamatórias também pode ser mediada por algumas enzimas, que são as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Exemplo dessas enzimas são: c-Jun N-terminal kinase (JNK) e p38 MAPK (KI et al., 2013). A ação de citocinas inflamatórias acaba sendo exacerbada, então ainda que estas auxiliem no recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos, também contribuem para o dano tecidual, por interferirem na regeneração do epitélio, favorecendo apoptose celular (ZHAO et al., 2018; VOULGARAKIS et al., 2023). Por isso o LPS está associado ao desenvolvimento de rumenite, ainda que o epitélio do rúmen seja considerado resistente (STEELE et al., 2016). Essa via de absorção do LPS, é denominada de transcelular e também pode ocorrer no intestino, como será abordado a seguir (STEELE et al., 2016; MONTEIRO e FACIOLA, 2020; NASHOLLAHI, 2023).

O aumento da pressão osmótica no rúmen leva ao acúmulo de líquidos nesse compartimento, promovendo disfunção da motilidade ruminal e favorecendo a passagem acelerada de conteúdo não digerido para o intestino, aumentando nesse caso, também a osmolaridade intestinal e reduzindo o pH do trato digestivo posterior (KLEEN et al., 2003; HUOT et al., 2023; CHRISTODOULOPOULOS, 2025).

A presença excessiva de amido não fermentado no intestino delgado e grosso pode comprometer a digestibilidade, resultando em menor eficiência alimentar e intensificação do quadro ácido no lúmen intestinal. Além disso, a elevada carga osmótica, associada ao acúmulo de líquidos e à integridade prejudicada do epitélio intestinal, favorece o desenvolvimento de diarreia.

Embora esse quadro clínico seja frequentemente interpretado como sinal de agravamento, ele pode, paradoxalmente, representar um mecanismo compensatório, já que parte da água sequestrada no rúmen passa a ser eliminada e pode ser reabsorvida nos segmentos intestinais (ORTOLANI et al., 2010). Ainda assim, a diarreia promove maior perda de nutrientes, incluindo amido, que passa a ser excretado nas fezes.

Fezes de animais com acidose frequentemente apresentam características anormais, como grãos visivelmente inteiros, com partículas entre 1 e 2 cm, tamanho superior ao observado em animais saudáveis, cujas fezes contêm partículas em torno de 0,5 cm (KLEEN et al., 2003). Além da presença de partículas mal digeridas, podem ser observados muco, bolhas resultantes de fermentação e até mesmo sangue, em decorrência de lesões na mucosa intestinal (CHRISTODOULOPOULOS, 2025; STEELE et al., 2016).

Para compreender a razão pela qual a acidose ruminal compromete o aproveitamento do amido, é importante considerar que o amido não é inteiramente aproveitado pelo animal, ainda que este esteja saudável. No caso do grão de milho que possui aproximadamente 72% de amido, por exemplo, 58% a 82% é digerido no rúmen, 5 a 17% no intestino delgado, aproximadamente 1 a 8,2% no intestino grosso e menos de 3% devem ser excretados nas fezes (BERCHIELLI et al., 2011; FERRARETTO et al., 2017; NASEM, 2021; EVCI, 2024). Para que essas porcentagens em cada órgão sejam mantidas, o pH precisa estar fisiológico, ou seja, faixa de pH ruminal 6 a 7 (PEREZ et al., 2024) ou 5,8 a 7, que é essencial para que ocorra a ação de enzimas amilases. No intestino delgado, para que ocorra a ação da enzima alfa-amilase pancreática e das enzimas liberadas pela própria mucosa intestinal, que são maltase e isomaltase, o pH precisa estar na faixa de 5,8-6,2, e ser estável para que posteriormente, no intestino grosso, possa ocorrer uma fermentação semelhante a que acontece do rúmen (BERCHIELLI et al., 2011; EVCI, 2024).

No que se refere ao LPS, Li et al. (2012), demonstraram um aumento significativo de LPS no intestino de vacas com acidose subaguda, com elevação de 16.508 para 118.522 unidades endógenas (UE) por grama de digesta úmida.

Esse LPS também pode ser absorvido do intestino para o sangue por via paracelular e transcelular (STEELE et al., 2016). Toda essa absorção de toxinas do rúmen para a corrente sanguínea pode contribuir para o aumento dos níveis circulantes de amiloide A, ceruloplasmina e haptoglobina, que são proteínas de fase

aguda positiva, bem como, para a redução da paraoxonase, proteína de fase aguda negativa. Essas alterações bioquímicas constituem biomarcadores úteis para avaliar o status inflamatório de vacas acometidas por acidose ruminal (ZHAO et al., 2018; ORTOLANI et al., 2021; PALHANO et al., 2024).

Durante a acidose ruminal, observa-se um aumento da pressão osmótica sanguínea, resultado da absorção de toxinas bacterianas pela parede ruminal e intestinal, da entrada de AGV e glicose na circulação e da desidratação decorrente tanto da diarreia quanto do sequestro de água para o interior do rúmen (EVCI, 2024). Logo, animais com acidose clínica podem apresentar desidratação grave, acompanhada de redução acentuada na produção urinária, evoluindo para anúria em casos mais severos.

Em relação à produção de leite, casos mais severos de acidose ruminal podem comprometer tanto o volume quanto a composição do leite produzido. A desidratação, a redução no consumo de matéria seca e a morte das bactérias fibrolíticas, que ocorre quando o pH ruminal cai abaixo de 6, estão entre os principais fatores responsáveis desse comprometimento (PEREZ et al., 2024; SILBERBERG et al., 2024). A glândula mamária, por sua vez, exige um aporte de cerca de 800 litros de sangue para produzir um litro de leite (FACTORY et al., 2015). O acetato, produzido principalmente a partir da fermentação de fibras, é necessário para a síntese de gordura do leite (GOLDER et al., 2023; SILBERBERG et al., 2024; CHRISTODOULOPOULOS, 2025). Além disso, sob condições de pH ácido, a conversão do ácido linoleico em ácido esteárico é prejudicada, favorecendo a formação de isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente o isômero trans-10, cis-12. Esse composto tem efeito inibitório direto sobre a síntese de gordura na glândula mamária, impactando negativamente a composição lipídica do leite (ORTOLANI et al., 2021).

O Quadro 3 mostra alguns dos sinais clínicos de acidose ruminal.

Quadro 3. Acidose aguda e subaguda e seus respectivos sinais clínicos. Adaptado de Kleen et al. (2003), Ortolani et al. (2021) e Evci (2024).

Classificação da Acidose:	Sinais clínicos:	Tempo para o surgimento
Aguda	• Anorexia	3 horas após alimentação
	• Atonia ruminal	8 horas após alimentação
	• Desidratação; • Frequência cardíaca aumentada; • Extremidades frias; • Temperatura corporal inferior a 37°C; • Risco de choque hipovolêmico; • Aumento abdominal pela presença de fluídos no interior do rúmen.	12 horas após alimentação
	• Decúbito esternal	14 horas após alimentação
	• Diarreia	15 horas após a alimentação
	• Secreção nasal serocatarral	16 horas após a alimentação

Subaguda	<ul style="list-style-type: none"> Redução no consumo em 70% 	12 horas após a alimentação;
	<ul style="list-style-type: none"> Diarreia com a presença de grãos; Apatia; 	24 horas após a alimentação;
	Outros sinais: claudicação, baixo escore de condição corporal, produção de leite reduzida, redução na gordura do leite, deslocamento de abomaso, abscessos hepáticos, laminita.	
Indicadores de acidose ruminal subaguda no rebanho:		
<p>¹Incidência de laminita >10% no rebanho;</p> <p>Ruminação <40% das vacas do rebanho estão ruminando, 6 horas após a alimentação;</p> <p>Relação gordura proteína 1:1 em mais do que 10% do rebanho;</p>		

¹Por décadas, levantou-se a hipótese de que o aumento das concentrações de LPS, decorrente da acidose ruminal subaguda, estaria associado a maior incidência de claudicação e laminita em bovinos (ZHAO et al., 2018; ORTOLANI et al., 2021). No entanto, estudos recentes questionam essa relação. Palhano et al. (2024) observaram baixa correlação entre dietas ricas em carboidratos não fibrosos (CNF) e a ocorrência de laminita. Cabe destacar que esse estudo avaliou o pH ruminal em um único ponto, com média de $5,9 \pm 0,03$ para animais submetidos à dieta rica em CNF, impossibilitando a confirmação de acidose ruminal subaguda nos animais. Ademais, seria relevante complementar os dados com a mensuração das concentrações de LPS intra-ruminais e sistêmicas, a fim de verificar se o pH ruminal afetou a viabilidade das bactérias Gram-negativas. Portanto, são necessários estudos adicionais para esclarecer se a acidose ruminal subaguda está efetivamente relacionada ao desenvolvimento de laminita.

2.1.3 Diagnóstico de acidose ruminal

Para diagnóstico, além do exame clínico e dos biomarcadores que já foram mencionados anteriormente, uma medida usada desde 1950 é a avaliação do líquido ruminal. A amostra pode ser obtida por sonda (com descarte do primeiro litro para evitar contaminação salivar), ruminocentes ou por meio de cânulas.

Um pH ácido, presença de grãos, consistência aquosa e coloração acinzentada do conteúdo ruminal são alterações físicas que indicam acidose (GOLDER e LEAN, 2024; PEREZ et al., 2024; SILBERBERG et al., 2024).

Nos casos de diagnóstico de rebanho, pode ser aferido o pH ruminal de doze vacas, entre os 45 e 150 dias de lactação, sendo indicativo de problema se duas dessas vacas estiverem com pH ruminal menor do que 5,5 (ORTOLANI et al., 2021; CHRISTODOULOPOULOS, 2025). Como ferramenta, principalmente de pesquisa, bolus que aferem o pH a cada 10 minutos ou 15 minutos podem ser utilizados. Esses bolus em função do peso ficam geralmente retidos no retículo e um ponto de corte mais alto de pH é utilizado para definir acidose ruminal subaguda - pH \leq 6,0 por >300 minutos/dia ou > de 5 horas/dia (BACH et al., 2023; HUOT et al., 2023; SILBERBERG et al., 2024). Isso porque o pH reticular é menos afetado em relação ao do rúmen quando há acidose ruminal. A diferença entre o pH do retículo e do rúmen, é de aproximadamente 0,24 unidades (NASHOLLAHI, 2023).

Além do pH, testes indiretos que estimam a atividade microbiana no rúmen como a prova de sedimentação e flutuação podem ser utilizados. Para isso, cerca de 10 mL de líquido ruminal são colocados em um tubo Falcon e mantidos à temperatura ambiente. Em animais saudáveis, observa-se a separação do conteúdo em duas fases distintas em aproximadamente 4 a 8 minutos, o que reflete uma microbiota ativa. Tempos superiores a 10 minutos podem indicar disfunção microbiana, como ocorre em quadros de acidose subaguda ou aguda (VOULGARAKIS et al., 2023).

Outro exemplo é a prova de redução do azul de metileno, que avalia a capacidade redutora das bactérias anaeróbias estritas presentes no rúmen. Em condições fisiológicas normais, a coloração azul é reduzida (desaparece) em até 5 minutos após a adição do corante. Tempos de redução prolongados sugerem comprometimento da atividade fermentativa, como observado em casos de acidose ou outras disbioses ruminais (VOULGARAKIS et al., 2023).

O pH fecal, como ferramenta diagnóstica, deve ser aferido imediatamente antes da refeição (KHORRAMI et al., 2022). Vacas saudáveis devem estar com o pH fecal próximo a 7,2, pois valores inferiores a 6,5 indicam acidose ruminal subaguda e inferiores a 4,9, quadro clínico de acidose ruminal aguda (ENEMARK et al., 2008; MARUTA et al., 2008; DANSCHER et al., 2015; ORTOLANI et al., 2021; KHORRAMI et al., 2022).

A hemogasometria pode ser uma importante ferramenta hospitalar e de pesquisa. Por meio dessa abordagem é possível verificar o pH do sangue, que estará reduzido (menor do que 7,35) quando houver maior absorção de ácidos para a corrente sanguínea. Inicialmente o bicarbonato também pode estar baixo, devido a demanda por tamponamento (15 mEq/L). De acordo com a cronicidade do caso, o bicarbonato pode se elevar, devido a uma ação compensatória renal, que ocorre, para diminuir a excreção do bicarbonato e aumentar o tamponamento sanguíneo (ORTOLANI et al., 2021; VOULGARAKIS et al., 2023). Ainda, pode haver em decorrência da acidose metabólica, um aumento compensatório da frequência respiratória, que ocorre para aumentar a eliminação de CO₂ (tornando-o menor do que 35 mmHg). O CO₂ no sangue capta duas moléculas de hidrogênio, formando o ácido carbônico, que se dissocia em hidrogênio e bicarbonato. Logo, a taquipneia resultará em diminuição de CO₂, consequentemente, diminuindo o ácido carbônico (GOLDER e LEAN et al., 2021; VOULGARAKIS et al., 2023).

Parâmetros metabólicos como β-hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados (NEFA) podem aumentar devido ao baixo consumo de alimento. Análises comportamentais, por meio de sensores podem auxiliar no diagnóstico, considerando que animais com acidose reduzem o tempo de mastigação em 37% (ANTANAITIS et al., 2024; CHRISTODOULOPOULOS, 2025), o tempo de ruminação fica inferior a 500 minutos (BEAUCHEMIN, 2018; GRANT e COTANCH, 2023). Além disso, vacas alimentadas com dietas ricas em concentrado podem apresentar, inicialmente, um tempo de alimentação reduzido.

Nos quadros de acidose subaguda ou aguda, a ingestão torna-se mais lenta e prolongada, permanecendo alterada até que o pH ruminal seja restabelecido. Em condições fisiológicas, o tempo médio de alimentação de uma vaca saudável varia entre 2,4 e 8,5 horas por dia (WHITE et al., 2017; SILBERGERG et al., 2024). A taxa de consumo de animais que recebem dietas altas em concentrado é maior, ou seja, os animais comem mais em um curto intervalo de tempo (SILBERGERG et al., 2024).

Segundo Beauchemin (2018), o tempo de ruminação e alimentação se comportam de maneira oposta, ou seja, vacas que passam menos tempo comendo, ruminam mais. Essa resposta pode estar relacionada com à menor redução no tamanho de partículas durante a ingestão rápida (WEIMER e HALL, 2020). No entanto, essa relação não é sempre verdadeira, pois algumas vezes as vacas podem passar mais tempo comendo por estarem selecionando o alimento sem que isso comprometa a ruminação (GRANT e FERRARETTO, 2018).

2.1.4 Métodos de prevenção

Para prevenir quadros de acidose ruminal, alguns pontos devem ser considerados, dentre eles a adaptação gradual às dietas ricas em concentrado e o estímulo da salivação (ORTOLANI et al., 2021). Para estimular a salivação é necessária a inclusão de volumoso na dieta. O volumoso pode ser oferecido na forma de TMR para evitar o comportamento de seleção de partículas menores. Além disso, em um vagão misturador, a dieta deve ser misturada por pelo menos 5 minutos e em caso de matéria seca muito alta, para evitar a segregação de partículas e seletividade, deve-se acrescentar água (160 g/kg/MS) no vagão misturador (ORTOLANI et al., 2021; CHRISTODOULOPOULOS, 2025).

Na TMR a fibra em detergente neutro deve representar 28 a 34% da MS, com pelo menos 19 a 21% proveniente de fontes de forragem (BEAUCHEMIN, 2005; CHRISTODOULOPOULOS, 2025). A relação forragem-concentrado deve ser de 60:40 e 50:50 (HOLLAND et al., 1990; CHRISTODOULOPOULOS, 2025). Além disso, 20 a 30% da matéria seca total deve corresponder a FDN fisicamente efetiva (MUTSVANGWA et al., 2002; CHRISTODOULOPOULOS, 2025).

2.1.5 Tamponantes ruminais como ferramentas de prevenção da acidose ruminal

Os tamponantes são alternativas que também podem ser utilizadas na prevenção de acidose ruminal. Entre eles, o bicarbonato de sódio é um dos mais estudados. O pKa do bicarbonato de sódio é de 6,25, o que proporciona uma boa ação tamponante até o pH de 5,7. Abaixo desse limite, sua atividade reduz significativamente (ORTOLANI et al., 2021).

A dose recomendada é de 1% a 1,5% da matéria seca, permitindo que o bicarbonato de sódio eleve o pH em até 0,13 unidades, através da captação de um hidrogênio livre no ambiente ruminal para formar ácido carbônico (ROSSI et al., 2019; ORTOLANI et al., 2021). No entanto, a alta solubilidade do bicarbonato faz com que sua ação seja de curta duração (CRUYWAGEN et al., 2015; ROSSI et al., 2019; ORTOLANI et al., 2021).

O *Lithothamnium calcareum*, uma alga marinha rica em carbonato de cálcio e magnésio, tem sido proposta como uma alternativa ao bicarbonato de sódio em dieta de ruminantes. O carbonato de cálcio presente nessa alga possui um pKa de 9,0, enquanto o do magnésio é de 6,0 (ORTOLANI et al., 2021). A estrutura microscópica dessas algas, semelhante a um favo de mel, contribui para a liberação gradual de minerais em ambientes ácidos (KUMAR et al., 2024). O carbonato de cálcio encontrado no *Lithothamnium calcareum* pode estar presente nas formas cristalinas de calcita (65%), aragonita (23%) e vaterita (12%), cada uma com diferentes solubilidades ruminais, o que influencia diretamente sua capacidade tamponante (CRUYWAGEN et al., 2015; NEVILLE et al., 2022). A aragonita, por exemplo, apresenta maior solubilidade que a calcita (SAVELA et al., 2025). A dose recomendada de *Lithothamnium calcareum* é normalmente metade da recomendada para o bicarbonato de sódio, sendo 0,4% da matéria seca uma dosagem comumente adotada (CRUYWAGEN et al., 2015).

Além disso, o carbonato de cálcio e o magnésio apresentam capacidade alcalinizante, com o primeiro captando dois hidrogênios para formar o ácido carbônico (ROSSI et al., 2019). O magnésio, por sua vez, em meio aquoso, se liga a dois hidrogênios formando hidróxido de magnésio (AMARAL et al., 2007). A solubilidade do magnésio, dependendo de seu formato (óxido, hidróxido ou carbonato), pode variar, o que afeta seu efeito alcalinizante (ARCE-CORDERO et al., 2021; LOBO et al., 2023). A dose recomendada de óxido de magnésio varia entre 0,3% e 0,5% da matéria seca da dieta (NEIDERFER et al., 2020).

O calcário é outra alternativa para tamponamento ruminal, com baixa solubilidade, mas capaz de reagir com íons hidrogênio, especialmente quando o pH do rúmen está abaixo de 5,5. Acima desse limite, sua ação tamponante é reduzida (KUMAR et al., 2024).

Em resumo, o bicarbonato de sódio tem sido o principal tamponante utilizado em dietas bovinas, mas devido à sua alta solubilidade, alternativas como calcário calcítico, óxido de magnésio e carbonato de cálcio, com menor solubilidade e maior capacidade de capturar íons hidrogênio, podem ser mais eficazes.

A resistência dessas substâncias no ambiente ruminal pode permitir sua ação em segmentos posteriores do trato gastrointestinal, contribuindo também para o tamponamento no intestino e ampliando seus efeitos fisiológicos (ELMHADI et al., 1988; NEIDERFER et al., 2020; BACH et al., 2023; KUMAR et al., 2024). Isso pode ser crucial para manter a atividade das enzimas que digerem o amido e reduzir sua excreção fecal.

A combinação dessas substâncias pode ser uma estratégia benéfica, como demonstrado por Neiderfer et al. (2020), que ao combinar carbonato de cálcio com óxido de magnésio, encontrou aumento no pH fecal, ao contrário do que ocorreu com o uso isolado de bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio.

2.2 Uso dos fungos do gênero *Aspergillus* como Aditivo Nutricional para bovinos leiteiros: uma novidade?

Inúmeros estudos têm se concentrado em melhorar a digestão ruminal ou total de vacas leiteiras por meio do uso de aditivos, que, por sua vez, podem contribuir para o aproveitamento eficiente dos nutrientes, atuando na modulação dos microrganismos ruminais (SEO et al., 2010). Dentre esses aditivos, os prebióticos ganharam destaque devido à crescente conscientização da população sobre os riscos associados ao uso de antibióticos.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis, seletivamente utilizados por microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (GIBSON et al., 2017; MARKOWIAK e ŚLIŻEWSKA, 2018). Eles podem ser produzidos a partir de fungos ou bactérias e, quando adicionados à dieta de ruminantes, tendem a promover um ambiente ruminal mais saudável, melhorar a eficiência de conversão alimentar e aumentar a produtividade (PODVERSICH et al., 2023). Nesse contexto, os fungos *Aspergillus oryzae* (AO) e *Aspergillus niger* (AN) têm sido estudados como prebióticos e também classificados como DFM (Direct-Fed Microbials), microrganismos não bacterianos suplementados na alimentação animal (HIGGINBOTHAM et al., 1994; ALTOP et al., 2018).

Os fungos *Aspergillus* spp. foram bastante estudados entre as décadas de 70 e 90, porém os resultados inconclusivos resultaram em uma diminuição no número de pesquisas. Entretanto, o potencial de produção enzimática desses fungos, faz ressurgir o interesse em usá-los como aditivo alimentar. Acreditamos, que essa revisão reúne os principais aspectos sobre a utilização desse fungo na indústria alimentar de ruminantes. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em revisar e discutir os potenciais efeitos nutricionais do uso de fungos do gênero *Aspergillus* como aditivo na alimentação de bovinos leiteiros, considerando suas propriedades enzimáticas, os impactos na microbiota ruminal e suas perspectivas de aplicação prática na produção leiteira.

2.2.1 Fungos do gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus*, que compreende cerca de 185 espécies, tem sido amplamente estudado ao longo das últimas décadas. Esses fungos filamentosos e aeróbicos se reproduzem de forma assexuada (através da formação de conídios ou esporos), e estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser isolados do solo, de restos de plantas em decomposição (como o arroz, de onde deriva o nome *A. oryzae*), de ambientes internos, de oceanos e até do espaço (MOJSOV et al., 2016; YU et al., 2021). Os *A. niger* e *A. oryzae* são considerados seguros, pois não produzem micotoxinas prejudiciais à saúde, como as aflatoxinas produzidas por outras espécies do gênero. A abundância desses fungos na natureza, associada à facilidade de cultivo, despertou grande interesse industrial, fazendo do gênero *Aspergillus* o mais utilizado na indústria de alimentos e produtos farmacêuticos (MOJSOV et al., 2016).

Os *Aspergillus* spp. caracterizam-se por apresentarem rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo (HASAN et al., 2006). O seu cultivo pode ocorrer em uma grande variedade de substratos, incluindo meios líquidos à base de produtos lignocelulósicos, amido, gordura, glicose, maltose, xilana, xilose e sorbitol, bem como por meio de fermentação em estado sólido, utilizando materiais como palha de trigo e farelo de trigo (FERREIRA et al., 2016; SAR et al., 2021; YU et al., 2021). Comercialmente, são utilizados meios como agar Czapek, com temperatura ideal entre 25 e 37°C, ou ágar extrato de malte incubado por sete dias a 25°C (BATT, 2014). A temperatura ótima de crescimento do *A. oryzae* varia entre 32 a 36°C, com pH entre

2 a 8 (BATT, 2014), enquanto *A. niger* apresenta ampla faixa de tolerância, crescendo entre 6 a 47°C e pH de 1,4 a 9,8 (SCHUSTER et al., 2002).

2.2.2 Produção de Enzimas pelos *Aspergillus* spp.

Em meios de cultura, os fungos *Aspergillus* spp. produzem enzimas que são secretadas no meio extracelular, atuando na conversão de fontes de carbono, especialmente de origem vegetal, em partículas menores, que podem ser absorvidas para o meio intracelular durante o processo de alimentação fúngica (OXENBØLL, 1994; HU et al., 2011). Industrialmente, essas enzimas são amplamente utilizadas para conservação e modificação de características organolépticas, conferindo sabor, textura, digestibilidade, além de agregarem valor nutricional a alimentos e bebidas, como por exemplo pães, queijos, sucos de frutas, vinhos, cervejas, saquê e shoyu (BATT, 2014; UWINEZA et al., 2024). As enzimas de origem fúngica apresentam vantagens em relação às produzidas por animais e plantas, especialmente devido à maior estabilidade e grande variabilidade catalítica (HASAN et al., 2006). Essas enzimas participam da decomposição de moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares e proteínas em aminoácidos, desempenhando papel central em diversos processos bioquímicos (HASAN et al., 2006). Dentre as enzimas produzidas pelos fungos *A. oryzae* estão alfa-amilase, protease, xilanase e celulase; enquanto *A. niger* produz celulase, hemicelulase, protease, xilanase, pectinase e tanase (LI et al., 2022). Uma revisão sobre a função de algumas dessas enzimas pode ser encontrada no Quadro 5.

Quadro 5. Enzimas produzidas por fungos *Aspergillus* spp. Adaptado de Mojsov et al. (2016)

Enzima	Fonte	Ação
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	Grupo de enzimas que degradam as substâncias pécticas da parede celular. Uma substância péctica é um polissacarídeo composto por ácido D-galacturônico na ligação alfa-1,4. Essa enzima divide o ácido poligalacturônico em ácido monogalacturônico, abrindo as ligações glicosídicas. Esse processo amolece a parede celular. Pectinases podem ser hidrolases, liases ou esterases. Hidrolases realizam hidrólise do ácido péctico. Lases degradam o ácido péctico por uma reação de eliminação. Esterases são enzimas que clivam a ligação metil éster da pectina.
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Grupo de enzimas que degradam o amido, por meio da hidrólise de ligações glicosídicas alfa-1-4 e alfa-1-6 dos polissacarídeos tornando o açúcar mais simples.
	<i>Aspergillus oryzae</i>	
Celulases	<i>Aspergillus niger</i>	Grupo de enzimas que hidrolisam as ligações beta-1,4 de cadeias de celulose, liberando oligossacarídeos, celobiose e glicose.
	<i>Aspergillus oryzae</i>	
β-glucanases	<i>Aspergillus</i> sp.	Grupo de enzimas que digerem β-glucan, um componente polissacarídeo encontrado na parede celular de plantas como aveia, cevada, milho, arroz, centeio, trigo e sorgo.

Proteases	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas.
Lipases	<i>Aspergillus</i> sp.	Catalisam a hidrólise do triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos.

2.2.3 Uso de *Aspergillus* na dieta de ruminantes

A utilização dos fungos *Aspergillus* sp. na dieta de ruminantes ainda é pouco explorada, embora alguns experimentos tenham sido realizados para avaliar a utilização do *A. oryzae*, especialmente entre as décadas de 1970 e 1990. Ainda assim, é possível encontrar alguns produtos disponíveis no mercado de nutrição de ruminantes, como o extrato da fermentação do *A. oryzae*, comercializado como Amaferm® (BioZyme Inc., St. Joseph, MO, EUA), e o co-cultivo de *A. niger* e *A. oryzae* (AOAN), presente no produto Fibrase™ (Balchem Animal Nutrition & Health, NY, EUA) (UWINEZA et al., 2024; CANTET et al., 2024).

O *Aspergillus oryzae* é o fungo comestível mais estudado na nutrição de ruminantes, devido à sua atividade enzimática capaz de auxiliar a microbiota ruminal na digestão dos nutrientes (KARIMI et al., 2021; SAR et al., 2021). Além disso, existe uma especulação a respeito da utilização da biomassa de fungos filamentosos como alternativa de suplementação proteica, uma vez que *A. Oryzae* apresenta na sua composição entre 40 a 62% de proteína bruta, sendo que de 30 a 36% dessa fração corresponde a aminoácidos essenciais, como arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina e valina (KARIMI et al., 2021; SAR et al., 2021). Entretanto, a viabilidade econômica de uma produção em larga escala, destinada ao uso como suplemento proteicos, ainda necessita ser melhor avaliada.

2.2.4 Efeitos sobre a digestibilidade e microbiota ruminal

Os principais efeitos associados ao uso de *A. Oryzae* ou de seu extrato de fermentação, estão relacionados à produção de enzimas digestivas, fundamentais para a digestão dos alimentos no rúmen (TRICARICO et al., 2008). Isso acontece porque o micélio fúngico contém compostos bioativos, como biotina, tiamina, ácidos graxos de cadeia ramificada, niacina e piridoxina, que estimulam a liberação de enzimas bacterianas e são essenciais para o crescimento de bactérias fibrolíticas (BEHARAKA e NAGAJARA, 1998; LUBIS et al., 2002; UWINEZA et al., 2024). Entre esses compostos, destaca-se o ácido valerato, que é utilizado para o crescimento da bactéria *Fibrobacter succinogenes* (BEHARAKA e NAGAJARA, 1998). Além disso, a concentração da bactéria *Megasphaera elsdenii* que é utilizadora de ácido lático, também aumenta com a suplementação de *A. oryzae* (BEHARAKA e NAGAJARA, 1998). Estudos clássicos como o de Wiedmeier et al. (1987), demonstraram que a suplementação com 2,3 g/dia de *A. oryzae* aumentou em 27% a concentração de bactérias celulolíticas no rúmen. Resultados similares foram observados por Fondevila et al. (1990), que relataram maior desaparecimento de fibra ruminal em dietas de vacas leiteiras suplementadas com *A. oryzae*, atribuído ao aumento de bactérias fibrolíticas.

Outro fator associado à contribuir para o aumento na concentração de bactérias ruminais é a maior digestibilidade dos nutrientes no rúmen (KONG et al., 2021). Gomez-Alarcon et al. (1990) observaram que o *A. oryzae* aumenta a digestibilidade da proteína bruta no rúmen, resultando em uma maior concentração de amônia.

A amônia, juntamente com aminoácidos e peptídeos derivados da degradação proteica, serve como fonte nitrogenada para a síntese de aminoácidos, proteína microbiana e multiplicação celular bacteriana (BERCHIELLI et al., 2011). Corroborando esses achados, Kong et al. (2021) observaram que a suplementação com o co-cultivo *A. niger* e *A. oryzae* elevou a digestibilidade de proteína bruta e a concentração de bactérias ruminais, além de reduzir a concentração de amônia, sugerindo que a amônia foi eficientemente utilizada na síntese de proteína microbiana.

Um estudo de 1970 demonstrou que a suplementação com fungos exógenos também promoveu o aumento da população fúngica no rúmen. Esses microrganismos, embora menos estudados, também produzem enzimas envolvidas na digestão de fibras e podem estar associados ao processo de crescimento e multiplicação de bactérias fibrolíticas no rúmen (PRLLI'GE et al., 1979). Esse efeito parece estar relacionado à capacidade dos fungos em auxiliar na manutenção do pH ruminal fisiológico, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento de bactérias sensíveis ao pH ácido (NEWBOLD et al., 1991).

As enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus* spp. não digerem completamente a celulose em açúcares simples. Ocorre, na verdade, uma despolimerização parcial, que auxilia as bactérias celulolíticas na finalização da digestão do material fibroso (UWINEZA et al., 2024). Apesar de numerosas evidências positivas da utilização do *A. oryzae* na dieta de ruminantes, ainda há inconsistências na literatura. Segundo Podversich et al. (2023), a variabilidade dos resultados pode ser atribuída ao fato de que esses fungos atuam de maneira dependente do substrato. Em outras palavras, os resultados variam de acordo com a dieta que é oferecida aos animais. Por exemplo, Sucu et al. (2018) observaram que a suplementação com *A. oryzae* aumentou a produção de leite em uma dieta baseada em alfafa, mas isso não aconteceu quando a forragem da dieta era constituída principalmente por silagem de milho. Uma meta-análise que reuniu 30 estudos sobre o extrato da fermentação de *A. oryzae* demonstrou um aumento de 4,6% na produção de leite, em comparação ao grupo controle (CANTET et al., 2025).

Os efeitos da utilização do *A. oryzae* sobre o desempenho de ruminantes foram recentemente revisados por Uwineza et al. (2024), sendo que alguns desses resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da utilização do *A. oryzae* na dieta de ruminantes, adaptado de Uwineza et al. (2024).

Dose	Forma de suplementação	Espécie	Resultados encontrados	Referência
2.1g/dia	Dieta de subprodutos: 63% polpa cítrica, 21% restos de descaroçamento de algodão, 10% grãos secos de destilaria com solúveis, 5% melaço enriquecido com nitrogênio não proteico, 1% de suplemento vitamínico e mineral		Aumento na eficiência alimentar, novilhas ganharam 15% mais peso, para cada kg de dieta consumida	
2.2 g/dia	89% silagem de sorgo, 10% grãos secos de destilaria com solúveis, 1% de suplemento vitamínico e mineral	84 novilhas mestiças Angus	Maior digestibilidade da matéria orgânica	Podversich et al. (2021)
1g/dia	Suplementado em dieta concentrada de 85%	48 cordeiros	Aumento no ganho de peso médio diário	Zerby et al. (2011)

5 g/dia	Suplementado na dieta totalmente misturada	282 vacas holandesas multíparas	Maior concentração de proteína verdadeira no leite	Higginbotham et al. (2004)
3g/dia	Suplementado na dieta totalmente misturada	210 vacas holandesas	Maior produção de leite em início de lactação	Kellems et al. (1990)
3g/dia	Suplementado na dieta (70% concentrado e 30% forragem)	2 vacas secas e 2 vacas em lactação	Aumento da digestibilidade ruminal e do trato total das frações de fibra.	Gomez-Alarcon et al. (1990)

2.2.5 Potencial do *A. niger* e Co-cultivo com *A. oryzae*

O *A. niger* apresenta um perfil de produção enzimática semelhante ao de *A. oryzae*, indicando que esse fungo também pode ser utilizado na alimentação de ruminantes. Entretanto, os resultados específicos da suplementação com *A. niger* ainda são escassos na literatura, e o uso do co-cultivo dessas espécies de fungos permanece praticamente inexplorado na alimentação de vacas leiteiras (KONG et al., 2021). Espera-se que o co-cultivo de AOAN promova maior produção enzimática, conforme demonstrado nos estudos de Hu et al. (2011) e Benoit-Gelber et al. (2017). Corroborando essa hipótese, Kong et al. (2021) observaram que a suplementação com AOAN aumentou a digestibilidade da proteína bruta, da matéria seca e da FDN de dietas à base de silagem de milho e feno de aveia. O aumento na digestibilidade da fibra, esteve associado à maior produção de acetato *in vitro*, o que, em condições *in vivo*, pode refletir na elevação do teor de gordura no leite. Uma tendência similar de aumento na produção de acetato e butirato também já havia sido observada por Newbold et al. (1991) em um estudo *in vitro* utilizando *A. oryzae*, resultado atribuído a uma maior contagem de bactérias celulolíticas no fluido ruminal.

Apesar dos efeitos positivos, a dosagem de inclusão dos fungos *Aspergillus* spp. na dieta não está determinada, e comumente a percentagem de inclusão segue as recomendações dos fabricantes (KONG et al., 2021). A maioria dos estudos, especialmente aqueles com abordagens *in vivo*, concentra-se em avaliar os efeitos da suplementação em vacas no período de transição até o meio da lactação (fase em que o aumento da densidade energética da dieta, por meio do fornecimento de gordura e concentrados, é necessário para suportar as altas exigências da lactação (SUCU et al., 2018). O melhor aproveitamento dos nutrientes nesses cenários pode elevar a densidade energética da dieta, potencialmente permitindo a redução de outros ingredientes e, consequentemente, dos custos com a alimentação.

2.2.6 *Aspergillus* spp. como estratégia para estresse térmico e estabilidade do pH ruminal

Outra linha de pesquisa envolve o uso de *Aspergillus* spp. como estratégia nutricional para mitigar os efeitos do estresse térmico, condição em que o consumo de volumoso é reduzido devido ao aumento do calor metabólico. Nesses casos, melhorar a digestão ruminal pode ser uma estratégia para minimizar os riscos de acidose ruminal. Higginbotham et al. (1994) relataram que vacas suplementadas com *A. oryzae* apresentaram redução na temperatura retal, possivelmente associada ao aumento na digestibilidade da proteína bruta ou ao próprio conteúdo proteico dos fungos; no entanto, esse efeito não foi confirmado no estudo de Ominski et al. (2003).

Outros estudos demonstram que AO pode ser fornecido para animais que consomem alta proporção de concentrado, devido ao seu potencial de aumentar a concentração ruminal de bactérias que consomem ácido láctico, contribuindo para a estabilização do pH ruminal (BEHARKA e NAGAJARA, 1998; ZERBY et al., 2011). Apesar disso, resultados inconsistentes também foram reportados por outros autores (CHIQUETTE et al., 1995).

2.2.7 Considerações finais

Os resultados até então disponíveis na literatura indicam que a utilização dos fungos *Aspergillus* spp. na dieta de ruminantes é promissora. Contudo, a variabilidade e a inconsistência dos dados disponíveis reforçam a necessidade de estudos adicionais que validem os efeitos observados e comprovem sua eficácia sob diferentes condições experimentais e produtivas. Abordagens integradas, utilizando metodologias *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, são essenciais para confirmar as hipóteses já testadas e elucidar os efeitos da suplementação com *Aspergillus* spp. em diferentes fases do crescimento e lactação de bovinos leiteiros.

2.3 Benefícios da suplementação com metionina rúmen-protégida para bovinos leiteiros

As proteínas são estruturas complexas compostas por aminoácidos; elas estão presentes em todas as células vivas, onde desempenham diferentes funções (KAUR et al., 2024). Na natureza existem 20 aminoácidos estruturais conhecidos, classificados entre essenciais e não essenciais (LOPES et al., 2019).

Em monogástricos, os aminoácidos essenciais não são sintetizados no organismo, portanto, é necessário o consumo de proteínas na dieta para que ocorra a síntese de proteínas corporais (KAUR et al., 2024). Nos ruminantes, existe uma significativa síntese de aminoácidos essenciais pela microbiota, mas essa produção é insuficiente para nutrir o animal, particularmente os mais produtivos, sendo necessário ofertá-los na alimentação (WEI et al., 2022; KAUR et al., 2024).

Em alguns casos, quando os bovinos consomem forragens de baixa qualidade, o consumo de proteínas pode ser insuficiente para suprir as necessidades do animal, para o crescimento, lactação ou gestação (AYYAT et al., 2021). Embora as forragens sejam um componente importante da dieta, a eficiência de vacas leiteiras em converter o nitrogênio das forragens e de outros alimentos, em produção de leite é relativamente baixa, variando entre 20% e 35% (HRISTOV et al., 2004; HUANG et al., 2023; QIN et al., 2025). Logo, boa parte do nitrogênio consumido na dieta acaba sendo excretado, nas fezes e na urina (QIN et al., 2025), contribuindo para poluição ambiental e reduzindo o desempenho econômico e produtivo das fazendas.

Logo, parte do nitrogênio ofertado na dieta acaba sendo excretado, nas fezes e no leite (QIN et al., 2025), contribuindo para poluição ambiental e reduzindo o desempenho econômico e produtivo das fazendas.

Nesse sentido, buscando aumentar a eficiência da utilização dos nutrientes, com o passar dos anos, o foco das formulações nutricionais deixou de ser em aumentar a proteína bruta e se voltou às frações dessa proteína, que são: proteína degradável no rúmen (PDR) e não degradável no rúmen (PNDR), além de posteriormente, proteína microbiana (JUNIOR et al., 2021). Mais recentemente o Nasem (2021), se concentra no suprimento de aminoácidos individualmente para o animal.

A PDR é utilizada por microrganismos ruminais como fonte de N para a produção de proteína microbiana. Já a PNDR corresponde à fração que escapa da fermentação ruminal, permitindo que os aminoácidos cheguem intactos no intestino. Embora pequenas quantidades possam ser absorvidas nos compartimentos gástricos (rúmen, retículo, omaso e abomaso), é principalmente no intestino delgado que ocorre a digestão enzimática e absorção (AYYAT et al., 2021; KAUR et al., 2024). A PDR na forma de proteína microbiana e a PNDR compõem a proteína metabolizável que será absorvida pelo animal e utilizada em seus processos metabólicos (NASEM, 2021).

A proteína microbiana é a principal fonte de proteínas para ruminantes. Entretanto, ainda que esta contenha em sua composição aminoácidos essenciais, ela pode ser incapaz de suprir as necessidades de vacas de alta produção. No caso desses animais, a necessidade de metionina, por exemplo, é de 2,2 a 2,4% da proteína metabolizável (NRC, 2001; AYYAT et al., 2019), o que reforça a necessidade de oferecer alguns aminoácidos na forma protegida. Ainda, a proteína microbiana é reconhecida por ser ineficiente em fornecer aminoácidos importantes para as vacas leiteiras, como lisina, histidina e metionina (NRC 2001; NASEM 2021; HUANG et al. 2023). Nesse sentido, é possível presumir que ocorra um ganho em eficiência de utilização dos nutrientes ao oferecer aminoácidos essenciais rúmen-protégidos, pois isso, diminui a extensa degradação ruminal de aminoácidos, aumentando a disponibilidade e absorção desses nutrientes no intestino, além ainda de reduzir a conversão de aminoácidos de alta qualidade em amônia, o que também impacta na menor excreção de nitrogênio para o meio ambiente (AYYAT et al., 2019).

Ao chegar no rúmen, a PDR é rapidamente degradada em peptídeos e aminoácidos, e alguns desses aminoácidos como já mencionado, são degradados não somente em amônia, mas também em ácidos orgânicos e dióxido de carbono (AYYAT et al., 2021; KAUR et al., 2024). A amônia produzida é o principal componente nitrogenado, essencial para o crescimento bacteriano. Além dela, são utilizados os peptídeos e aminoácidos livres (AYYAT et al., 2021). Parte dos aminoácidos que não são degradados, dão origem aos ácidos de cadeia ramificada (isoácidos), que são utilizados para o crescimento de bactérias fibrolíticas como a *Prevotella ruminicola* (KAUR et al., 2024). Logo, a degradação ruminal de proteínas diminui a disponibilidade de metionina para o ruminante.

O suprimento de proteína metabolizável é um ponto importante a ser considerado nas formulações nutricionais, mas igualmente relevante, está a importância em balancear, individualmente, os aminoácidos essenciais na dieta (NASEM, 2021). Segundo o Nasem (2021) temos 5 aminoácidos tipicamente deficientes; além da Metionina, Lisina e Histidina, temos os aminoácidos ramificados leucina e isoleucina. A metionina é uma molécula importante para reprodução, lactação e síntese de proteínas (LOPES et al., 2018). Considerando a sua importância, revisamos neste texto aspectos importantes sobre a suplementação de metionina para bovinos leiteiros.

2.3.1 Metionina para bovinos leiteiros

A metionina está presente em pequenas concentrações nos alimentos que são normalmente consumidos por bovinos leiteiros, como alfafa, caroço de algodão e farelo de soja (Quadro 4) (SÜDEKUM et al., 2004; AYYAT et al., 2021).

Quadro 4. Perfil de metionina em ingredientes de ração, proteína do leite e tecido de ruminantes (Expresso como % do total de aminoácidos essenciais). Adaptado de Kaur et al. (2024)

Item	Metionina (%)
Tecido magro	5,1
Proteína do leite	5,5
Bactérias ruminais	4,9
Milho	5,3
Cevada	4,5
Aveia	4,2
Caroço de algodão	3,7
Farelo de soja	3,2

Sabe-se desde 1950 a importância da metionina para a alimentação animal e desde 1960 que é possível proteger a metionina da degradação ruminal (WILLKE, 2014). Esse interesse em tornar a metionina protegida surgiu a partir do conhecimento de que este era um dos principais aminoácidos limitantes para o gado leiteiro em lactação (NRC, 2001). No entanto o Nasem (2021), reconheceu que não só a metionina, mas também outros aminoácidos essenciais podem limitar a produção de leite. Apesar disso, a metionina continua se destacando por sua importância para muitas funções biológicas e protegê-la da degradação ruminal é importante para oferecer um maior aporte desse aminoácido para o animal.

Diversas estratégias têm sido aplicadas para reduzir a degradação ruminal da metionina, incluindo modificações químicas de sua estrutura e tratamentos térmicos. Adicionalmente, análogos de metionina com menor disponibilidade ruminal, revestidos com lipídios ou polímeros, podem ser utilizados na formulação de dietas para vacas leiteiras (CHALUPA et al., 1975; SCHWAB et al., 1995; KAUR et al., 2024).

A DL-metionina é a principal forma sintética utilizada na alimentação animal. Trata-se de uma mistura racêmica composta pelos isômeros D- e L-metionina, que são quimicamente idênticos, mas estruturalmente distintos por serem imagens especulares entre si (NASEM, 2021). A forma L é biologicamente ativa, enquanto a D pode ser convertida em L no organismo por meio da enzima DL-racemase, permitindo seu aproveitamento metabólico (AYYAT et al., 2021). A DL-metionina é produzida industrialmente por síntese química a partir de metilmercaptano, acroleína e cianeto de hidrogênio. Até 2014, a principal produtora mundial era a Evonik Industries (Hanau, Alemanha), com produção anual estimada em 580.000 toneladas (WILLKE, 2014). Já a L-metionina, por ser mais cara, é geralmente destinada à alimentação humana e aplicações farmacêuticas (WILLKE, 2014).

Além da forma racêmica, existem análogos da metionina desenvolvidos para maior resistência à degradação ruminal. Nesses compostos, o grupamento alfa-amino do aminoácido é substituído por grupos não nitrogenados, como hidroxila ou isopropanol. Dentre os principais análogos destacam-se o ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanoico (HMTBA) e seus derivados, como o sal de cálcio (HMTBA-Ca) e o éster isopropílico (HMBi). O HMBi sofre hidrólise parcial no rúmen pela ação da enzima álcool desidrogenase; parte da molécula é degradada, enquanto o ácido HMB residual é absorvido pela parede ruminal ou abomasal (AYYAT et al., 2021). Após a absorção, o HMB é convertido em HMBA e, posteriormente, em metionina nos rins, rúmen, fígado e intestino delgado (WESTER et al., 2000). Segundo Kihal et al. (2021), picos plasmáticos de metionina podem ser observados cerca de duas horas após o consumo de HMBi (ST-PIERRE e SYLVESTER, 2005). No entanto, estudos indicam que a absorção do HMBi é parcial: cerca de 50% é absorvido diretamente, enquanto o restante sofre degradação no rúmen, com parte do HMBA também sendo degradada antes de ser convertida em metionina (GRAULET et al., 2005). O HMBi está presente no produto comercial MetaSmart® (Adisseo, Inc., Antony, França).

Outra estratégia utilizada é o tratamento térmico de ingredientes proteicos, em que a aplicação de uma temperatura superior a 100°C, promove a reação de Maillard entre açúcares presentes nos alimentos e os grupamentos amino das proteínas, o que modifica a estrutura da proteína, tornando-a menos solúvel à degradação ruminal (KAUR et al., 2024). Já o tratamento químico, como o uso da formalina, induz ligações cruzadas entre grupamentos amino e amida da proteína, impedindo sua degradação no rúmen.

Essas ligações são, no entanto, quebradas no abomaso, tornando a proteína disponível para a absorção no intestino delgado do animal (KAUR et al., 2024). Por fim, o encapsulamento com gordura ou polímeros sintéticos pode ser utilizado para proteger aminoácidos da degradação ruminal (KAUR et al., 2024). Revestimentos como o polímero sintético 2-vinilpiridina-co-estireno conferem proteção contra a degradação ruminal, sendo estáveis ao pH neutro do rúmen e sensíveis ao pH ácido do abomaso, onde se rompem e liberam a metionina para absorção intestinal (ARDALAN et al., 2011). Essa tecnologia é patenteada e utilizada em produtos comerciais como os da Adisseo (AYYAT et al., 2021).

2.3.2 Produtos comerciais

Diversos estudos têm sido conduzidos com metionina protegida da degradação ruminal, sendo o Smartamine MTM (Adisseo, Inc., Antony, França) a metionina protegida mais estudada até hoje. Essa formulação contém aproximadamente 75% de DL-Metionina, revestida por uma matriz de poli- 2-vinilpiridina-Co-estireno combinada com ácido esteárico, conferindo resistência à degradação ruminal. Ensaios *in vitro* demonstram resistência superior a 90% em 24 horas e biodisponibilidade de 80% *in situ* e em condições *in vivo* varia entre 52%, 75% a 97% (SÜDEKUM et al., 2004; GRAULET et al., 2005; ZHOU et al., 2016; JUNIOR et al., 2021).

O produto Mepron[®] (Evonik Industries, Hanau, Alemanha) também é popular nas pesquisas científicas. Nele a DL-metionina é revestida por etilcelulose e ácido esteárico (SÜDEKUM et al., 2004). Os resultados com o Mepron são variáveis, mas já foi encontrada uma resistência ruminal de aproximadamente 70% em 12 horas de incubação (SÜDEKUM et al., 2004; AYYAT et al., 2021). O MetaSmart[®] (Adisseo, Inc., Antony, França), é um análogo de metionina que também pode ser utilizado na suplementação de bovinos. Foi demonstrado que o MetaSmart[®] aumenta as concentrações de metionina no plasma após 3 a 4 horas da sua ingestão, enquanto o Smartamine MTM é absorvido mais lentamente e o platô plasmático de metionina é atingido entre 16 e 30 horas após o consumo do produto (GRAULET et al., 2005). Além disso, a biodisponibilidade do Smartamine MTM é maior do que a do MetaSmart[®], de 74,4 e 52,8, respectivamente (GRAULET et al., 2005).

As características do produto comercial Smartamine MTM são de partículas com aproximadamente 2mm. Para esse tamanho de partícula é estimado um período de retenção no trato digestivo que pode ultrapassar a 31 horas, o que justifica os picos plasmáticos mais tardios de metionina, quando o produto é comparado ao MetaSmart® (GRAULET et al., 2005).

O Aminopass® (Safeeds, Brasil) é um produto lançado recentemente no mercado e fabricado totalmente no Brasil. O Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária da Universidade Federal de Pelotas, ao qual pertencemos, foi o primeiro na investigação da resistência ruminal desse produto *in situ*, bem como na análise da sua influência sobre os níveis plasmáticos de metionina em vacas leiteiras quando incluído na dieta dos animais. Nesta tese serão apresentados os resultados do estudo *in situ*, conduzido pela autora e os colegas da equipe.

O produto Aminopass® apresenta-se em partículas de no máximo 2 mm. Sua formulação inclui uma combinação de ingredientes, entre eles gordura vegetal hidrogenada, lecitina de soja e ricinoleato de gliceril polietilenoglicol, que atua como um agente de liberação controlada, permitindo a liberação gradual dos ingredientes ativos. A formulação também contém os antioxidantes BHT (butilhidroxitolueno) e BHA (butilhidroxianisol), que ajudam a manter a integridade dos lipídios, prevenindo a oxidação e prolongando a vida útil do produto. Além disso, inclui o emulsificante polioxietileno (20) sorbitan monoleato, conhecido como polisorbato 80, que facilita a mistura de ingredientes hidrofóbicos e hidrofílicos, e o dióxido de silício, utilizado como um agente antiaglomerante. O produto também incorpora espécies doadoras de transgênicos, como *Agrobacterium* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes* e *Agrobacterium tumefaciens*, organismos geneticamente modificados para incluir genes que conferem características desejáveis.

Esses organismos podem ser utilizados na produção de suplementos alimentares e têm o potencial de melhorar as características nutricionais e funcionais do Aminopass®, visando promover um aumento na eficiência alimentar e na saúde animal.

2.3.3 Metionina rúmen-protégida: benefícios para o período de transição e metabolismo lipídico

A Figura 1 foi extraída do artigo de Coleman et al. (2020) e demonstra o ciclo de 1 carbono, no qual a metionina exerce um papel central.

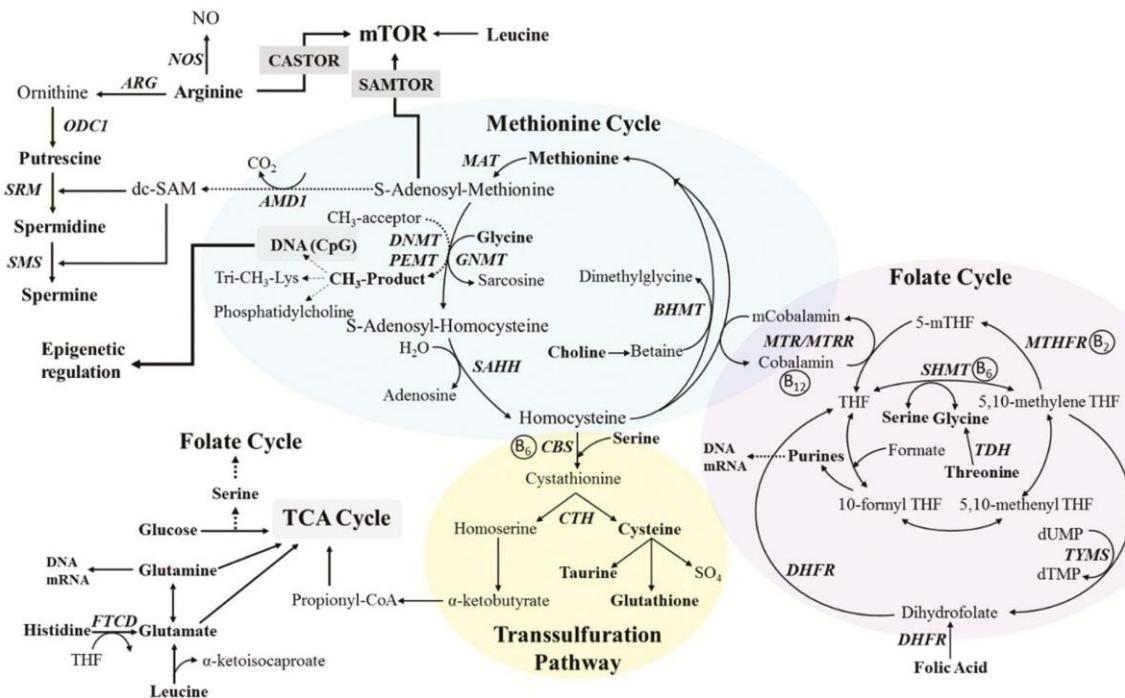


Figura 1. Ciclo de 1 carbono extraído do artigo de Coleman et al. (2020).

Após o parto, vacas leiteiras enfrentam além de um balanço energético negativo, um desequilíbrio de outros constituintes da dieta, como é o caso de aminoácidos e colina (ZANTON e TOLEDO, 2024). Isso porque, o consumo de matéria seca (MS) está reduzido, o que compromete a ingestão de todos os nutrientes que naturalmente viriam da dieta e, além disso, há uma grande demanda por grupo metil, e consequentemente, por seus doadores (ZHOU et al., 2016).

A menor ingestão de MS se deve, dentre outros fatores, ao crescimento do feto, que comprime o espaço do rúmen, e pelo estado inflamatório do animal, desencadeado pelo parto e posteriormente, pela contaminação uterina no momento do parto (OSÓRIO et al., 2014). Esse estado inflamatório aumenta a necessidade de aminoácidos no tecido hepático, para que ocorra a síntese de proteínas de fase aguda (BERTONI et al., 2008). Além disso, as taxas metabólicas do fígado e da glândula mamária, por exemplo, se tornam maiores, conforme explicado a seguir.

O fígado, sob ativação do sistema imune, aumenta a síntese de proteínas de fase aguda, ao mesmo tempo em que realiza gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo (COLEMAN et al., 2020; CHANDLER e WHITE, 2019). A captação excessiva de ácidos graxos pelo fígado pode superar a capacidade de oxidação completa, resultando na formação de corpos cetônicos a partir de acetil-CoA. Os ácidos graxos em excesso também podem ser esterificados em triglicerídeos e armazenados no fígado ou secretados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (CHANDLER e WHITE, 2019). Esse desequilíbrio metabólico torna o animal suscetível a condições como cetose e esteatose hepática (CHANDLER e WHITE, 2019).

A taxa metabólica aumentada da glândula mamária se deve ao início da lactogênese. Esse aumento nas taxas metabólicas do fígado e da glândula mamária, ocasiona uma maior produção de espécies reativas de oxigênio pelas células, em uma quantidade superior a disponibilidade de antioxidantes naturais como a glutatona, sulfeto de hidrogênio e a taurina. Assim, animais no período de transição frequentemente entram em estresse oxidativo (COLEMAN et al., 2020). Esse estresse oxidativo contribui para resposta inflamatória, sobrecarregando a funcionalidade hepática (BERTONI et al., 2008).

O tecido mamário mantém durante a lactação um escoamento de compostos metilados no leite, em proporções quase que constantes, ainda que isso comprometa as reservas de metionina para outras rotas metabólicas (NASEM, 2021; ZHOU et al., 2016). Quando há deficiência de compostos metilados, no período de transição, o aumento da proteólise muscular pode auxiliar no fornecimento desses grupos metil, mas isso acontece às custas de uma redução no peso corporal (KOMARAGIRI e ERDMAN, 1997). Além de requerida para o leite, a metionina exerce um papel central do metabolismo de 1 carbono (Figura 2), rota que demonstra a participação da metionina na produção de antioxidantes e fornecimento de grupos metil para uma variedade de aceitadores, como resíduos de aminoácidos em proteínas, DNA, RNA e pequenas moléculas (COLEMAN et al., 2020; JUNIOR et al., 2021). No fígado, a metionina fornece grupamentos metil para a formação de S-adenosilmetionina (SAM), molécula formada pela combinação de metionina com trifosfato de adenosina (ATP) (HUANG et al., 2023). A SAM é um doador universal de grupamentos metil, os doando inclusive para a biossíntese de colina (BROSNAN et al., 2007; ARDALAN et al., 2011).

A colina é precursora da fosfatidilcolina, um componente fundamental das membranas do VLDL, que é responsável por evitar a deposição de triglicerídeos no parênquima hepático, os transportando para a corrente sanguínea (ARDALAN et al., 2011). Este é um mecanismo importante, tendo em vista que ruminantes possuem uma capacidade limitada de secretar VLDL do fígado (HUANG et al., 2023). Através da síntese de colina, a metionina atua indiretamente no metabolismo lipídico, mas independente da síntese de colina, a SAM pode ser utilizada para metilar a fosfatidiletanolamina, formando a fosfatidilcolina, essencial para a geração de VLDL (ARDALAN et al., 2011; ZHOU et al., 2016; COLEMAN et al., 2020). Além desses mecanismos, também foi sugerido que a metionina promove a síntese hepática de apolipoproteína B-100, um componente essencial para a síntese de VLDL no tecido hepático (MICHELOTTI et al., 2021).

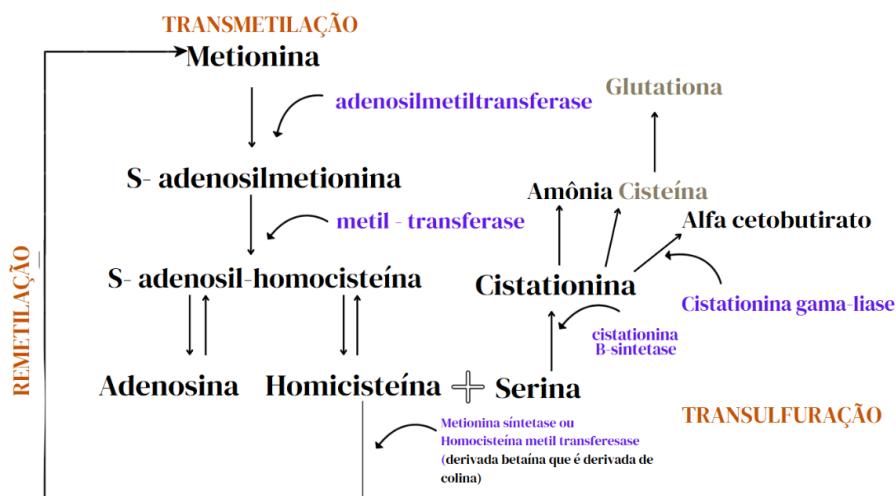
Além disso, a metionina é doadora de grupamentos metil para a formação de trimetillisina, uma molécula que participa da formação da carnitina, que por sua vez é essencial para o ingresso dos ácidos graxos não esterificados do citosol para a matriz mitocondrial dos hepatócitos, onde esses ácidos graxos serão beta-oxidados para fornecer energia ao animal (OSÓRIO et al., 2014). Esse aumento nas concentrações de carnitina foi observado no trabalho de Osório et al. (2014), em vacas que foram suplementadas com metionina rúmen-protégida. Provavelmente, a presença de carnitina pode diminuir a oxidação incompleta de ácidos graxos, reduzindo então, a formação de corpos cetônicos.

Foi estimado em cabras que 28% da metionina absorvida é utilizada para a síntese de colina (EMMANUEL e KENNELLY, 1984). Porém, essa porcentagem diminui se metionina e colina forem ofertadas juntas, o que neste caso, aumenta a disponibilidade de metionina para outras vias (ZHOU et al., 2016). É importante ressaltar que colina e metionina devem ser ofertadas preferencialmente na forma protegida da degradação ruminal, uma vez que as duas são extensamente degradadas no rúmen (ZHOU et al., 2016).

A metionina é o único aminoácido essencial que contém enxofre, fazendo dela precursora de outros aminoácidos que contém enxofre como taurina, cisteína e homocisteína (ARDALAN et al., 2011; AYYAT et al., 2021). No metabolismo de um carbono, a homocisteína é utilizada para sintetizar cistationina, que por sua vez é utilizada para produzir os antioxidantes taurina, sulfeto de hidrogênio e glutationa (COLEMAN et al., 2020; HUANG et al., 2023).

A glutationa é o antioxidante natural mais abundante produzido dentro das células (OSÓRIO et al., 2014). O aumento na produção de glutationa foi confirmado por Batistel et al. (2018) ao suplementar metionina rúmen-protégida para vacas no período de transição.

Além disso, a metionina pode desempenhar um papel importante para o processo inflamatório. Durante a inflamação ocorre proteólise muscular para fornecer cisteína para formação de proteínas de fase aguda e glutationa (OSÓRIO et al., 2014). A metionina, no ciclo de 1 carbono, é precursora da cisteína; logo a suplementação pode reduzir a proteólise muscular, sendo importante para o período de transição (COLEMAN et al., 2020). A Figura 2 mostra a rota de formação da glutationa.



*Em roxo: enzimas envolvidas no processo

Figura 2. Formação da glutationa adaptado de Brosnan et al. (2007)

2.3.4 Efeito da metionina protegida da degradação ruminal sobre o consumo da matéria seca

Os resultados da suplementação de metionina rúmen-protégida no consumo de MS são inconsistentes. Junior et al. (2021) não encontraram nenhum efeito ao suplementar vacas leiteiras da raça Holandesa, multíparas, em meio de lactação, com metionina rúmen-protégida. Já Batistel et al. (2017) observaram efeitos no consumo de vacas leiteiras em transição. Aparentemente o aumento de consumo é esperado quando as vacas são suplementadas no período de transição, devido a redução na inflamação e estresse oxidativo. Isso foi demonstrado por Osório et al. (2013). Neste estudo vacas leiteiras foram suplementadas com 0,07% da MS de Smartamine M™

ou 0,19% da MS de MetaSmart® e foi observado aumento no consumo de MS após o parto em ambos os tratamentos, demonstrando que a metionina pode ter alguma ação em minimizar o balanço energético negativo de vacas no período de transição.

2.3.5 Metionina rúmen-protégida: benefícios para a produção de leite e o teor de proteína no leite

Os aminoácidos fornecidos na dieta atuam como bloco de construção para a formação da proteína do leite (LOPES et al., 2019). Além disso, os aminoácidos desempenham funções reguladoras na glândula mamária por atuarem no alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (ZHOU et al., 2018). O mTORC1 é um complexo proteico, presente nas células epiteliais mamárias, que regula a síntese de proteínas, especialmente a caseína. Quando aminoácidos são consumidos na dieta, eles ativam mTORC1, que por sua vez fosforila outras proteínas chaves, como a proteína quinase S6 ribossômica (S6K1) e a proteína de ligação a eIF4E 1 (4EBP1), promovendo a síntese proteica, produção de leite e a proliferação celular (ZHOU et al., 2018; LIU et al., 2019).

Basicamente, na membrana celular existem os receptores TAS1R1 e TAS1R3 que funcionam como sensores da disponibilidade de nutrientes, como os aminoácidos, no espaço extracelular. Estes receptores estão ligados à proteína G, que emite sinais para o interior da célula, ativando mTORC1. Isso acontece, porque TAS1R1 e TAS1R3 aumentam as concentrações de cálcio intracelular, ativando outras quinases como, ERK1/2, que por sua vez, regula mTORC1 (ZHOU et al., 2018; LIU et al., 2019). A abundância dos receptores na superfície celular coincide com a captação aumentada de aminoácidos pelo tecido mamário, ajudando a coordenar a síntese de proteína do leite (BIONAZ e LOOR, 2011; LIU et al., 2019). A proteína 78 regulada pela glicose (GRP78), também conhecida como HSPA5, faz parte da família das HSP70 e está associada com a ativação do mTORC1 (LIU et al., 2019). Neste sentido a GRP78 apresenta associação com a biossíntese do leite e a proliferação de células epiteliais mamárias (LIU et al., 2019; HUANG et al., 2023).

Liu et al. (2019), observaram uma maior expressão de GRP78 em células epiteliais mamárias após o estímulo com metionina e lisina. O mTOR regula muitos alvos incluindo S6K1, 4EBP1, SREBP-1c e ciclina D1, ativando a biossíntese do leite e a proliferação celular.

Na dieta de bovinos, os principais aminoácidos limitantes para a produção de proteína no leite são lisina e metionina. Ainda segundo o Nrc (2001) relação 3:1 entre lisina e metionina é considerada ideal para atender, respectivamente, 6,6% e 2,2% em proteína metabolizável e assim incrementar a produção de proteína no leite (ZHAO et al., 2016; JUNIOR et al., 2021). A proporção de 2,9:1 de lisina:metionina é recomendada para vacas no início da lactação, sendo que a lisina pode representar 7,0% e a metionina 2,4% da proteína metabolizável. Segundo Osório et al. (2013) essas concentrações são suficientes para maior produção de leite. Entretanto, proporções de 3:1 ou 2,9:1 são difíceis de serem atingidas se não houver a suplementação com lisina e metionina rúmen-protégidas, então recomenda-se alimentar os animais com dietas ricas em lisina, o que pode ser atingido adicionando farelo de soja na dieta, por exemplo, além de oferecer um suplemento com metionina protegida da ação ruminal (JUNIOR et al., 2021).

Um estudo recentemente publicado por Hu et al. (2025) demonstrou que vacas que receberam um suplemento de metionina e lisina rúmen-protégidas obtiveram maior produção de proteína no leite. Isso aconteceu, ainda que nenhum efeito tenha sido observado no consumo de MS, o que demonstra o adequado aproveitamento dos nutrientes rúmen-protégidos e que provavelmente o equilíbrio entre lisina e metionina, necessário para a síntese de proteína no leite, foi atendido pela suplementação. Nesse mesmo estudo de Hu et al. (2025) foi avaliado um suplemento que continha lisina rúmen-protégida e o análogo de metionina, HMBi e nesse grupo foi observado uma menor produção de proteína no leite, o que pode ser justificado devido a uma menor eficiência hepática em converter o HMBi em metionina, reduzindo a disponibilidade para o tecido mamário.

Zanton e Toledo (2024), fizeram uma metanálise para avaliar o efeito da metionina rúmen-protégida no pós-parto recente de vacas leiteiras. Neste estudo, foram reunidos artigos que utilizaram MetaSmart®, HMBa, Mepron® e Smartamine M™, sendo observado aumento na produção de leite e no teor de gordura do leite. Entretanto, HMBa foi o único que não estimulou o aumento na proteína do leite.

Segundo o Nasem (2021), a biodisponibilidade desse análogo de metionina não é totalmente conhecida, o que pode interferir nos resultados de aumento de proteína no leite. Sabe-se que suplementar a metionina protegida da degradação ruminal no início da lactação aumenta a produção de leite, resultado esse que provavelmente

ocorre ao suplementar as vacas durante o pico da lactação, período em que há maior fluxo de compostos metilados para o leite (HUANG et al., 2023).

Uma metanálise de Wei et al. (2022) investigou o benefício de suplementar metionina rúmen-protégida para a produção e composição do leite. Nesta publicação, a suplementação não beneficiou a produção de leite e os autores atribuíram isso ao fato de a lisina não ter sido suplementada junto com a metionina. Entretanto, Junior et al. (2021) observaram aumento na produção de leite e no teor de proteína no leite em vacas da raça Holandês, multíparas, no meio da lactação, que receberam metionina rúmen-protégida. Os autores atribuíram o resultado ao aumento na eficiência da utilização de aminoácidos pela glândula mamária.

A metionina é precursora de cisteína, esta por sua vez, forma ligações dissulfeto intracadeia com outras cisteínas. No caso da proteína do leite essa característica é importante, pois pode auxiliar na agregação de caseínas na via secretora das células epiteliais mamárias, aumentando a produção de proteína no leite. Este resultado foi descrito por Michellotti et al. (2021) ao suplementarem vacas entre o parto até os 29 dias de lactação com 7,2g de DL-metionina.

2.3.6 Metionina: benefícios para síntese de gordura no leite

No citoplasma das células existem as proteínas de ligação a ácidos graxos (FABP), cuja função principal é se ligar a ácidos graxos de cadeia longa não esterificados e lipídios, promovendo seu armazenamento intracelular. A FABP5, em particular, pode atuar como um regulador da síntese de gordura do leite, sendo sua ativação induzida por aminoácidos e hormônios (LI et al., 2019; HUANG et al., 2023).

A proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol-1 (SREBP-1), é um fator de transcrição que regula a quantidade de lipídios dentro da célula. Ele se liga a uma sequência específica do DNA, chamada “Sterol Regulatory Element - SRE” e ativa a expressão de enzimas-chave, envolvidas na síntese de gordura (LI et al., 2019; HUANG et al., 2023).

No trabalho de Li et al. (2019), foi estudado o efeito da metionina em células epiteliais mamárias cultivadas, revelando que a metionina ativa FABP5 e este, por sua vez é um regulador-chave da expressão gênica de SREBP-1, e portanto, regulam positivamente a atividade de enzimas que atuam na síntese de gordura do leite.

Esse mecanismo é condizente com a metanálise de Zanton e Toledo (2024), que demonstraram que diferentes fontes de metionina foram capazes de aumentar a síntese de gordura no leite de vacas leiteiras. O efeito da metionina em aumentar a gordura do leite também foi observado por Junior et al. (2021) em vacas na metade da lactação.

Outro mecanismo que explica o aumento de gordura no leite a partir da suplementação com metionina rúmen-protégida, é a hipótese de que a maior disponibilidade de metionina para o animal pode favorecer a síntese de colina e o transporte de lipídios pelo aumento no VLDL (WEI et al., 2022). Na glândula mamária o VLDL é ancorado ao endotélio vascular pela enzima lipoproteína lipase, que está localizada na superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos e tem como principal função realizar a hidrólise dos triglicerídeos que estão presentes dentro das lipoproteínas como o VLDL, liberando ácidos graxos e glicerol. Esses ácidos graxos são então utilizados pelos tecidos para diversos processos, como a síntese de lipídios ou para fornecer energia (JUNIOR et al., 2021). Isso segundo Wei et al. (2022) pode impedir o acúmulo de gordura no fígado e aumentar a disponibilidade de lipídios para o tecido mamário.

2.3.7 Efeito da metionina na população de microrganismos ruminais

No estudo de Huo et al. (2025) foi demonstrado que a suplementação com metionina degradável no rúmen pode aumentar a produção de ácido acético no rúmen. Anteriormente, Zhang et al. (2024) observaram aumento na população de bactérias *Ruminococcus* e *Fibrobacter* a partir da suplementação com metionina. Essas bactérias são produtoras de acetato, o que pode refletir em aumento de produção de gordura no leite. Além disso, metionina por ser precursora de cisteína pode servir de substrato para estimular o crescimento de *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Selenomas ruminantium* (NOFTSGER et al., 2005).

2.3.8 Efeito da metionina para síntese proteica e metabolismo celular

Conforme revisado por Brosnan et al. (2007), a estrutura da metionina apresenta algumas particularidades que conferem benefícios para a síntese proteica e metabolismo celular. O grupamento metil da metionina possui um caráter hidrofóbico, por esse motivo, em meio aquoso, como o intracelular, a metionina fica no centro e não na periferia de proteínas globulares. Além disso, a metionina possui enxofre, um radical que pode ser oxidado por espécies reativas ao oxigênio, como o peróxido de hidrogênio. Sendo oxidado, o enxofre passa a ser sulfóxido, que é a metionina oxidada. As porções oxidadas da metionina dentro de uma proteína costumam se agregar e acredita-se que esse comportamento de agregação ocorra para que as porções oxidadas não comprometam a função da proteína. No entanto, a oxidação pode ser revertida pela ação da enzima metionina sulfóxido redutase, tornando a metionina ativa novamente. Então, a partir dos achados de Brosnan et al. (2007), é possível concluir que a própria metionina, mesmo sem a síntese de antioxidantes, exerce uma proteção contra o estresse oxidativo celular.

A metionina é o aminoácido marcador para o início do processo de tradução, pois ela é o primeiro aminoácido a dar início às cadeias polipeptídicas de uma proteína. Após a síntese da proteína a metionina pode ser lisada da cadeia polipeptídica ou pode permanecer na estrutura da proteína, isso dependerá da função exercida pela proteína (BROSNAN et al., 2007).

2.3.9 Efeito da metionina rúmen-protégida no aproveitamento de nitrogênio

No trabalho de revisão de Huang et al. (2023) são relatados os efeitos benéficos de oferecer metionina rúmen-protégida no metabolismo do nitrogênio. Vacas suplementadas com metionina protegida da degradação ruminal apresentaram concentrações mais baixas de nitrogênio e ureia no plasma, o que pode refletir em menor excreção.

2.3.10 Efeito da metionina no desenvolvimento embrionário

Uma revisão publicada por Lopes et al. (2019) reúne informações a respeito dos benefícios de suplementar metionina rúmen-protégida para vacas prenhas. Ao que parece, com base em artigos levantados pelo autor, suplementar metionina rúmen- protegida para vacas no estágio inicial de gestação, auxilia na evolução do embrião de mórula para blastocisto. Isso acontece, pois, a metionina contribui para o aumento de lipídios no histotrofo, e este por sua vez é uma estrutura central para a nutrição do embrião até o estabelecimento de uma relação vascular com as carúnculas maternas.

2.3.11 Efeito da metionina protegida da degradação ruminal para o sistema imunológico

No mesmo trabalho anteriormente citado publicado por Lopes et al. (2019) foram revisados os efeitos da metionina protegida da degradação ruminal para o sistema imunológico de vacas leiteiras. A suplementação com metionina aumenta a atividade fagocítica de neutrófilos em vacas leiteiras após os 21 dias do parto (OSÓRIO et al., 2013). Além disso, Osório et al. (2014) investigaram o efeito de suplementar metionina rúmen-protégida para vacas no período de transição, sobre o status inflamatório, função hepática e estresse oxidativo e os resultados demonstraram redução das proteínas de fase aguda positivas, ceruloplasmina e amiloide sérica A, além de aumento em citocinas inflamatórias como interleucina-6, e da maior capacidade de absorver radicais livres, o que foi evidenciado pelo aumento em glutationa.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

An assessment on the effects of buffers on the productive, behavioral and metabolic parameters of Holstein dairy cows

Laura Valadão Vieira, Magna Fabrícia Brasil Savela, Natália Machado Rahal, Antônio Amaral Barbosa, Diego Rodrigues Saraiva, Francisco Augusto Burkert Del Pino, Viviane Rohrig Rabassa, Eliza Rossi Komninou, Cássio Cassal Brauner, Diego Langwinski, Alexandre Souza, Marcio Nunes Corrêa

Aceito para publicação na revista Tropical Animal Health and Production

An assessment on the effects of buffers on the productive, behavioral and metabolic parameters of Holstein dairy cows

Laura Valadão Vieira¹, Magna Fabrícia Brasil Savela¹, Natália Machado Rahal¹, Antônio Amaral Barbosa¹, Diego Rodrigues Saraiva¹, Francisco Augusto Burkert Del Pino¹, Viviane Rohrig Rabassa¹, Eliza Rossi Komninou¹, Cássio Cassal Brauner¹, Diego Langwinski¹, Alexandre Souza¹, Marcio Nunes Corrêa¹

¹Center for Research, Teaching and Extension in Animal Science (NUPEEC), Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

This study aimed to evaluate the impact of supplementing sodium bicarbonate or a commercial blend of buffering agents (BBA) comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate on the productive, behavioral and metabolic parameters of Holstein cows fed starchy diets. Over a 60-day trial period, thirty-six multiparous cows with an average milk yield of 38.84 ± 9.24 kg/day and 63.74 ± 18.63 days in milk (DIM), were randomly divided into two groups. The control group ($n = 18$) received a supplementation of 1.1% dry matter (DM) of sodium bicarbonate (Raudi®, Totalmix, Brazil), while the BBA group ($n = 18$) was administered with 0.5% DM of a blend of buffering agents (Equalizer®, Nutron/Cargill, Brazil). The mean values of ruminal pH (control 6.80 ± 0.06 and BBA 6.77 ± 0.06 ; $P > 0.05$) and volatile fatty acid (VFA) production (control: acetate $62.63 \pm 1.29\%$, propionate $22.99 \pm 1.07\%$, butyrate $14.30 \pm 0.52\%$; BBA: acetate $63.07 \pm 1.32\%$, propionate $23.47 \pm 1.10\%$, butyrate $13.70 \pm 0.57\%$), were similar ($P > 0.05$) between the two groups. The value of faecal pH was higher ($P < 0.05$) in the BBA group (6.25 ± 0.02) than the control group (6.12 ± 0.02). Animals treated with BBA exhibited lower ($P < 0.05$) dry matter intake (DMI)

(24.75 ± 0.64 kg/day), higher feed efficiency (FE) (1.64 ± 0.03), and reduced feeding frequency (52.89 ± 3.73 n°/day) than the control group (DMI, 26.75 ± 0.62 kg/day; FE, 1.50 ± 0.03 ; feeding frequency, 66.07 ± 3.64 n°/day). Milk production remained similar across both groups (control, 39.11 ± 0.92 kg/day and BBA, 39.87 ± 0.92 kg/day; $P > 0.05$). Notably, the control group displayed a higher ($P < 0.05$) concentration of milk protein (1.21 ± 0.05 kg/day) than the BBA (1.18 ± 0.05 kg/day) group. The study concluded that both treatments effectively buffered the rumen and mitigated the risk of ruminal acidosis. Moreover, the higher faecal pH in the BBA-treated group suggests potential intestinal action attributable to the synergistic effects of diverse additives with buffering properties. Despite a reduced DMI, BBA-treated animals exhibited improved FE.

Introduction

The growing world population and demand for food has required efficiency in primary production systems. Therefore, milk production rates have increased around 64% in the last three decades (Brito et al., 2021; Elmhadi et al., 2022). This is a result of improved animal performance due to genetic selection and efficient diets with increased energy content (Neville et al., 2019). Rapidly fermentable carbohydrates, such as starch from concentrated ingredients including corn, wheat, sorghum, oat, or barley are often chosen. Upon reaching the rumen, these ingredients are quickly converted into volatile fatty acids (VFA), including, propionate, which become the main energy source for ruminants (Berchielli et al., 2006; Neubauer et al., 2020; Elmhadi et al., 2022).

Ruminal health maintenance depends on fibrous feed consumption, which stimulates rumination, salivation, and ruminal pH buffering (Humer et al., 2018). However, a diet composed exclusively of physically effective fibre does not provide sufficient energy to maintain high productivity rates (Humer et al., 2018; Cao et al., 2021). Therefore, diets rich in

rapidly fermentable carbohydrates are often responsible for high levels of acids in the rumen acidification that can cause ruminal acidosis (Natnael et al., 2020). Ruminal acidosis, especially in its subacute form, is a common metabolic disorder in dairy herds (Natnael et al., 2020). Affected animals usually present changes in their rumen microbiota, including a decrease in the population of acid pH sensitive fibrolytic bacteria, which digest fibre (Hassan et al., 2020). During acidosis, the lower digestibility of fibre decreases the volume of milk produced and the concentration of its constituents, including fat and protein (Humer et al., 2018). Furthermore, other deleterious effects of rumen acidification include decreased feed intake, weight loss, displaced abomasum, liver abscesses, laminitis, intestinal acidosis, metabolic acidosis, and reproductive delays (Neville et al., 2019; Cardoso et al., 2020; Vallejo-Timarán et al., 2020).

Over several decades, the supplementation of sodium bicarbonate has been a widespread practice for controlling ruminal acidosis in dairy herds globally (Neville et al., 2019). Its effects encompass the preservation of ruminal health, milk production, and fat levels (Sharma et al., 2018). However, more recent research indicates that other alternatives, such as magnesium oxide, calcareous algae (*Lithothamnium calcareum*), and calcareous calcitic, may be equally capable of buffering ruminal pH, for a more extended period than sodium bicarbonate (Neiderfer et al., 2020; Zhang et al., 2022). Additionally, these additives also demonstrate the ability to buffer intestinal pH, as evidenced in the studies by Neiderfer et al. (2020) and Zhang et al. (2022).

The effects of ruminal and intestinal buffering are of significant importance. This is because diets rich in starch can cause dysbiosis in the ruminal environment, leading to an increased passage of starch and acids to the intestine (Berchielli et al., 2006).

Acidification of intestinal pH reduces starch digestion capacity, resulting in increased excretion in feces. Additionally, the intestinal epithelium is more sensitive to acidic pH conditions, which may potentially induce mucosal injuries and systemic health complications (Neubauer et al., 2020). Thus, maintaining pH in both organs can yield significant health benefits, enhanced utilization of dietary nutrients, and increased animal productivity.

Currently, there has been limited research assessing the collective impact of buffering agents, such as sodium bicarbonate, magnesium oxide, seaweed (*Lithothamnium calcareum*), and calcareous calcitic, on ruminal and intestinal buffering, as well as animal behaviour. Our hypothesis is that, in the rumen, these substances will overlay the known effects when used individually, and the synergism among them will prolong the duration of ruminal buffering. This will contribute to the intestinal buffering effect, ensuring health and increasing animal productivity.

The objective of this study was to assess the effect of sodium bicarbonate supplementation on dairy cows compared to the commercial blend of calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate on behavioural, productive, and metabolic parameters in Holstein dairy cows fed starchy diets.

Materials and methods

Animals and housing

All procedures were supervised and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, registered under No. 13784 – 2021. Thirty-six (36) multiparous Holstein cows, with an average milk production of $38.84 \text{ kg/day} \pm 9.24$ and 63.74 ± 18.63 days in milk (DIM), were used for the study, which lasted 60 days. The cows were managed in a compost barn system and milked three times a day, at 06:00, 14:00 and 22:00 h, at a commercial farm in southern Brazil (32° , 16°S , $52 67^\circ 32' \text{ E}$). Each cow had access to water and feed ad libitum.

Experimental design and treatments

Thirty-six cows were equally divided into two groups, with 18 cows in each group. Selection of the animals was based on milk production and days in milk (DIM), having average milk production of 38.70 ± 9.67 kg/day, DIM of 73.31 ± 19.39 , and body weight (BW) of 706.98 ± 45.93 kg. Both treatment groups received an identical basal diet formulated in accordance with the NRC (2001) standards, tailored to meet the requirements of dairy cows. The two different buffering products used were sodium bicarbonate (administered to the CONTROL group as Raudi®, Totalmix, Brazil) and a blend of buffering agents (given to the BBA group as Equalizer®, Nutron/Cargill, Brazil). The blend comprised calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate.

The total mixed rations (TMR) offered per cow per day was composed of corn silage, concentrate, pre-dried ryegrass, and buffers, twice a day after the morning and afternoon milkings using automatic feeders (Intergado®, Brazil) (Soares et al., 2018). The CONTROL group received 1.1% (280 g/cow/day) of the dry matter (DM) of sodium bicarbonate in the diet. This daily amount was determined by the farm's nutritionists and is similar to that described by De Vos (2019). The BBA group was administered daily according to the manufacturer's instructions, which equated to 0.5% of the diet's dry matter intake (102 g/cow/day).

Feeding and animal behaviour

The parameters related to feeding behaviour, including data on feed intake (kg/day), meal duration (min/meal), feeding time (min/day), meal frequency (meals/day), feeding rate (kg/min), meal size (kg/meal), and frequency of access to the feeders (n/day), were individually recorded every 24 h using automatic feeders (Intergado®, Brazil). The cows in both the control group and the BBA group had access to 9 feeders each. The feeders were positioned in the feeding area within the Compost barn. A button attached to their ears, which activated the sensor to open the troughs, facilitated access for the animals.

Additionally, from the data obtained in the feed bunks, the DMI (kg/day) was calculated, based on the DM of the diet. The feeding rate (kg/min) was calculated by dividing the DMI and the feeding time (min/day). Meal frequency (meals/day) refers to the number of visits with consumption in a 24-h period. Meal size (kg/meal) was calculated by dividing DMI and meal frequency (meals/day). Meal duration (min/meal) was determined by dividing feeding time (min/day) and meal frequency (meals/day). Frequency of access to the feeders (n°/day) in 24 h was calculated from the sum of visits with and without consumption. The feed efficiency (FE) was determined by dividing milk production data (kg/day) by DMI (kg/day) (Linn, 2006). The daily parameters of animal behaviour, including activity, rumination, and idleness, were recorded using collar-attached accelerometers (CowMed®, ChipInside, Brazil). These devices continuously monitored the cows' behaviour. Additionally, milk production per animal was monitored daily during each milking session through the milking machine records (Alpro®, DeLaval, USA).

Sample collection, preparation and laboratory analyses

The samples of TMR were collected twice a week to measure the DM using an Air fryer at 105 °C, following the procedure outlined by Hauser et al. (2023). The samples were then frozen at -80 °C for subsequent chemical analysis.

The chemical components of the TMR, including crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF), mineral matter (MM) and ether extract (EE) were analyzed using near-infrared spectroscopy (NIRS). Additionally, organic matter (OM) was calculated through $OM = DM - MM$. The concentration of non-fibre carbohydrates (NFC) was calculated using the formula: $\%NFC = 100 - (CP + NDF + EE + MM)$ as described by Detmann and Valadares Filho (2010). Each week, the particle size of the TMR was assessed using Penn State sieves. The Penn State sieve set consisted of three sieves and the base, with the upper sieve > 19 mm, intermediate 8 mm, lower 4 mm and the base.

Rectal fecal samples were collected weekly for fecal starch and pH analysis on the same days as the other samples. The pH measurement was performed immediately after collection. The methodology, adapted from da Mata et al. (2023), involved diluting 15 g of fecal samples in 100 mL distilled water and homogenizing the solution. The electrode of the digital benchtop pH meter (Tecnopon-HMMPB-2010®, Brazil) was then immersed in this solution for pH analysis. For analysis of starch, the fecal samples from each animal were organized into two different sample pools per animal and stored at -80 °C. One of the pools consisted of samples from days 0 and 7, and the other contained samples from days 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60. Prior starch analysis, the samples were thawed and dried in a forced air oven at 55 °C, for 72 h, and ground in a knife mill (Lucadema®, Brazil). The starch content was determined using the enzymatic chemical method in the Megazyme Total Starch Assay Kit (AA/AMG) (AOAC 1995).

Ruminal fluid was collected weekly from three cows in each group on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, and 60 of the experiment, totaling ten collections per animal. The samples were obtained 3 h after the morning feeding through ruminocentesis. The puncture site was located 12 to 15 cm caudal to the costochondral junction of the last rib, following the methodology outlined by Tajik et al. (2011). Immediately after collection, the pH of the rumen fluid was analyzed using a digital benchtop pH meter (Tecnopon-HMMPB-2010®, Brazil). The cryogenic tubes were stored in liquid nitrogen for quantification of VFA (acetate, propionate, and butyrate). For analysis, the samples underwent a thawing process followed by centrifugation (2 mL, 13,000 rpm, 5 min), and the supernatant obtained was used for quantification. The equipment used was the Bruker Avance III HD with a frequency of 400 MHz. The methodology employed closely resembles that described by Bica et al. (2020).

Blood samples were collected weekly from each animal, after the morning milking, on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60 of the experiment. The collections were performed by puncturing the coccygeal vein, using vacuum tube systems (BD Vacutainer®, diagnostics, Brazil). Tubes containing sodium fluoride were used to obtain plasma, and those containing silica (clot activator) were used for serum extraction. The blood was centrifuged immediately after collection at $2183 \times g$ for 15 min, separating serum and plasma, which were transferred into 1.5 mL tubes and stored at -80°C until the time of analysis. The analyses were conducted using a biochemical analyzer (Labmax Plenno®, Labtest Diagnóstica Ltda, Brazil) by spectrophotometric method. The concentrations of glucose, derivatives of protein metabolism (albumin, urea, total plasma proteins (TPPs), and minerals (calcium and magnesium) were obtained from Labtest commercial kits. Furthermore, β -hydroxybutyrate (BHB) and non-esterified fatty acids (NEFA) were analyzed using commercial kits (Diasys Diagnostic Systems®, Germany). For the determination of Paraoxonase (PON1), 3.3 ml of bovine serum was mixed with 500 ml of Tris/HCl 20 mM (solution containing 1 mM calcium chloride and 4 mM phenylacetate). The readings were performed using a spectrophotometer (Femto 200 plus®, Brazil). PON1 activity was recorded using the formula DAbsorbance $\times 115$ and expressed in U/mL following a protocol pre-established by de Campos et al. (2017). All blood parameters were evaluated through serum analysis except for glucose, which was assessed from the plasma. Blood samples for hemogasometric evaluation (pH, CO_2 pressure, and blood bicarbonate) were collected in tubes with sodium heparin by puncture of the coccygeal vein, 3 h after feeding, using a portable digital analyzer (i-STAT Abbott®, USA).

Milk samples were collected weekly, on day 0, before supplementation with the buffer, and on days 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60 of the experiment. Samples were obtained during the morning, afternoon, and evening milking in 50 mL plastic, sterile tubes containing

Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol). The percentage of milk constituents (fat, protein, lactose, and total solids) were analyzed using mid-infrared spectrometry (ISO 9622/ IDF 141). (NexGen, Bentley Instruments®, USA).

Statistical analysis

The results were analyzed using the JMP version Pro 14 program (SAS Institute Inc. 1989–2024) by PROC MIXED, considering treatment, time, and interaction as fixed and cow effects as random effects. Statistical significance was declared at $P < 0.05$ and tendency $P < 0.10$. P-values are presented as Turkey adjusted values. The best covariance structure was defined by the Akaike information criterion (AIC). Data were analyzed according to the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + P_k + T_{Pik} + \epsilon_{ijk}$$

Where Y_{ijk} represents the continuous variable, μ represents the overall mean, T_i is the fixed effect of the treatment ($i = \text{CONTROL X BBA}$), A_j is the random effect of the animal ($j = 1$ to 36), P is the fixed effect of time ($k = 1$ to 60), T_{Pik} is the fixed effect of the interaction between treatment i and time k , and ϵ_{ijk} is the random error associated with each observation.

The purpose of including the interaction between time and treatment in the statistical model was to determine if the treatments showed any cumulative effects on the analyzed variables over time. However, the results were considered irrelevant to our study. Therefore, we will only discuss the effects of the treatments.

Results

Total mixed ration [TMR] analyses

In Table 1, the results of the chemical analysis of the diet provided during the experiment are presented. Meanwhile, Table 2 shows the percentages corresponding to the particle size of the diet, categorized into 19 mm, 8 mm, 4 mm, and < 4 mm

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (% dry Matter basis)

Item	Physical composition of the concentrate
Wholegrain rice bran	12.65
Milled grain corn	38.75
Soy hull	16.98
Soybean meal	22.83
Bypass protein ^a	5.09
Livestock Urea	0.82
Protected Fat ^b	1.40
Mineral Premix ^c	0.39
Common salt	1.09
Chemical composition analysis of total mixed ration	
Dry matter	46.47
Mineral matter	7.26
Crude protein	16.76
Ether extract	4.56

Neutral detergent fiber	32.62
Acid detergent fiber	19.87
Starch	29.28
Non-fiber carbohydrates	38.8
Dietary cation-anion difference	28.37

^aBypass protein = composition in %CP: 7.38% of arginine, 2.77% of histidine, 4.56% of isoleucine, 7.81% of leucine, 6.28% of lysine, 1.45% of methionine, 5.26% of phenylalanine, 3.98% of threonine, 1.27% tryptophan, 4.69% of valine.

^bProtected Fat = 33.60 g/100 g palmitic acid, 40.14 g/100 g of stearic acid, 26.48 g/100 g of Oleic acid, 04.50 g/100 g Other saturated fatty acids, 05.13 g/100 g Other unsaturated fatty acids, 41.70 g/100 g total saturated fatty acids, total unsaturated fatty acids 31.61.

^cMineral Premix = Iron 123.65 mg/kg, added Iron 7.93 mg/kg, added Cobalt 1.23 mg/kg, Added Copper 30.60 mg/kg, added Iodine 1.70 mg/kg, added Manganese 129.20 mg/kg, added Zinc 129.20 mg/kg, added Selenium 12.26 mg/kg, chelated Zinc 34.41 mg/kg, organic Selenium 0.31 mg/kg, vitamin A add 10.88 IU/g, vitamin D add 2.72 IU/g, vitamin D add 68.43 IU/g, biotin add 3.12 mg/kg, monensin 40.80 g/tone.

Table 2. Average percentage of particles sizes of TMR as assessed using Penn State sieves

Sieve type	Size (mm)	Percentage
Upper	19	7.15
Intermediate	8	37
Lower	4	17.4
Base	<4	38.2

Feeding behaviour, animal behaviour, and feeding efficiency

The data on feeding behavior, animal behavior, and feeding efficiency (FE) are presented in Table 3. It was observed that animals in the CONTROL group exhibited higher dry matter intake (DMI) compared to the BBA group ($P = 0.04$). The BBA group showed lower feeding efficiency compared to the CONTROL group ($P < 0.01$). The animals in the CONTROL group showed a higher frequency of access to the feeders compared to those in the BBA group ($P = 0.02$). The meal duration was longer for the BBA group than for the cows in the CONTROL group ($P = 0.03$). The rumination and idle parameters were not influenced by the CONTROL and BBA treatments. Notably, there was a trend towards shorter activity time in animals that received the BBA treatment ($P = 0.07$).

Table 3. Feeding behavior, animal behavior, and feed efficiency (FE) by dairy cows in the CONTROL and BBA groups. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
DMI ^b (Kg/day)	26.57	0.62	24.75	0.64	0.04	<0.01
FE ^c	1.50	0.03	1.65	0.03	<0.01	<0.01
Frequency of access to the feeders (n/day)	66.07	3.64	52.89	3.73	0.02	<0.01
Feeding time (min/day)	130.00	6.26	126.30	6.40	0.68	<0.01
Meal frequency (n/ day)	31.63	2.06	25.94	2.10	0.06	<0.01
Feeding rate (kg/min)	0.21	0.01	0.21	0.01	0.77	<0.01
Meal size (kg/meal)	0.49	0.02	0.59	0.02	0.09	<0.01

Activity time	230.16	8.81	206.70	9.02	0.07	<0.01
	(min/day)					
Rumination	593.94	5.21	596.07	5.36	0.78	<0.01
	time (min/day)					
Lying time	605.21	9.30	626.90	9.58	0.11	<0.01
	(min/day)					

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate; ^bDMI = Dry matter intake; ^cFE = Feed efficiency.

Digestive physiological parameters

Table 4 shows the starch and fecal pH data. The concentration of fecal starch did not differ between the groups. However, the fecal pH was influenced by the treatments. Specifically, the fecal pH was higher ($P < 0.01$) in the BBA group compared to the CONTROL.

Table 4. Average pH and fecal starch from the dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
pH	6.12	0.02	6.25	0.02	0.01	0.13
Fecal starch (%)	2.97	0.35	2.91	0.38	0.90	0.29

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate.

The pH values (Fig 1) and concentrations of acetic, propionic, and butyric acids (Table 5) of the ruminal fluid were similar between groups. Likewise, no differences were observed in the parameters of blood gases between animals (Table 6).

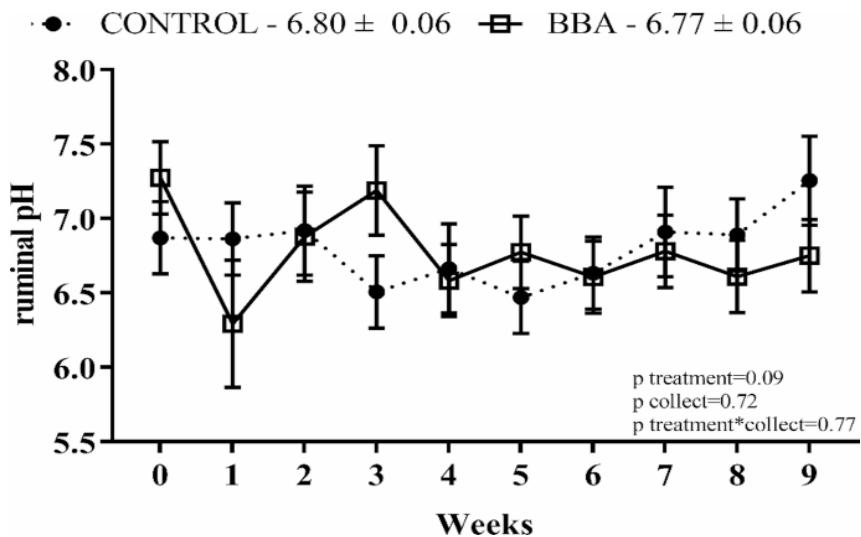


Fig 1. Weekly values of pH values referring of the ruminal fluid of the CONTROL group (sodium bicarbonate) and BBA (commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate) groups.

Table 5. Quantification of volatile fatty acids (VFA) in the rumen of dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
Acetate (%)	62.63	1.29	63.07	1.32	0.82	0.19
Propionate (%)	22.99	1.07	23.47	1.10	0.77	0.34
Butyrate (%)	14.30	0.52	13.70	0.57	0.50	0.31
Total VFA	99.92		100.24			

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate.

Table 6. Mean blood gas parameters of dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
pH	7.46	0.02	7.44	0.02	0.53	0.19
pCO ₂ ^b	45.02	1.60	48.22	1.60	0.23	0.67
HCO ₃ ^c	31.92	1.09	31.71	1.09	0.90	0.13

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate; ^bpCO₂ = carbon dioxide pressure; ^cHCO₃⁻ = sodium bicarbonate

The concentrations of total proteins, albumin, urea glucose, calcium, magnesium, and BHB were not influenced by the buffers ($P > 0.05$). However, there was a trend indicating higher mobilization of NEFA with the CONTROL treatment ($P = 0.07$). These results are presented in Table 7. No significant differences in milk production were observed between the two groups. However, regarding milk composition parameters, a lower concentration of proteins was observed in the milk of BBA animals compared to CONTROL ($P = 0.04$) (Table 8).

Table 7. Mean metabolic parameters of dairy cows in the CONTROL group and BBA group.

Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
Total proteins, g/dL	8.01	0.10	7.98	0.10	0.84	0.37
Albumin, g/dL	2.78	0.04	2.70	0.04	0.18	0.07
Urea, mg/dL	29.09	1.83	28.07	1.85	0.70	<0.01
Glucose, mg/dL	59.86	0.79	61.34	0.82	0.21	<0.01

Calcium, mg/dL	8.60	0.11	8.56	0.11	0.80	0.56
Magnesium, mg/dL	2.25	0.05	2.26	0.05	0.90	0.26
NEFA ^b , mmol/L	0.41	0.03	0.33	0.03	0.07	<0.01
BHB ^c , mmol/L	0.48	0.02	0.51	0.02	0.38	0.47
PON1, U/ml	128.73	4.84	124.69	4.86	0.56	0.04

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate; ^bNEFA = non-esterified fatty acids; ^cBHB = β -hydroxybutyrate; ^dPON1 = paraoxonase-1.

Table 8. Mean milk production and composition from dairy cows in the CONTROL group and BBA group. Values represent mean \pm SEM (Standard Error of the Mean)

Parameters	CONTROL		BBA ^a		<i>p</i> – value	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Treatment	Time
Milk production	39.11	0.92	39.87	0.92	0.56	<0.01
Fat	3.86	0.11	3.68	0.11	0.27	<0.06
Protein	3.10	0.05	2.96	0.05	0.04	<0.01

Lactose	4.43	0.05	4.46	0.05	0.68	0.19
Total acids	12.27	0.16	12.04	0.16	0.31	0.05

^aBBA = Blend of buffering agents - Commercial blend comprising calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate.

Discussion

Ruminal buffers are frequently used to prevent ruminal acidosis and its deleterious effects on animal health, which include a reduction in dry matter intake, a decrease in nutrient utilization, and reduced FE (Neville et al., 2019). The FE data reflects how much feed the animal consumes and converts into production. In our study, despite the similar milk production between the BBA and CONTROL groups, the animals that received BBA supplementation had lower DMI and higher FE. The animals in the BBA group produced 1.65 ± 0.03 kg of milk for each kilogram of dry matter consumed, while the CONTROL animals produced 1.50 ± 0.03 kg of milk.

During the experimental period, there was an effect of the treatment on the parameters of FE and DMI. Despite a lower DMI, animals in the BBA group exhibited higher FE. In this study, we investigated parameters related to energy metabolism, such as NEFA and BHB, to determine if the lower DMI induced lipolysis, which could explain the higher FE in animals treated with BBA. We also examined the effect of buffers on fecal pH. Fecal pH has been used to predict intestinal pH (Neubauer et al., 2020). Diets high in starch increase the amount of this nutrient to be digested in the intestine, potentially acidifying the pH of this organ and resulting in reduced digestion and increased starch excretion (Neubauer et al., 2020; Abeyta et al., 2023). This may suggest that intestinal buffering enhances starch absorption and could result in higher FE. The results of NEFA, BHB, and fecal pH will be discussed later in the text.

An increase in FE in the BBA group may be related to the higher observed fecal pH in this group, indicating greater intestinal buffering. On the other hand, FE may have been lower and the DMI higher the CONTROL group because sodium bicarbonate can reduce the utilization of the diet by increasing the rate of food passage along the gastrointestinal tract (Russell and Chow 1993; Neville et al., 2019). Other studies also demonstrated that the use of sodium bicarbonate may negatively affect FE (Bernard et al., 2014; Cruywagen et al., 2015). In addition to the higher FE, the BBA group had a lower frequency of access to feeders and tended to have a lower activity rate and meal frequency than the CONTROL group. This suggests that cows supplemented with BBA showed greater use of dietary nutrients and had used less energy than those supplemented with CONTROL according to the monitoring collar data. The activity time detected by the monitoring collars reflects the time spent walking, jumping, and moving the neck and head.

There was also a trend towards lower mobilization of NEFA for BBA animals, which indicates that the increase in FE related to improved use of the diet, as circulating NEFA increases in dairy cows when there is a reduction in DMI (Allen, 2023). Therefore, BBA cows had lower DMI and higher FE, without compromising their body reserves or even manifesting negative energy balance (NEB), as demonstrated by BHB values.

In this study, both treatments efficiently maintained ruminal pH at physiological levels (6.0–7.0) (Humer et al., 2018). These data are consistent with previous studies showing that, when used separately, calcareous calcitic, magnesium oxide, calcareous algae, and sodium bicarbonate stabilized ruminal pH and prevented ruminal acidosis (Cruywagen et al., 2015; Bach et al., 2018). Despite the buffers' proven efficiency, the experiment was conducted on a commercial farm; for this reason, the method used for collecting rumen fluid was ruminocentesis. To ensure animal welfare, only one sample of ruminal fluid was obtained per day, after three hours of feeding. Therefore, variations in the rumen pH throughout the day were

not recorded. To clarify how long the buffers remain in the ruminal environment, we conducted a study with cannulated sheep fed 100% concentrated diets, treated with either sodium bicarbonate or BBA. In the study, sheep treated with sodium bicarbonate experienced a sharp decline in ruminal pH compared to those treated with BBA. The average ruminal pH for the two groups at the end of the study was 5.99 ± 0.03 and 6.21 ± 0.03 for sodium bicarbonate and BBA, respectively (unpublished data).

In other studies, including those by Cruywagen et al. (2015) and Neville et al. (2019), sodium bicarbonate was not effective in buffering ruminal pH for extended periods. In Cruywagen et al. (2015), Holstein dairy cows were fed a potentially acidotic diet, and animals supplemented with sodium bicarbonate remained with a ruminal pH lower than 5.5 for 8.7 h, while those treated with limestone remained with a ruminal pH lower than 5.5 for 4 h. In research conducted by Neville et al. (2019), cows fed diets composed of a 55:45 concentrate to forage ratio and 25% of dry matter as starch, *Lithothamnium calcareum* associated or no with magnesium oxide, maintained the pH of Holstein dairy cows higher for longer than that in animals supplemented with sodium bicarbonate. This occurred due to the greater solubility of sodium bicarbonate in the rumen, compared to calcium carbonate, magnesium oxide, and calcareous seaweed (Neiderfer et al., 2020).

Sodium bicarbonate has high solubility, unlike magnesium oxide, calcareous calcitic, and calcium carbonate, which have lower solubility. The lower solubility of these ingredients probably provided a longer residence time in the gastrointestinal tract (Cruywagen et al., 2015). This may enable these buffers to stabilize intestinal pH and decrease the levels of fecal starch excretion (Rogers et al., 1982; Keyser et al., 1985; Christiansen and Webband 1990; Neiderfer et al., 2020). Greater efficiency in digesting and absorbing starch is observed when the ruminal and intestinal pH are within the physiological range (Berchielli et al., 2006). Conversely, when high concentrations of starch in the diet acidify the small intestine, for example, to a pH below

6.8, the activity of enzymes that digest starch is reduced (Berchielli et al., 2006; Neiderfer et al., 2020). Consequently, starch is less used as an energy source, and the amount of this nutrient in the feces may exceed the ideal level (3%) (Ferraretto, 2017).

In this study, the animals in the BBA group had higher fecal pH than those in the CONTROL group. This suggests that the additives that compose the BBA remain longer in the gastrointestinal tract. Nevertheless, no differences were found considering the levels of fecal starch excretion. This data is similar to that by Neiderfer et al. (2020). In that study, even with the intestinal buffering caused by calcium carbonate associated with magnesium oxide, there was no reduction in fecal starch excretion levels, although the authors explained that the collection methodology could have compromised the results. Neiderfer et al. (2020) justified that the collection methodology may have compromised the results. In our study, individual feces samples were collected weekly. Moreover, these samples were organized into pools. Although the excretion levels were similar between the groups and lower than 3%, the animals in the BBA group showed higher FE. Therefore, a greater number of samples may be necessary to represent the levels of fecal starch.

Throughout the study, treatment influenced the frequency of feeder access and meal duration. Compared to the CONTROL group, animals in the BBA group exhibited a lower frequency of feeder access and longer meal duration. The lower frequency of feeder access in the BBA group is possibly associated with lower dry matter intake (DMI). Additionally, meal duration, representing the time spent per meal, revealed that BBA animals consumed their meals over a longer period than the CONTROL group, which could also contribute to the lower frequency of visits to the feeders.

The lower frequency of access to the feeders may be the reason why the BBA treatment showed a tendency for less time spent in activity. Indirectly, lower energy expenditure on activity could be one of the reasons why BBA animals had higher Feed Efficiency (FE).

Another argument that could be used to explain the effect on FE would be if animals in the BBA group, in addition to having a higher intestinal pH, also excreted less starch. However, starch excretion levels were low in both BBA and CONTROL groups.

Regarding the milk composition parameters, the concentrations of lactose, fat, and total solids were similar between the groups and remained within the ideal limits (Tyasi et al., 2015). A protein concentration in the milk throughout the study was 0.14% higher for the CONTROL animals. This may have been due to a decrease in DMI and a greater FE because a more efficient productivity may have caused a decrease in protein synthesis in the BBA cows. Similarly, Cruywagen et al. (2015) showed that cows supplemented with *Lithothamnium calcareum* had greater FE and a decrease in milk protein. Furthermore, a reduction in protein intake from the diet could also decrease protein levels in the milk (Tyasi et al., 2015). However, this was not the case, as indicators of dietary protein balance such as albumin did not differ between groups (Berchielli et al., 2006; de Almeida et al., 2021), and urea, another indicator of the dietary protein balance, despite being influenced by the interaction between treatment and sampling, remained within physiological limits for the species (González and Silva 2022). Therefore, our results are likely associated with FE.

Variables related to feeding behaviour suggest that the none of the treatments influenced the health of the animals. Consistently, despite the trend towards lower activity of the BBA group, the rates of rumination and idleness were not influenced by the treatments. The rumination rate can be used to monitor animal health (Calamari et al., 2014) Animals affected by ruminal acidosis may initially have their rumination rate reduced by up to 1.5 h and their activity increased in search of concentrated feeds that are more palatable than fiber (Beauchemin, 2018). Still, TPPs and PON1 were not affected by the treatments. The TPPs reflect the levels of albumin, globulins, and fibrinogen.

Globulins and fibrinogen are nonspecific proteins that act on the immune response; high concentrations of these metabolites may indicate inflammatory conditions (Kaneko et al., 1997; Zhao et al., 2018). The PON1 is a negative acute-phase protein, and its concentrations decrease during an immune response. The absence of significant results for these variables indicates that, during the study, the animals remained healthy (Pradeep, 2014; Cavallini et al., 2021).

The results for glucose, NEFA, and BHB show that the energy reserves of the animals in the BBA group were not compromised, even though they had the lowest DMI and highest FE (González and Silva 2022). The calcium and magnesium minerals are cations which their levels of inclusion in the diet can alter the acid-base balance, which will directly influence blood pH (Berchielli et al., 2006; Iqbal et al., 2019). During the study, concentrations of these minerals in the blood remained within physiological limits. There were no differences observed between groups in blood pCO₂ and pH. Cases of ruminal acidosis, can culminate in metabolic acidosis due to an increased absorption of VFA from the rumen into the blood stream (Giger-Reverdin, 2018). In this study, the blood for gas analysis was collected shortly after ruminocentesis. Thus, the pH of the blood also remained within the physiological limits for the species (Corrêa et al., 2010; Sharma et al., 2018).

The concentrations of VFAs were also similar between the groups, which is probably because the animals received the same basal diet. Therefore, the BBA cows were more efficient in utilizing the nutrients in the diet even without increasing the production of VFAs in this group compared to that in the CONTROL group.

The conclusions regarding metabolic parameters indicate that both 1.1% sodium bicarbonate of dry matter (CONTROL) and the commercial mixture composed of calcitic limestone, magnesium oxide, calcareous algae, and 0.5% sodium bicarbonate of DM (BBA) were effective in buffering ruminal pH and maintaining physiological blood pH. Additionally, concerning metabolic parameters, fecal pH suggests that animals treated with BBA had more

efficient intestinal buffering. The most significant results obtained in behaviour and productivity aspects reveal that BBA-treated animals, compared to CONTROL, had lower dry matter intake and, at the same time, higher feed efficiency.

Data availability

The corresponding author may provide the data supporting the results of this study upon reasonable request.

Code Availability

Not applicable.

References

Abeyta MA, Horst EA, Mayorga EJ, Goetz BM, Al-Qaisi M, McCarthy CS, O`Neil MR, Dooley BC, Piantoni P, Schroeder GF, Baumgard LH (2023) Effects of hindgut acidosis on metabolism, inflammation, and production in dairy cows consuming a standard lactation diet. *J Dairy Sci* 106:1429–1440. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22303>

Allen MS (2023) Symposium review: integrating the control of energy intake and partitioning into ration formulation. *J Dairy Sci* 106:2181–2190. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22473>

AOAC (1995) Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Sci Educ, Washington DC

Bach A, Guasch I, Elcoso G, Duclos J, Khelil-Arfa H (2018) Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. *J Dairy Sci* 101:9777–9788. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14353>

Beauchemin KA (2018) Invited review: current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *J Dairy Sci* 101:4762–4784. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>

Berchielli TT, Pires AV, de Oliveira SG (2006) Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: Antunes RC, Rodrigues NM (eds) Nutrição de Ruminantes, 2006. Prol Editora Gráfica, São Paulo, pp 229–248

Bernard JK, West JW, Mullis N, Wu Z, Taylor SJ (2014) Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. *Prof Anim Sci* 30:649–656. <https://doi.org/10.15232/pas.2014-01339>

Bica R, Palarea-Albaladejo J, Kew W, Uhrin D, Pacheco D, Macrae A, Dewhurst RJ (2020) Nuclear magnetic resonance to detect rumen metabolites associated with enteric methane emissions from beef cattle. *Sci Rep* 10:5578

Brito LF, Bedere N, Douhard F, Oliveira HR, Arnal M, Peñagaricano F, Schinckel AP, Baes CF, Miglior F (2021) Review: genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. *Animal* 15:100292. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>

Calamari L, Soriano N, Panella G, Petrera F, Minuti A, Trevisi E (2014) Rumination time around calving: an early signal to detect cows at greater risk of disease. *J Dairy Sci* 97:3635–3647. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7709>

Cao Y, Wang D, Wang L, Wei X, Li X, Cai C, Lei X, Yao J (2021) Physically effective neutral detergent fiber improves chewing activity, rumen fermentation, plasma metabolites, and milk production in lactating dairy cows fed a high-concentrate diet. *J Dairy Sci* 104:5631–5642. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19012>

Cardoso FC, Kalscheur KF, Drackley JK (2020) Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. *J Dairy Sci* 103:5684–5693. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17271>

Cavallini D, Mammi LME, Buonaiuto G, Palmonari A, Valle E, Formigoni A (2021) Immune-metabolic-inflammatory markers in Holstein cows exposed to a nutritional and environmental stressing challenge. *J Anim Physiol Anim Nutr* 105:42–55. <https://doi.org/10.1111/jpn.13607>

Christiansen' ML, Webb IE (1990) Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide beef cattle fed a high-concentrate diet with, defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. *J Anim Sci* 68:2105–2118. <https://doi.org/10.2527/1990.6872105x>

Corrêa MN, González FHD, da Silva SC (2010) Transtornos do equilíbrio ácido-básico. In: Corrêa MN, González FHD, da Silva SC, Schneider A (eds) 2010, transtornos metabólicos nos animais domésticos. Editora E Gráfica Universitária, Rio Grande do Sul. pp 67–90

Cruywagen CW, Taylor S, Beya MM, Calitz T (2015) The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *J Dairy Sci* 98:5506–5514.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8875>

da Mata DG, Ítavo LCV, Ferreira Ítavo CCB, Ferreira JD, de Paulino J, de Moraes PVR, Niwa GJ, Kozerski MVG, Leal ND, Mioto da Costa ES, MC (2023) Ruminal responses, digestibility, and blood parameters of beef cattle fed diets without forage with different hybrids and processing of the corn. *J Anim Physiol Anim Nutr* 107:367–378.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13728>

de Almeida Ollé M, Demarco CF, de Oliveira L, Cardoso JB, Barbosa AA, de Oliveira Feijó J, Rabassa VR, Schmitt E, Corrêa MN, Brauner CC, Burkert D, Pino FA (2021) Effects of substituting sweet potato flour for ground corn on performance, feeding behavior, and metabolism of dairy cows. *Trop Anim Health Prod* 53:390. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02836-7>

de Campos FT, Rincon JAA, Acosta DAV, Silveira PAS, Pradieé J, Corrêa MN, Gasperin BG, Pfeifer LFM, Barros CC, Pegoraro LMC, Schneider A (2017) The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. *Theriogenology* 89:244–249.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.013>

De Vos (2019) Effect of feed additive supplementation on rumen bacterial amino acid profile and fermentation dynamics in dairy cows. Unpublished MS dissertation, University of Pretoria

Detmann E, Valadares Filho SC (2010) On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arquivo Brasileiro De Med Veterinária E Zootecnia* 62:980–984. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400030>

Elmhadi ME, Ali DK, Khogali MK, Wang H (2022) Subacute ruminal acidosis in dairy herds: microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Anim Nutr* 10:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.12.008>

Ferraretto LF (2017) Impact of starch content and digestibility. In dairy cattle diets. In: 28th annual florida ruminant nutrition symposium, 2017. University of Florida, Gainesville, pp 112–123

Giger-Reverdin S (2018) Recent advances in the understanding of subacute ruminal acidosis (SARA) in goats, with focus on the link to feeding behaviour. *Small Ruminant Res* 163:24–28. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.08.008>

González FHD, Silva SC (2022) Perfil Bioquímico Sanguíneo. In: González, FHD, Silva, SC, Cerón, JJ, Gaona, RC, Pöppl, AG (eds) *Introdução à bioquímica clínica veterinária*, 2022. Editora UFRGS, Rio Grande do Sul, pp 463–515

Hassan F, Arshad MA, Ebeid HM, Rehman MS, Khan MS, Shahid S, Yang C (2020) Phylogenetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. *Front Veterinary Sci* 7:575801. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>

Hauser A, França M, Hauser R, Scheid AL, Perazzoli L, Mendes BPB, Telles IP, Milette LC, Thaler A (2023) Effect of heat stress and solar radiation on dry matter intake, biochemical indicators, production, and quality of Holstein and Jersey cows' milk. Arquivo Brasileiro De Med Veterinária E Zootecnia 75:721–734. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12884>

Humer E, Petri RM, Aschenbach JR, Bradford BJ, Penner GB, Tafaj M, Südekum K-H, Zebeli Q (2018) Invited review: practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. J Dairy Sci 101:872–888. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>

Iqbal A, Qudoos A, Çetingül IS, Shah SRA, Bayram I (2019) Role of cationic and anionic feeding in farm animals. J Anim Sci Prod 2:38–45

ISO 9622:2013 (IDF 141) (2013) In: Milk and liquid milk products. Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. <https://www.iso.org/standard/56874.html>. Acessed 13 January 2023

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (1997) Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds) clinical biochemistry of domestic animals, 1997. Editora Academic Press, Massachusetts, pp 117–138

Keyser RB, Noller CH, Wheeler LJ, Schaefer DM (1985) Characterization of limestones and their effects in vitro and in vivo in dairy cattle. J Dairy Sci 68:1376–1389. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80974-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80974-7)

Linn J (2006) Feed efficiency: its economic impact in lactating dairy cows. In: WCDS Advances in Dairy Technology, pp 19–28

National Research Council (NRC) (2001) Basic research opportunities in earth science. National Academy, Washington DC

Natnael DA, Tao W, Gui-Xin Q, Yu-Guo Z, Xue-Feng Z, Xue C, Atiba EM, Seidu A (2020) Effects of physically effective fiber on rumen and milk parameters in dairy cows: a review. Indian J Anim Res 54(11):1317–1323. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-1104>

Neiderfer KP, Barnard AM, Moyer KZ, Trench AM, Taylor AE, Cronin SK, Gressley TF (2020) Effects of calcium carbonate, magnesium oxide and encapsulated sodium bicarbonate on measures of post-ruminal fermentation. J Anim Physiol Anim Nutr 104:802–811. <https://doi.org/10.1111/jpn.13331>

Neubauer V, Petri RM, Humer E, Kröger I, Reisinger N, Baumgartner W, Wagner M, Zebeli Q (2020) Starch-rich diet induced rumen acidosis and hindgut dysbiosis in dairy cows of different lactations. Animals 10:1727. <https://doi.org/10.3390/ani10101727>

Neville EW, Fahey AG, Gath VP, Molloy BP, Taylor SJ, Mulligan FJ (2019) The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk production in mid-lactation dairy cows. J Dairy Sci 102:8027–8039. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16244>

Pradeep M (2014) Application of acute phase proteins as biomarkers in modern veterinary practice. Indian J Veterinary Anim Sci Res 43:1–13

Rogers JA, Davis CL, Clark JH (1982) Alteration of rumen fermentation, milk fat synthesis, and nutrient utilization with mineral salts in dairy cows. J Dairy Sci 65:577–586. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82235-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82235-2)

Russell JB, Chow JM (1993) Another theory for the action of Ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. J Dairy Sci 76:826–830. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77407-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77407-X)

SAS Institute Inc. (1989–2024) JMP®, Version Pro 14. Cary, NC

Sharma H, Pal RP, Mir SH, Mani V, Ojha L (2018) Effect of feeding buffer on feed intake, milk production and rumen fermentation pattern in lactating animals: a review. J Entomol Zool Stud 6:916–922

Soares BB, Eifert EDC, Magnabosco CDU, Costa M, Guimarães N, Carvalho R, Rabouças GF, Crozara AS (2018) Correlação do consumo alimentar residual com características de desempenho em animais da raça nelore. In: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia - congresso brasileiro de zootecnia, 2018. Goiânia, Goiás, Brasil, August 27th to August 30th, pp 1–5

Tajik J, Nadalian MG, Raoofi A, Gholam GR, Mohammadi R, Bahonar AR (2011) Evaluation of rumenocentesis practicability as a routine diagnostic evaluation of rumenocentesis

practicability as a routine diagnostic technique in veterinary practice technique in veterinary practice. *Veterinarski Arhiv* 81:557–561

Tyasi TL, Gxasheka M, Louis Tyasi T, Tlabela CP (2015) Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: a review assessment of production systems and breeding practices of goat and donkey farmers in Limpopo Province, South Africa view project livestockproduction and genetic improvements view project assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: a review. *Int J Curr Sci Res* 17:56–63

Vallejo-Timarán D, Reyes-Vélez J, VanLeeuwen J, Maldonado-Estrada J, Astaiza-Martínez J (2020) Incidence and effects of subacute ruminal acidosis and subclinical ketosis with respect to postpartum anestrus in grazing dairy cows. *Helijon* 6:e03712.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03712>

Zhang T, Mu Y, Zhang R, Xue Y, Guo C, Qi W, Zhang J, Mao S (2022) Responsive changes of rumen microbiome and metabolome in dairy cows with different susceptibility to subacute ruminal acidosis. *Anim Nutr* 8:331–340. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.10.009>

Zhao C, Liu G, Li, Xiaobing, Guan Y, Wang Y, Yuan X, Sun G, Wang Z, Li X (2018) Inflammatory mechanism of Rumenitis in dairy cows with subacute ruminal acidosis. *BMC Vet Res* 14:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1463-7>

3.2 Artigo 2

Estudo *in vitro*: impacto da adição de um aditivo à base de *Aspergillus* na digestibilidade de dietas totalmente misturadas

Laura Valadão Vieira¹, Matheus Rebouças Pupo², Eliza Rossi Komninou¹, Luiz Felipe Ferrareto², Marcio Nunes Corrêa¹

Será submetido à revista Journal of Dairy Science

Título abreviado: Impacto do Aditivo *Aspergillus* na Digestibilidade

Título descritivo: Estudo *in vitro*: impacto da adição de um aditivo à base de *Aspergillus* na digestibilidade de dietas totalmente misturadas

L. V. Vieira^{1*}, M. R. Pupo², E. R. Komninou¹, L. F. Ferraretto², M. N. Corrêa¹

¹NUPEEC HUB (Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária), Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, Pelotas, RS, Brazil

²Department of Animal and Dairy Sciences, University of Wisconsin, Madison, WI, USA

*Autor correspondente: Laura Valadão Vieira, Campus Capão do Leão, S/N, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-610, 53 999527787, lauravaladaovieira@gmail.com

RESUMO

O micélio de *Aspergillus* spp. pode facilitar a liberação de enzimas e aumentar a concentração bacteriana no rúmen. Esses fungos podem produzir enzimas como celulase, pectinase, alfa-amilase, protease e ligninase; contribuindo, portanto, para a digestão ruminal. No entanto, os potenciais efeitos sinérgicos de sua combinação na degradabilidade de nutrientes não estão bem definidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de uma co-cultura de *A. oryzae* e *A. niger* (AOAN) na degradabilidade *in vitro* de matéria seca (dMS), matéria orgânica (dMO) e fibra em detergente neutro (dFDN) de dietas leiteiras em um arranjo fatorial 2 × 3 de tratamentos. Os tratamentos foram uma dieta baseada em silagem de milho (40% MS), substituição parcial da silagem de milho por casca de soja (10% MS) e substituição parcial da silagem de milho por palha de trigo (10% MS) e a inoculação sem (CON) ou com 0,02% MS de AOAN (American Biosystems, Roanoke, EUA). Amostras duplicadas de 0,5 g foram pesadas em sacos F57 e incubadas em frascos de vidro de gargalo largo de 250 mL, contendo fluido ruminal, meio tampão, além de micro e macrominerais. Os pontos de tempo de incubação foram 12, 30, 48 e 120 h em três execuções independentes. Os dados foram analisados separadamente para cada dieta como um delineamento completamente randomizado usando um modelo misto incluindo AOAN como efeito fixo, e cada execução independente foi um efeito aleatório. A digestibilidade da matéria orgânica foi maior e a dMS apresentou uma tendência a ser maior para dietas de palha de trigo inoculadas com AOAN em comparação com CON em 30 h. Nenhum efeito na degradabilidade de nutrientes *in vitro* foi observado para dietas de casca de soja. A digestibilidade da MO tendeu a ser maior em 48 h para CON em comparação com AOAN em dietas baseadas em silagem de milho. Da mesma forma, maior dMO foi observada

para CON em comparação com AOAN em 120 h em dietas baseadas em silagem de milho. Esses resultados sugerem que a inoculação de AOAN em dietas fibrosas pode melhorar a degradabilidade de nutrientes. No entanto, mais investigações *in vivo* são necessárias.

Palavras-chave. *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*;

AOAN: *Aspergillus oryzae e Aspergillus niger*

AOAN: *Aspergillus oryzae*

INTRODUÇÃO

Historicamente, a dieta de bovinos leiteiros pode apresentar uma inclusão entre 40 a 100% de forragens (Kong et al., 2021; dos Santos et al., 2022). As forragens exercem um papel crucial na manutenção da saúde do rúmen, ao estimularem a ruminação e salivação (Beauchemin, 2018). Um rúmen em condições fisiológicas é ideal para uma digestão eficiente dos alimentos. Entretanto, apesar do incontestável papel da fibra, dificilmente uma alimentação exclusivamente composta por forragem é capaz de suprir as demandas energéticas de uma vaca em lactação, especialmente pelo fato de que a complexa ligação celular das plantas torna a microbiota do rúmen incapaz de utilizar o máximo de nutrientes disponíveis no alimento (Kong et al., 2021; Elghandour et al., 2023), sendo o tempo de permanência dos alimentos fibrosos no ambiente ruminal insuficiente para complementar o processo de fermentação (Elghandour et al., 2023). Um exemplo disso é que tipicamente os microrganismos ruminais são capazes de digerir somente metade da fibra em detergente neutro (**FDN**) da silagem de milho de planta inteira (Ferraretto and Shaver, 2015).

As dietas totalmente misturadas (**TMR**) substituem uma alimentação que antes era composta por forragens frescas nos meses mais quentes e por feno ou silagem nos períodos mais frios. Os primeiros relatos referentes à alimentação de vacas leiteiras com TMR no *Journal of Dairy Science* são da década de 1950 (Schingoethe, 2017). Na década de 1960, McCoy et al. (1966) foram os primeiros a relatar que a TMR oferecia uma alimentação mais completa, capaz de suportar altos níveis de produção leiteira. Em perspectiva global, a silagem de milho é uma das principais fontes de forragem adicionadas à TMR de vacas leiteiras, por possuir fibra fisicamente efetiva e energia para suportar a lactação (Zardin et al., 2017; Miller et al., 2021; Diepersloot et al., 2022; Pupo and Ferraretto, 2023). Contudo as flutuações no preço do milho, podem tornar a silagem um ingrediente de alto custo (Silvestre et al., 2022).

Subprodutos da produção agrícola podem ser utilizados para substituir a silagem de milho, sem comprometer a eficiência alimentar (Silvestre et al., 2022). Desde a década de 1990, subprodutos da produção agrícola foram incorporados nas TMRs, na tentativa de minimizar os valores investidos na nutrição, que podem representar 70% dos custos para produzir leite (Schingoethe, 2017; Sucu et al., 2018). A casca de soja, um subproduto da soja, é uma alternativa de fibra não efetiva, especialmente para países que se destacam como grandes produtores de soja, como é o caso do Brasil e dos Estados Unidos. A casca de soja é composta por altos teores de celulose (28,6 - 52,3%), hemicelulose (18,5 - 33,8%) e um baixo conteúdo de lignina (2,3 - 13,1%), sendo então, classificada como fonte de fibra rapidamente fermentável (Bittencourt et al., 2021). O conteúdo de energia da casca da soja se assemelha aos grãos, o que torna uma alternativa para reduzir os níveis de amido na dieta, sem prejudicar a saúde ruminal e a produção dos animais (Tonde et al., 2024).

Incluir palha de trigo, outro subproduto da produção agrícola, na dieta de ruminantes pode ser uma maneira de evitar a poluição atmosférica, causada pela queima da palha após a colheita do trigo, especialmente em países com alta produção dessa cultura, como é o caso dos Estados Unidos, que ocupa a 5º posição entre os países maiores produtores de trigo (Raghuvanshi et al., 2014; USDA, 2024). Nutricionalmente, a palha de trigo apresenta uma composição pobre em energia e proteína, além de fibras com baixa digestibilidade, devido a alta concentração de lignina (Janovick et al., 2011). Entretanto, a palha de trigo pode ser uma alternativa de volumoso para animais no período seco, pois promove o preenchimento ruminal, além de servir como estratégia para diminuir o consumo de energia e evitar o ganho de peso, resultando em uma melhor adaptação ao período de transição (Janovick et al., 2011; Havekes et al., 2020). Além disso, pode ser utilizada para substituir parcialmente a silagem de milho para vacas em lactação, desde que em pequenas inclusões, não prejudicando o conteúdo energético da dieta.

Os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* podem ser utilizados como prebióticos em dietas formuladas com diferentes fontes de forragem, devido ao seu potencial enzimático que auxilia no processo de digestão ruminal, como: celulase, pectinase, ligninase e amilase (Puniya et al., 2015; Okpara, 2022). O *A. oryzae* é mais popularmente estudado na alimentação de ruminantes, afetando positivamente as digestibilidades de fibra, de matéria seca e matéria orgânica; portanto, contribuindo para o melhor desempenho animal (Mojsov et al., 2016; Sucu et al., 2018; Kong et al., 2021). Em contrapartida, alguns trabalhos não demonstraram qualquer efeito com a suplementação do *A. oryzae*, sugerindo que esse microrganismo pode ter atuação dependente da dieta formulada (Podversich et al., 2023). Apesar de serem escassos os estudos

que avaliaram a atividade do *A. niger* ou a combinação de *A. oryzae* com *A. niger*, os poucos resultados disponíveis na literatura indicam um efeito de sinergia entre esses fungos (Benoit-Gelber et al., 2017; Kong et al., 2021)

A hipótese foi que o uso de um prebiótico com a combinação de *A. oryzae* e *A. niger* aumenta a digestibilidade de nutrientes das dietas, com efeito mais pronunciado em dietas mais fibrosas. Portanto, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar os efeitos da inoculação de um co-cultivo de AOAN na digestibilidade *in vitro* de dietas de vacas leiteiras contendo diferentes fontes de forragem.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo da Universidade de Wisconsin-Madison.

Preparo das amostras para incubação

Para este estudo foram utilizadas três formulações diferentes em forma de TMR, calculadas para atender ou exceder os requerimentos das vacas em lactação baseado no NASEM (2021), sendo: TMR silagem de milho AOAN: 80g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 80g de concentrado + 0.04g AOAN; TMR silagem de milho CON: 80g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 80g de concentrado; TMR substituição parcial da Silagem de Milho pela Casca de soja -AOAN: 60g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 20g casca de soja + 80g de concentrado + 0.04g AOAN; TMR substituição parcial da Silagem de Milho pela Casca de soja CON: 60g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 20g casca de soja + 80g de concentrado; TMR substituição parcial da Silagem de Milho pela Palha de Trigo AOAN: 60g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 20g palha de trigo + 80g de concentrado + 0.04g AOAN; TMR substituição parcial da Silagem de Milho pela Palha de Trigo CON: 60g de silagem de milho + 40g de silagem de alfafa + 20g palha de trigo + 80g de concentrado (Tabelas 1, 2).

As TMRs foram secas por 48 horas em estufa de ar forçado (60°C) e moídas em um moinho Wiley para passar por uma peneira de 1 mm. Um blend contendo AOAN (American Biosystems, Roanoke, EUA) na dose de 0,02% da MS (0,04g) foi adicionado às amostras das TMRs. As amostras controle (CON), não foram tratadas com o blend. Amostras de cada tratamento foram pesadas (aproximadamente, $0,5g \pm 0,001$) em triplicatas e incubadas em sacos F57 (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, EUA) com dimensões de 5x5 cm e porosidade de 25 μ m. Amostras de alfafa moída a 1mm, com as digestibilidades da matéria seca, da matéria orgânica e FDN já conhecidas também foram pesadas em triplicata, na mesma quantidade de

0,5g ± 0,001. Além disso, sacos brancos, que consistem apenas nos sacos F57 vazios, também foram pesadas em triplicata. Todos os sacos foram selados a quente. No total foram realizadas três corridas (consideradas repetições), com os tempos de incubação de 12, 30, 48 e 120 horas (Figura 1).

Todas as amostras foram incubadas juntas e retiradas da incubação à medida que completavam o seu tempo de incubação.

Preparo das soluções para incubação

Para incubação foi utilizada a metodologia de Goeser and Combs (2009). Previamente à incubação foram preparadas: solução de macrominerais, solução de microminerais, primer, solução tampão, solução indicadora resazurina, solução de hidróxido de sódio e solução redutora. No Quadro 1 encontra-se a descrição das soluções.

Quadro 1. Descrição das soluções para o teste *in vitro*.

Solução Macrominerais (1800 amostras)	Solução Microminerais (2500 amostras)	Primer	Tampão (1800 amostras)	Indicador Resazurina	Hidróxido de sódio	Solução Redutora (150 amostras)	Solução para incubação
18 litros de água destilada	13,2g CaCl ₂ .2H ₂ O	40% celulose	18 litros de água destilada	0,1% do indicador Resazurina	40g de hidróxido de sódio	1,875g de Cisteína Hcl	4000ml de água destilada
102,6g de Na ₂ HPO ₄ anhydrous	10,0g MnCl ₂ . 4H ₂ O	20% ureia	630g de bicarbonato de sódio	100 ml de água destilada	1 litro de água destilada	1,875g Na ₂ S·9H ₂ O	2000ml de solução de macrominera 1
116g de KH ₂ PO ₄ Anhydrous	1,0gCoCl. 6H ₂ O	20% amido	72g de bicarbonato de amônio			290 ml de água destilada	16 gramas de Peptona tripticase
10,5g de MgSO ₄ .7H ₂ O	8,0g FeCl ₃ . 6H ₂ O	20% celobiose				12 ml 1N NaOH	0,8ml de solução micromineral
	100 ml de água destilada						8 ml de resazurina

As soluções apresentadas no Quadro 2, com exceção da solução redutora e de incubação, foram preparadas no dia anterior ao início do teste. A celulose do primer foi obtida a partir da moagem de papel filtro 42 Ashless diâmetro 150mm (Whatman®, EUA) em moinho Willey a 1 milímetro.

No dia anterior à incubação, 9 Erlenmeyers de 1000ml foram abastecidos com 250ml de solução tampão e purgados com **CO₂**. Estes Erlenmeyers foram fechados com rolha de borracha e mantidos em uma sala aquecida a 39°C. O primer foi pesado e também mantido na mesma sala aquecida, para que no dia seguinte, fosse adicionado a mesma quantidade de 0,3125 g de primer em cada um dos 9 Erlenmeyers. Também no dia anterior à incubação, as amostras de **TMR** pesadas nos sacos F57 foram acomodadas em Erlenmeyers de 125ml, os quais no dia seguinte seriam utilizados para a incubação. No dia da incubação, enquanto o líquido ruminal estava sendo coletado, a solução redutora foi preparada em capela de exaustão, e 9 seringas de 60 ml foram utilizadas para armazenar 50 ml de solução redutora. Essas seringas foram fechadas com parafilme e levadas para a sala aquecida a 39°C.

Coleta de líquido ruminal e incubação

Amostras de líquido ruminal foram obtidas de duas vacas da raça Holandês, canuladas no rúmen. Os animais eram mantidos em um sistema de alojamento tie-stall no Dairy Cattle Center, University of Wisconsin–Madison (Madison, WI) e alimentadas com uma dieta composta por 21,0% de silagem de milho, 30,5% de silagem de alfafa, 42,7% de mistura concentrada e 5,8% de caroço de algodão integral.

Aproximadamente 2L de líquido ruminal foi coletado de cada uma das vacas, com a utilização de bomba a vácuo. O líquido ruminal foi transportado até o laboratório em garrafa térmica pré-aquecida e então filtrado através de 4 camadas de gaze.

Após a filtragem, o líquido ruminal foi levado até a sala aquecida a 39°C. Com a utilização de um dispensador, 50ml de líquido ruminal foram colocados em cada um dos 9 Erlenmeyers contendo primer e solução tampão, de maneira rotativa, até que a quantidade de 250ml de líquido ruminal fosse atingida. Durante esse procedimento de colocação de líquido ruminal, os Erlenmeyers foram continuamente purgados com **CO₂**. Após a colocação do líquido ruminal, cada um dos 9 Erlenmeyers recebeu 50ml de solução redutora e posteriormente foi fechado com rolha de borracha.

Os 9 Erlenmeyers foram levados para uma incubadora agitadora (New Brunswick Scientific®, EUA) onde permaneceram por 30 minutos, a 39°C e 85 **rpm** ou até atingirem a pressão de 20 **psi**. Após esse período, o líquido ruminal foi reunido em um único frasco junto com a solução de incubação.

Com o auxílio de um dispensador, 104 ml de líquido ruminal foram adicionados em cada um dos Erlenmeyers de 125ml, os quais foram incubados em um sistema *in vitro* de incubação (Precision[®], EUA).

O **pH** de cada um dos Erlenmeyers foi aferido imediatamente após o término do período de incubação, através da utilização de um pHmetro de bancada (Accumet AB150, FisherBrand[®], EUA). Os sacos contendo as amostras foram colocados em um recipiente com gelo, de modo a interromper a fermentação ruminal.

Digestibilidade da matéria seca, digestibilidade da matéria orgânica e digestibilidade da fibra em detergente neutro

Os sacos F57 contendo as amostras foram colocados em estufa com ventilação de ar forçado a 60°C por 48 horas e posteriormente pesados em balança analítica, para determinação da matéria seca.

A digestibilidade da matéria seca (**dMS**) foi determinada a partir da diferença entre a matéria seca das diferentes TMR e a matéria seca das amostras após a incubação de acordo com Khattab et al. (2018):

Digestibilidade *In vitro* (%) = 100- (peso residual da amostra com o saquinho após o teste *in vitro* e secagem - peso do saco antes da incubação * a média dos dois sacos em branco antes da incubação) / peso da amostra antes da incubação * 100

A análise de FDN, seguiu a metodologia de Goering and Van Soest (1970). Os reagentes necessários são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Reagentes necessários para análise de fibra em detergente neutro (FDN).

Solução para FDN ¹	Alfa-amilase	Sulfito de sódio	Acetona
17,8 L de água destilada	4 ml	20 g	150 ml
540 g de lauril sulfato de sódio			Manusear em capela de exaustão. A acetona é utilizada para embeber os sacos contendo as amostras, por 2 minutos, após a condução da análise de FDN .
335 g de ácido etilenodiaminotetracético			
122,6 g borato de sódio, daca-hidratado			
82,1 g de fosfato de sódio, dibásico			
180 ml de trietilenoglicol			

¹Preparo da solução de FDN: Despeje em um becker metade da água destilada e coloque-o em uma placa de agitação. Adicione os reagentes restantes, exceto o trietilenoglicol. Adicione lentamente a outra metade de água destilada, evitando a formação de espuma. Quando aproximadamente ¾ da água for adicionada, adicione o trietilenoglicol. Deixe homogeneizar durante a noite. Verifique o pH, que precisa estar na faixa de 6,9 a 7,1. Se necessário ajuste o pH com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Após a determinação da MS, 24 sacos F57 incluindo o branco, foram colocados no digestor de fibras Ankon 200/220 fiber analyser (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, EUA), junto com 2 litros de solução de FDN, 20 g de sulfito de sódio e 4 ml de alfa-amilase, por 75 minutos, a 100°C, sob agitação. Após esse período, a solução de FDN foi descartada, através da abertura da válvula de drenagem, e realizou-se o enxágue dos saquinhos utilizando 2l de água destilada quente (90-100°C) contendo 4 ml de alfa-amilase, por 5 minutos, e então, a água era esgotada a partir da abertura da válvula. O procedimento de enxágue foi repetido duas vezes. Depois, realizou-se o enxágue com 2 l de água destilada em temperatura ambiente e de modo corrente. Feitos os enxágues, os sacos foram submersos em um becker contendo aproximadamente 150 ml de acetona, por 3 minutos e depois de secos, levados a estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 48 horas. Esse processo se repetiu até que todos os sacos F57 utilizados na incubação fossem analisados. Para determinar o FDN foi utilizado o cálculo (Goeser and Combs, 2009):

$$\text{FDN (\% da MS)} = [(\text{peso do saco} + \text{peso do resíduo}) - (\text{peso do saco} \times \text{peso do saco utilizado como fator de correção})] / [(\text{peso do saco} + \text{amostra}) - (\text{peso do saco})] \times 100$$

O fator de correção é o peso do saco vazio (branco) e selado, dividido pelo peso do mesmo saco após passar pela incubação *in vitro*. A digestibilidade de FDN (**dFDN**) foi determinada a partir do cálculo:

Digestibilidade do FDN *In vitro* (%) = 100- (peso residual do FDN com o saquinho após o teste *in vitro* e secagem - peso do saco antes da incubação * a média dos dois sacos em branco antes da incubação) / peso da amostra antes da incubação * 100

Para análise de cinzas, cadiinhos pré-identificados foram colocados em estufa com circulação de ar forçado a 105°C, por 2 horas, depois armazenados em um dessecador até que esfriassem, para então serem pesados. Nestes cadiinhos foram colocados os sacos F57 após a determinação do FDN. A análise foi conduzida a partir da colocação dos cadiinhos na mufla por 5 horas, a 500°C. O teor de cinzas foi calculado de acordo com os métodos 22.010 e 7.010 (AOAC 1975):

$$\begin{aligned}\text{Peso das cinzas} &= (\text{peso do cadiinho com as cinzas}) - \text{peso do cadiinho} \\ \% \text{ de cinzas} &= (\text{peso das cinzas} / \text{peso original da amostra}) \times 100\end{aligned}$$

Os valores de cinzas obtidos foram utilizados para determinação da matéria orgânica (**MO**), através da fórmula:

$$MO = 100 - (\text{peso das cinzas} / \text{peso original da amostra}) \times 100$$

A digestibilidade da matéria orgânica (**dMO**) foi determinada através da fórmula (Khattab et al., 2018):

Digestibilidade da MO *In vitro* (%) = 100- (peso residual da MO com o saquinho após o teste *in vitro* e secagem - peso do saco antes da incubação * a média dos dois sacos em branco antes da incubação) / peso da amostra antes da incubação * 100

Análise estatística

As dietas foram analisadas separadamente para avaliar os efeitos do aditivo para cada tempo de incubação. Os dados foram analisados usando bloco completamente casualizado com corrida considerada como bloco usando o procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo incluiu aditivo como efeito fixo para todas as variáveis. O bloco foi o único efeito aleatório para todas as variáveis. As médias foram determinadas usando a declaração LSMEANS e comparadas usando a opção de ANOVA e teste t de Bonferroni. A significância foi declarada em $P \leq 0,05$ e tendência $P > 0,05$ a $P < 0,10$.

RESULTADOS

Os dados obtidos na dieta formulada com silagem de milho são apresentados na Tabela 3. A suplementação de AOAN resultou em uma tendência ($P = 0,06$) de menor dMO nas 48 horas e uma menor dMO ($P = 0,03$) nas 120 horas de incubação. Além disso, nas 120 horas de incubação, foi observado um efeito no pH ruminal, onde a média de pH foi maior ($P = 0,03$) para TMR CON.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da inclusão do blend AOAN em uma TMR em que a silagem de milho foi parcialmente substituída por casca de soja. Foi observado um efeito no pH ruminal nas 120 horas de incubação, sendo o pH mais alto ($P = 0,02$) na TMR suplementada com AOAN.

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados de pH, dMS, dMO e dFDN em uma TMR onde a silagem de milho foi substituída parcialmente por palha de trigo. Foi observado uma maior dMO ($P = 0,04$) após 30 horas de incubação, para a TMR com a suplementação de 0,02% da MS de AOAN em relação a TMR controle. Além disso, para este mesmo tempo de incubação, houve uma tendência para uma maior dMS ($P = 0,07$) para TMR tratada com AOAN.

DISCUSSÃO

O pH é um importante indicador de saúde ruminal, com uma variação fisiológica de 5,5 a 6,9 (Puniya et al., 2015) ou ainda 6 a 7 (Guo et al., 2022).

Resultados anteriores demonstraram que a suplementação com *A. oryzae*, em estudos *in vivo*, aumentou a população de três importantes bactérias fibrolíticas: *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes* (Beharka and Nagajara, 1998), o que pode melhorar a digestão da fibra e estabilizar o pH ruminal (Sucu et al., 2018). Em dietas de alto concentrado, o aumento de *Megaesphaera eldeshii*, um efeito da suplementação com *A. oryzae*, também contribuiu para a manutenção do pH ruminal em níveis fisiológicos (Ungerfeld et al., 2020). Prill'ge et al. (1979) demonstraram que a suplementação de *A. oryzae* aumentou a concentração de fungos no ambiente ruminal; estes por atuarem na digestão da fibra, também contribuem para estabilização do pH. Ainda assim, um estudo *in vitro* revelou que a suplementação com AOAN reduziu o pH ruminal, entretanto, a faixa de pH variou entre 6 e 7 (Kong et al., 2021). Uma pequena redução no pH pode estar associada ao acúmulo de ácido acético e butírico, que sugerem uma maior fermentação ruminal, provocada pela suplementação com esses fungos (Newbold et al., 1991; Cantet et al., 2025).

A manutenção do pH é um fator importante, pois cria um ambiente ruminal favorável para a multiplicação de bactérias anaeróbicas, sensíveis ao pH ácido, como é o caso das bactérias que digerem fibras (Guo et al., 2022). No presente estudo foi observado um aumento no pH ruminal com a suplementação de AOAN com substituição parcial da silagem de milho pela casca de soja após 120 horas de incubação. Para a dieta formulada à base de silagem de milho, o pH nas 120 horas de incubação foi maior para o grupo CON. Apesar dos resultados encontrados, os valores de pH obtidos mantiveram-se na faixa de valores recomendados pela literatura. Esses resultados confirmam a viabilidade do líquido ruminal durante todo o período de teste, o que suporta os demais resultados discutidos a seguir. Entretanto, em condições *in vivo*, o tamanho de partícula do *Aspergillus* spp. oferecidas moídas, pode resultar em um tempo de retenção ruminal menor do que 120 horas, não havendo qualquer aumento ou redução no pH.

O FDN da dieta corresponde aos carboidratos fibrosos estruturais: celulose, hemicelulose e lignina (Detmann et al., 2010). O conteúdo de FDN e a digestibilidade do FDN estão diretamente relacionados ao preenchimento ruminal e a ingestão de matéria seca, de tal maneira que dietas de baixa digestibilidade podem contribuir para a redução na ingestão (NASEM, 2021). A digestibilidade do FDN da forragem depende da fonte, do tempo de retenção ruminal e saúde do rúmen, com uma variação entre 25 a 75% MS segundo o NRC (2001).

A fibra da casca de soja apresenta baixa lignina e pode ser amplamente degradada pelos microrganismos ruminais (Hao et al., 2021). Os fungos *Aspergillus* spp. apresentam em sua composição compostos bioativos que facilitam a liberação de enzimas bacterianas e o crescimento de bactérias fibrolíticas (Beharka and Nagajara, 1998; Lubis et al., 2002; Uwineza et al., 2024), o que pode tornar a digestibilidade da casca de soja ainda mais eficiente. Além disso, as enzimas fúngicas realizam uma digestão parcial da celulose, em açúcares simples, o que auxilia as bactérias celulolíticas do rúmen a complementarem a digestão da fibra (Uwineza et al., 2024). Estudos *in vitro* ou *in situ* não consideram o efeito da taxa de passagem e podem superestimar a digestibilidade (NASEM, 2021). Ipharrague and Clark (2003) descreveram que a digestibilidade da casca de soja pode chegar a 90% em 96 horas de incubação. Efeitos como este não foram encontrados neste trabalho, principalmente porque a casca de soja não foi avaliada isoladamente, mas também por conta de uma porcentagem de inclusão menor que ao estudo anterior. Neste trabalho, o maior desaparecimento do FDN, em uma dieta que substituiu parcialmente silagem de milho por casca de soja, foi observado nas 120 horas de incubação, mas nenhum efeito da inclusão de AOAN foi encontrado.

Os resultados se assemelham às respostas do estudo *in vivo* realizado por Sievert and Shaver (1993), que demonstraram que *A. oryzae* não afetou a digestão do FDN da casca de soja. Além disso, no estudo de Russel et al. (2016) uma mistura comercial de *A. oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma viride* não afetou a digestibilidade de FDN da casca de soja.

Por outro lado, o FDN da palha de trigo é de aproximadamente 81% na matéria seca com alta concentração de lignina, o que torna a sua digestibilidade ruminal baixa (Raghuvanshi et al., 2014; Malik et al., 2020). A lignina, por ser um material de cementação da parede celular da planta, restringe a acessibilidade máxima de carboidratos aos microrganismos do intestino de ruminantes (Shrivastava et al., 2014). O adequado aproveitamento da palha de trigo depende da degradação parcial ou completa da lignina do complexo lignocelulósico (Thareja et al., 2006). Os fungos da podridão branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes* e *Ceriporiopsis subvermispora* são conhecidos por degradar a lignina de maneira eficiente por meio da ação de enzimas lignolíticas oxidativas, como lignina peroxidase, peroxidase de manganês e lacase (Shrivastava et al., 2011; Nayan et al., 2019). Os fungos do gênero *Aspergillus* spp. apresentam um crescimento mais rápido e podem ser uma alternativa aos fungos da podridão branca e o co-cultivo de *A. niger* e *A. oryzae* apresenta potencial em aumentar a produção de enzimas lacase, conforme demonstra Hu et al. (2011).

Anteriormente Saghebi et al. (2023) verificaram que as enzimas produzidas por *A. oryzae* podem digerir o complexo lignocelulósico da palha de trigo. Porém, no presente estudo, o co-cultivo de *A. niger* e *A. oryzae* não influenciou na dFDN em dietas em que a silagem de milho foi parcialmente substituída por palha de trigo. Estes resultados se assemelham aos de Silvestre et al. (2022), que não observaram efeito de um extrato enzimático de AOAN na dFDN, em uma dieta em que o grão de milho foi substituído parcialmente por palha de trigo. Silvestre et al. (2022), atribuiram os seus resultados a diminuição do amido na dieta, o que contribui para um menor conteúdo de energia para os microrganismos ruminais, tornando a utilização de AOAN ineficiente.

Em resumo, nossos resultados de dFDN se aproximam de resultados previamente descritos. De forma similar, Kahyani et al. (2019), encontraram uma dFDN de 43,8% após 30 horas de incubação (dieta composta por 19% da MS de silagem de milho, 40% da MS de palha de trigo e 41% de silagem de alfafa). Neste mesmo tempo de incubação, os nossos resultados de dFDN foram de 38,7% e 41,7% para dietas CON e AOAN, respectivamente. Pequenas variações na digestibilidade provavelmente se devem às diferentes porcentagens de inclusão dos ingredientes silagem de milho, palha de trigo e alfafa, além da porcentagem de inclusão do concentrado, que era ausente no estudo de Kahyani et al. (2019).

A digestibilidade da silagem de milho é variável, sendo a proporção de milho e palha um dos fatores que influencia na composição química e seu aproveitamento nutricional (Ferreira et al., 2005). O amido, como o principal carboidrato não fibroso, e elevadas proporções de FDN potencialmente digestível, fazem da silagem de milho um ingrediente frequentemente utilizado nas dietas de vacas leiteiras (Zardin et al., 2017). Os resultados do presente estudo, no qual a inclusão de silagem de milho foi de 40% da MS, não foram influenciados pela inclusão de AOAN e se assemelham aos de Soufizadeh et al. (2018), que encontraram uma dFDN de 71,26% para silagem de milho, após 120 horas de incubação. A suplementação com *Aspergillus* não provocou efeitos na dFDN em nenhum dos tempos de incubação. Nossos resultados divergem do observado no estudo de Kong et al. (2021), no qual a suplementação de AOAN aumentou dFDN da silagem de milho após 30 e 48 horas de incubação, com uma digestibilidade de aproximadamente, 48% e 58%, respectivamente.

No estudo de Takiya et al. (2017) e de Guo et al. (2022) o uso de *A. oryzae* com atividade de alfa-amilase conhecida, aumentou concentrações de isovalerato no rúmen, que é um fator de crescimento para bactérias celulolíticas, o que pode aumentar a digestibilidade do FDN. Embora com todas as razões anteriormente citadas na literatura que pudessem aumentar o dFDN, isso não foi observado em nenhuma das TMRs analisadas no presente estudo.

Quando a digestibilidade da fibra aumenta, seja por atividade enzimática, que realizam a hidrólise dos carboidratos estruturais ou pelo aumento na população de bactérias fibrolíticas, ocorre a maior exposição do amido e das proteínas presentes na fibra, tornando-as mais disponíveis para a degradação (Taye and Etefa, 2020). Isso pode contribuir para uma maior digestibilidade do amido, proteína e assim, aumentar a dMS e dMO.

A metanálise de Cantet et al. (2025), encontrou que a suplementação com extrato da fermentação de *A. oryzae* aumentou a digestibilidade ruminal de matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro. Em um estudo conduzido com ovinos, Guo et al. (2022) encontraram que o *A. oryzae* aumentou a digestibilidade ruminal da matéria seca tanto do feno de alfafa, quanto da palha de milho. Ademais, Kong et al. (2021) demonstraram que AOAN aumentou a digestibilidade ruminal de matéria seca, da proteína bruta e do FDN tanto da silagem de milho, quanto do feno de aveia, e também de uma TMR composta por silagem de milho como principal fonte de volumoso.

Existem evidências de aumento de bactérias fermentadoras de fibra e amido no rúmen, o que poderia ser traduzido em maior digestibilidade de matéria seca e orgânica (Cantet et al., 2025). Entretanto, Chiquette. (1995) demonstrou não haver efeito da inclusão de AO na dMS e da dMO. Também, Ogunade and McCoun (2020) não observaram efeito na digestibilidade da

MS de uma TMR composta principalmente por trevo vermelho, casca de soja e milho, ao suplementar novilhos com um produto da fermentação de *A. oryzae* e *A. niger*.

Os efeitos da inclusão do AO na digestibilidade da dieta são variáveis e normalmente dependem do tipo de forragem que o animal está sendo alimentado (Podversich et al., 2023). No presente estudo, possivelmente a AOAN somente influenciou na digestibilidade de dietas mais fibrosas. Após 30 horas de incubação, foi observada uma tendência para maior dMS e dMO na dieta em que houve substituição parcial da silagem de milho por palha de trigo. Para a dieta com substituição parcial de silagem de milho com casca de soja, não houve efeitos de AOAN na dMS e dMO. Ainda mais inconsistente, a suplementação de AOAN em dietas sem substituição parcial da silagem de milho numericamente reduziu a digestibilidade dMO, conforme observado após 48 e 120 horas de incubação. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Sun et al. (2014), em um estudo *in vitro*, no qual, dietas mais fibrosas quando incubadas com AO, sofreram aumento na digestibilidade, entretanto esse resultado foi atribuído ao aumento em *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, as quais não foram avaliadas em nosso estudo.

Em condições *in vivo*, a substituição parcial de silagem de milho por palha de trigo, pode diminuir a digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica no rúmen, devido a redução das concentrações de carboidratos não fibrosos, especialmente amido, resultando em uma redução geral na digestibilidade dos nutrientes (Silvestre et al., 2022). Apesar disso, os nossos resultados *in vitro* sugerem que a utilização de AOAN pode melhorar a digestibilidade da MO e da MS de dietas mais fibrosas.

CONCLUSÕES

Os resultados disponíveis na literatura referentes ao uso de AOAN na dieta de ruminantes ainda são escassos. No presente estudo, não é evidente o motivo da falta de efeito da suplementação de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* na digestibilidade do FDN, da MO e da MS das TMRs formuladas com silagem de milho e com substituição parcial da silagem de milho por casca de soja. Por outro lado, os resultados de dMO e dMS indicam um efeito positivo da suplementação de AOAN em dietas mais fibrosas, em que a silagem de milho foi parcialmente substituída por palha de trigo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio das instituições University of Wisconsin-Madison, EUA, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, American Biosystems, Roanoke, EUA e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código

de Financiamento 001, para as quais registramos os nossos agradecimentos. Os autores não declararam conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Altop, A., E. Güngör, and G. Erener. 2018. *Aspergillus niger* may improve nutritional quality of grape seed and its usability in animal nutrition through solid-state fermentation. International Advanced Researches and Engineering Journal. 2: 273-277.
- Batt, A. 2014. *Aspergillus oryzae*. Pages 92-96 in Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), edited by Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello: Academic Press.
- Beauchemin, K. A. 2018. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *J Dairy Sci.* 101: 4762-4784.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>
- Beharka, A. A., T. G. Nagaraja, and J. L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 74: 4326-4336. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78628-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78628-1)
- Benoit-Gelber, I., T. Gruntjes, A. Vinck, J. G. Van Veluw, H. A. Wösten, S. Boeren, J. J. M. Vervoort, and R. P. De Vries. 2017. Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. *Fungal Genet. Biol.* 102: 31-37.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.006>
- Berchielli, T. T. A. V. Pires, S. G. Oliveira. 2011. Metabolismo de Proteínas. Pages 255-284 in Nutrição de ruminantes: Jaboticabal, FUNEP.
- Bittencourt, G. A., L. P. de Souza Vandenberghe, K. Valladares-Diestra, L. W. Herrmann, A. F. M. de Mello, Z. S. Vásquez, S. G. Karp, and C. R. Soccol. 2021. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.* 339: 125594. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125594>
- Cantet, J. M., R. A. Palladino, C. Ocasio, F. Bargo, and I. R. Ipharraguerre. 2024. A meta-analysis of the impact of an *Aspergillus oryzae* fermentation product on ruminal fermentation and dairy cow performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116182.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116182>
- Chiquette, J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 405-415.
<https://doi.org/10.4141/cjas95-060>

Detmann, E., and S. C. Valadares Filho. 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62: 980-984. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400030>

Diepersloot, E. C., C. Heinzen Jr., B. A. Saylor, and L. F. Ferraretto. 2022. Effect of cutting height, microbial inoculation, and storage length on fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage. *Transl. Anim. Sci.* 6: txac037. <https://doi.org/10.1093/tas/txac037>

dos Santos, D. A., J. C. C. Chagas, J. C. V. de Oliveira, D. C. dos Santos, G. S. de Oliveira Moraes, F. G. de Souza, J. L. Silva, C. F. Monteiro, and M. de Andrade Ferreira. 2022. Is the total mixed ration the best option for feeding crossbred dairy cows using diets based on cactus cladodes on family farms? *Trop. Grasslands-Forrajes Trop.* 10:124–133. [https://doi.org/10.17138/tgft\(10\)124-133](https://doi.org/10.17138/tgft(10)124-133).

Elghandour, M. M. M. Y., A. Z. M. Salem, M. J. Adegbeye, J. L. Ponce-Covarrubias, G. T. Estrada, and P. E. H. Ruiz. 2023. Fungi as a Source of Exogenous Enzymes in Ruminant Feeding. Pages 129-150 in *Exogenous Enzymes as Feed Additives in Ruminants*: Springer International Publishing.

Ferreira, G., and D. R. Mertens. 2005. Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects on in vitro disappearance. *J. Dairy Sci.* 88: 4414-4425. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73128-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73128-3)

Ferreira, J. A., A. Mahboubi, P. R. Lennartsson, and M. J. Taherzadeh. 2016. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* 215: 334-345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>

Fondevila, M., C. J. Newbold, P. M. Hotten, and E. R. Ørskov. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. *Animal Science* 51:422–425. <https://doi.org/10.1017/S0003356100005584>.

Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, K. Verbeke, and G. Reid. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Pages 1-20 in *Forage fiber analyses*.

Goeser, J. P., and D. K. Combs. 2009. An alternative method to assess 24-h ruminal in vitro neutral detergent fiber digestibility. *J. Dairy Sci.* 92: 3833-3841. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1136>

- Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas, and J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73: 703-710. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78723-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78723-1)
- Guo, L., D. Zhang, R. Du, F. Li, F. Li, and T. Ran. 2022. Supplementation of *Aspergillus oryzae* culture improved the feed dry matter digestibility and the energy supply of total volatile fatty acid concentrations in the rumen of Hu sheep. *Front. Nutr.* 9: 847156. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.847156>
- Guo, W., X. J. Guo, L. N. Xu, L. W. Shao, B. C. Zhu, H. Liu, Y. J. Wang, and K. Y. Gao. 2022. Effect of whole-plant corn silage treated with lignocellulose-degrading bacteria on growth performance, rumen fermentation, and rumen microflora in sheep. *Animal* 16: 100576. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100576>
- Hao, X. Y., M. Z. Zhang, X. Z. Zhang, C. T. Mu, C. X. Zhang, J. X. Zhao, and J. X. Zhang. 2021. Effects of feeding corn bran and soybean hulls on nutrient digestibility, rumen microbial protein synthesis, and growth performance of finishing lambs. *Animal* 15: 100172. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100172>
- Hasan, F., A. A. Shah, and A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39: 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- Havekes, C. D., T. F. Duffield, A. J. Carpenter, and T. J. DeVries. 2020. Effects of wheat straw chop length in high-straw dry cow diets on intake, health, and performance of dairy cows across the transition period. *J. Dairy Sci.* 103: 254–271. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17033>
- Higginbotham, G. E., C. A. Collar, M. S. Aseltine, and D. L. Bath. 1994. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* extract on milk yield in a commercial dairy herd. *J. Dairy Sci.* 77: 343–348. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76960-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76960-5)
- Hu, H. L., J. Van den Brink, B. S. Gruben, H. A. B. Wösten, J. D. Gu, and R. P. De Vries. 2011. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65:248–252. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.008>
- Ipharrague, I. R., and J. H. Clark. 2003. Soyhulls as an alternative feed for lactating dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.* 86:1052–1073. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73689-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73689-3).
- Janovick, N. A., Y. R. Boisclair, and J. K. Drackley. 2011. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:1385–1400. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3303>.

- Kahyani, A., G. R. Ghorbani, M. Alikhani, E. Ghasemi, A. Sadeghi-Sefidmazgi, K. A. Beauchemin, and S. M. Nasrollahi. 2019. Performance of dairy cows fed diets with similar proportions of undigested neutral detergent fiber with wheat straw substituted for alfalfa hay, corn silage, or both. *J. Dairy Sci.* 102:10903–10915. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16869..>
- Karimi, S., N. Mahboobi Soofiani, A. Mahboubi, J. A. Ferreira, T. Lundh, A. Kiessling, and M. J. Taherzadeh. 2021. Evaluation of nutritional composition of pure filamentous fungal biomass as a novel ingredient for fish feed. *Fermentation* 7:152. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030152>.
- Khattab, M. S. A., and A. M. A. E. Tawab. 2018. In vitro evaluation of palm fronds as feedstuff on ruminal digestibility and gas production. *Acta Sci* 40:e39586. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.39586>.
- Kellems, R. O., A. Lagerstedt, and M. V. Wallentine. 1990. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. *J. Dairy Sci.* 73:2922–2928. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78980-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78980-1).
- Kong, F., N. Lu, Y. Liu, S. Zhang, H. Jiang, H. Wang, W. Wang, and S. Li. 2021. *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* co-cultivation extract affects in vitro degradation, fermentation characteristics, and bacterial composition in a diet-specific manner. *Animals* 11:1248. <https://doi.org/10.3390/ani11051248>.
- Li, Q., J. Lu, G. Zhang, S. Liu, J. Zhou, G. Du, and J. Chen. 2022. Recent advances in the development of *Aspergillus* for protein production. *Bioresour. Technol.* 348:126768. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126768>.
- Lubis, D., E. Wina, and B. Haryanto. 2002. Growth response of sheep fed concentrate with *Aspergillus oryzae* fermentation culture. *Int. Semin. Trop. Anim. Prod.* 2:62–70.
- Malik, M. I., M. A. Rashid, M. S. Yousaf, S. Naveed, K. Javed, and H. Rehman. 2020. Effect of physical form and level of wheat straw inclusion on growth performance and blood metabolites of fattening goat. *Animals* 10:1861. <https://doi.org/10.3390/ani10101861>.
- Markowiak, P., and K. Śliżewska. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog* 10:1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.
- Martins, L. F., J. Oh, M. Harper, A. Melgar, S. E. Räisänen, X. Chen, and A. N. Hristov. 2022. Effects of an exogenous enzyme preparation extracted from a mixed culture of *Aspergillus* spp. on lactational performance, metabolism, and digestibility in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 105:7344–7353. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21990>.

- Miller, M. D., C. Kokko, C. S. Ballard, H. M. Dann, M. Fustini, A. Palmonari, A. Formigoni, K. W. Cotanch, and R. J. Grant. 2021. Influence of fiber degradability of corn silage in diets with lower and higher fiber content on lactational performance, nutrient digestibility, and ruminal characteristics in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 104:1728–1743. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19088>.
- Mojsov, K. D. 2016. *Aspergillus enzymes for food industries*. Pages 215-222 in *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- NASEM. 2021, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* in 8th rev. ed. Washington DC: The National Academies Press.
- NRC. 2001, National Research Council, Committee on Animal Nutrition in Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. *Nutrient requirements of dairy cattle*: National Academies Press.
- Nayan, N., G. van Erven, M. A. Kabel, A. S. Sonnenberg, W. H. Hendriks, and J. W. Cone. 2019. Improving ruminal digestibility of various wheat straw types by white-rot fungi. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 99:957–965. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9320>. Newbold, C. J., R. Brock, and R.
- J. Wallace. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci.* 116:159–162. <https://doi.org/10.1017/S0021859600076267>.
- Okpara, M. O. 2022. Microbial enzymes and their applications in food industry: a mini-review. *Adv. Enzyme Res.* 10:23–47. <https://doi.org/10.4236/aer.2022.101002>.
- Ogunade, I. M., and M. McCoun. 2021. Effects of adding live *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus*-based enzyme extracts on ruminal fermentation, plasma polyamine concentrations, and fiber digestibility in beef steers fed a high-forage diet. *Appl. Anim. Sci.* 37:21–26. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02028>.
- Ominski, K. H., K. M. Wittenberg, A. D. Kennedy, and S. A. Moshtagh-Nia. 2003. Physiological and production responses when feeding *Aspergillus oryzae* to dairy cows during short-term, moderate heat stress. *Anim. Sci.* 77:485–490. <https://doi.org/10.1017/S1357729800054424>.
- Oxenbøll, K. 1994. *Aspergillus enzymes and industrial uses*. Pages 147-154 in *The Genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*: Boston, MA: Springer US
- Podversich, F., F. Tarnovsky, J. Bollatti, G. M. da Silva, T. M. Schulmeister, J. V. Martinez, and N. Di Lorenzo. 2021. Effects of inclusion of Amaferm on animal performance, chewing

activity, and nutrient digestibility of backgrounding beef heifers fed either a sorghum silage- or a byproducts-based diet. *J. Anim. Sci.* 99 (Suppl.3):181–182. <https://doi.org/10.1093/jas/skab235.329>.

PrllI'ge. R. W., M. D. Stem. L. M. Rode, K.A.S. Santos. N. A. Jorgensen. and L. D. Satter. 1979. The effects of altering hay:grain ratios on digestibility and rate of passage of dry malter in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 49:39. (Abstr.)

Puniya, A. K., R. Singh. and Kamra, D. N. 2015. Rumen Microbiology: An Overview. Pages 3-16 in Rumen microbiology: from evolution to revolution: Springer.

Pupo, M. R., and L. F. Ferraretto. 2023. Effects of laboratory ensiling method, microbial inoculation, and storage length on the fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage and high-moisture corn. *Anim. Feed Sci. Technol.* 306:115818. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115818>.

Raghuvanshi, S., S. Misra, and R. K. Saxena. 2014. Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5:1–8.

Saghebi, M., H. Khalilvandi-Behroozyar, R. Pirmohammadi, and M. Donyadoust-Chelan. 2023. Evaluation of the effects of biological processing of wheat straw by *Aspergillus oryzae* on rumen fermentation parameters and fiber degradability in ruminants. *Journal of Ruminant Research.* <https://doi.org/10.22069/ejrr.2022.19674.1818>

Sar, T., J. A. Ferreira, and M. J. Taherzadeh. 2021. Conversion of fish processing wastewater into fish feed ingredients through submerged cultivation of *Aspergillus oryzae*. *Syst. Microbiol. Biomanuf.* 1:100–110. <https://doi.org/10.1007/s43393-020-00009-5>.

SAS Institute Inc. 1989–2024. JMP®, Version Pro 14. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schingoethe, D. J. 2017. A 100-year review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J Dairy Sci* 100:10143–10150. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12967>

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., and Van Dijck, P. W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhyaya, S. D., Kam, D. K., and Ha, J. K. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australas J Anim Sci* 23:1657–1667. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.r.08>

Shrivastava, B., Thakur, S., Khasa, Y. P., Gupte, A., Puniya, A. K., and Kuhad, R. C. 2011. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation* 22:823–831. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9408-2>

Shrivastava, B., Jain, K. K., Kalra, A., and Kuhad, R. C. 2014. Bioprocessing of wheat straw into nutritionally rich and digested cattle feed. *Sci. Rep.* 4:6360. <https://doi.org/10.1038/srep06360>

- Sievert, S. J., and Shaver, R. D. 1993. Carbohydrate and *Aspergillus oryzae* effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:245-254. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77343-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77343-9)
- Silvestre, T., Fetter, M., Räisänen, S. E., Lage, C. F. A., Stefenoni, H., Melgar, A., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Martins, L. F., Karnezos, T. P., and Hristov, A. N. 2022. Performance of dairy cows fed normal-or reduced-starch diets supplemented with an exogenous enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 105:2288-2300. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21264>.
- Soufizadeh, M., R. Pirmohammadi, Y. Alijoo, and H. K. Behroozyar. 2018. Indigestible neutral detergent fibers: Relationship between forage fragility and neutral detergent fibers digestibility in total mixed ration and some feedstuffs in dairy cattle. *Vet. Res. Forum* 9:49. https://vrf.iranjournals.ir/article_4437.html.
- Sucu, E., Moore, C., VanBaale, M. J., Jensen, H., Sanz-Fernandez, M. V., and Baumgard, L. H. 2018. Effects of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation product to transition Holstein cows on performance and health. *Can. J. Anim. Sci.* 99:237-243. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0037>.
- Sun, H., Wu, Y. M., Wang, Y. M., Liu, J. X., and Myung, K. H. 2014. Effects of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on in vitro rumen fermentation and microbial populations between different roughage sources. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 27:1285. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13742>.
- Taye, D., and Etefa, M. 2020. Review on improving nutritive value of forage by applying exogenous enzymes. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 5:72-79.
- Takiya, C. S., Calomeni, G. D., Silva, T. H., Vendramini, T. H. A., Silva, G. G., Consentini, C. E. C., and Rennó, F. P. 2017. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 228:159-167. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.04.017>.
- Thareja, A., Puniya, A. K., Goel, G., Nagpal, R., Sehgal, J. P., Singh, P. K., and Singh, K. 2006. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. *Arch. Anim. Nutr.* 60:412-417. <https://doi.org/10.1080/17450390600884443>.
- Tonde, P., Dhok, A. P., Deshmukh, A. D., Kawitkar, S. B., and Raghuwanshi, D. S. 2024. Performance of lactating buffaloes on soybean hulls based concentrate mixture. *Buffalo Bull.* 43:187-195. <https://doi.org/10.56825/bufbu.2024.4323846>.
- Tricarico, J. M., Johnston, J. D., and Dawson, K. A. 2008. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *J. Dairy Sci.* 145:136-150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.017>.
- Ungerfeld, E. M. 2020. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Front. Microbiol.* 11:589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>

USDA - U.S. Department of Agriculture. 2024. Production - Wheat. Accessed Nov. 20, 2024. <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/0410000>.

Uwineza, C., M. Parchami, M. Bouzarjomehr, M. J. Taherzadeh, and A. Mahboubi. 2024. Recent developments in the application of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* in ruminant feed. *Animals* 14: 2427. <https://doi.org/10.3390/ani14162427>

Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel, and J. L. Walters. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063–2068. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80254-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80254-0)

Yu, R., J. Liu, Y. Wang, H. Wang, and H. Zhang. 2021. *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. *Front. Chem.* 9:701022. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.701022>

Zardin, P. B., J. P. Velho, C. C. Jobim, D. R. M. Alessio, I. M. P. Haygert-Velho, G. M. da Conceição, and P. S. G. Almeida. 2017. Chemical composition of corn silage produced by scientific studies in Brazil—A meta-analysis. *Semin. Cienc. Agrar.* 38: 503–511. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n1p503>

Zerby, H. N., J. L. Bard, S. C. Loerch, P. S. Kuber, A. E. Radunz, and F. L. Fluharty. 2011. Effects of diet and *Aspergillus oryzae* extract or *Saccharomyces cerevisiae* on growth and carcass characteristics of lambs and steers fed to meet requirements of natural markets. *J. Anim. Sci.* 89: 2257–2264. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3308>

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	TMR silagem de milho	TMR palha de trigo	TMR casca de soja
% na matéria seca			
Silagem de milho	40	30	30
Casca de soja	-	-	10
Palha de trigo	-	10	-
Silagem de alfafa	20	20	20
Concentrado comercial	40	40	40
Blend <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus Oryzae</i> (AOAN)	0,02	0,02	0,02

Tabela 2. Composição do concentrado comercial (% MS).

Ingrediente	% MS
Milho seco moído	0,3
Farelo de canola	3,7
Farelo de soja integral prensado ¹	9,5
Casca de soja	4,4
Farelo de soja, 46% PB	0,4
Gordura inerte no rúmen ²	1,5
Carbonato de cálcio	1,0
Bicarbonato de sódio	0,7
Óxido de magnésio	0,3
Ureia, 46% Nitrogênio	0,1
Magnésio, potássio, fósforo ³	0,1
Parede celular de levedura ⁴	0,1
Carbonato de potássio	0,1
Metionina rúmen-protégida ⁵	0,1
Aglutinante ⁶	0,1
Ferelo de canola	3,1
Premix mineral e vitamínico ⁷	0,7

¹Soy Plus (Landus Cooperative, Ames, IA).

²Energy Booster 100 (Milk Specialties Global, Fond du Lac, WI).

³Dynamate (11% Mg, 18% K, 22% S; The Mosaic Co., Plymouth, MN).

⁴Celmanax (Arm and hammer animal and Food Production, Ewing, NJ).

⁵Smartamine M (Adisseo USA INC., Alpharetta, GA).

⁶Fortress LG (ADM Animal Nutrition, Quincy, IL).

⁷(57,0% NaCL, 36,1% CaCO₃, 2,3% MnSO₄, 2,1% ZnSO₄, 0,7% Vitamina E (50%), 0,5% Selênio (0,80%), 0,5% Óleo mineral, 0,4% Biotina (2%), 0,2% Cu₂(OH)₃Cl, 0,1% Vitamina A/D3 (1000/200 IU/mg), 0,02% CoCO₃, 0,02% C₂H₁₀I₂N₂, 0,2% Vitamina D3 (500,000 IU/mg)).

Tabela 3. Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus niger* (AOAN) em uma TMR formulada com silagem de milho

Item	Silagem de Milho COM		Silagem de Milho AOAN		Probabilidade
	Item	Média	Média	SEM	
Resultados após 12 horas de incubação					
pH	6,91	6,91		0,02	0,87
dMS, %	49,0	50,5		1,69	0,35
dMO, %	97,1	96,9		0,18	0,32
dFDN, %	17,8	18,4		2,98	0,81
Resultados após 30 horas de incubação					
pH	6,79	6,79		0,02	0,63
dMS, %	68,8	70,6		2,46	0,56
dMO, %	97,4	97,3		0,11	0,69
dFDN, %	50,5	48,8		4,55	0,81
Resultados após 48 horas de incubação					
pH	6,84	6,81		0,08	0,61
dMS, %	76,9	76,1		1,54	0,23
dMO, %	97,6	97,5		0,05	0,06
dFDN, %	63,1	57,4		3,29	0,18
Resultados após 120 horas de incubação					
pH	6,91	6,85		0,04	0,03
dMS, %	83,4	82,4		0,74	0,31
dMO, %	97,7	97,5		0,06	0,03
dFDN, %	71,4	70,2		2,07	0,41

Tabela 4. Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus niger* (AOAN) em uma TMR com substituição parcial de silagem de milho por casca de soja

Item	Casca de Soja COM		Casca de soja AOAN		Probabilidade
	Item	Média	Média	SEM	
Resultados após 12 horas de incubação					
pH	6,92	6,91	0,02	0,66	
dMS, %	47,4	49,7	2,49	0,25	
dMO, %	97,0	96,9	0,17	0,52	
dFDN, %	16,8	22,0	1,71	0,16	
Resultados após 30 horas de incubação					
pH	6,79	6,77	0,01	0,37	
dMS, %	70,9	69,4	1,94	0,39	
dMO, %	97,3	97,0	0,15	0,12	
dFDN, %	51,0	50,7	3,22	0,92	
Resultados após 48 horas de incubação					
pH	6,77	6,77	0,05	0,91	
dMS, %	73,2	75,3	2,57	0,19	
dMO, %	97,7	97,3	0,23	0,22	
dFDN, %	57,0	59,8	3,81	0,56	
Resultados após 120 horas de incubação					
pH	6,85	6,88	0,06	0,02	
dMS, %	83,6	82,9	0,23	0,17	
dMO, %	97,7	97,6	0,14	0,66	
dFDN, %	73,3	72,6	1,16	0,54	

Tabela 5. Média e erro padrão (SEM) do pH ruminal, digestibilidade da matéria seca (dMS), digestibilidade da matéria orgânica (dMO) e digestibilidade da fibra em detergente neutro (dFDN) após 12, 30, 48 e 120 horas de incubação, considerando o efeito de tratamento: Controle (CON) ou Blend de *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus niger* (AOAN) em uma TMR com substituição parcial de silagem de milho por palha de trigo

Item	Palha de trigo COM	Palha de trigo AOAN	Probabilidade	
Item	Média	Média	SEM	Tratamento
Resultados após 12 horas de incubação				
pH	6,93	6,91	0,02	0,13
dMS, %	47,2	48,2	1,00	0,40
dMO, %	96,7	96,5	0,21	0,18
dFDN, %	11,0	12,4	1,82	0,65
Resultados após 30 horas de incubação				
pH	6,81	6,82	0,02	0,42
dMS, %	64,3	65,2	0,79	0,07
dMO, %	96,8	97,0	0,08	0,04
dFDN, %	38,7	41,7	5,78	0,11
Resultados após 48 horas de incubação				
pH	6,83	6,80	0,06	0,13
dMS, %	70,6	71,2	1,35	0,62
dMO, %	97,1	97,5	0,32	0,28
dFDN, %	49,4	51,2	4,56	0,43
Resultados após 120 horas de incubação				
pH	6,86	6,87	0,06	0,58
dMS, %	78,3	78,5	0,51	0,37
dMO, %	97,4	97,8	0,17	0,23
dFDN, %	60,7	63,0	1,94	0,13



Figura 1. Cronograma de incubações.

3.3 Artigo 3

Resultados de inovação: short communication - determinação da estabilidade ruminal *in situ* de produtos à base de metionina

Laura Valadão Vieira^{1*}, Muryllo Botelho Medeiros¹, Leonardo Marins¹, Noéliton Freitas dos Santos¹, Rafaela Ortiz Zitzke¹, Mário Toyo Vieira¹, Eliza Rossi Komninou¹, Marcio Nunes Corrêa¹

Será submetido à revista Veterinary and Animal Science

Artigo 3: Resultados de inovação: short communication - determinação da estabilidade ruminal *in situ* de produtos à base de metionina

Laura V. Vieira^{1*}, Muryllo B. Medeiros¹, Leonardo Marins¹, Noéliton F. dos Santos¹, Rafaela O. Zitzke¹, Mário T. Vieira¹, Eliza R. Komninou¹, Marcio N. Corrêa¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária-NUPEEC HUB, Avenida Eliseu Maciel, S/N, 96160-000, Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil

*Corresponding author.

Email address: lauravaladaovieira@gmail.com (L. V. Vieira)

RESUMO

Objetivamos com este estudo avaliar um produto à base de metionina, com ênfase em determinar a estabilidade ruminal *in situ* e os níveis plasmáticos desse aminoácido. Os animais foram monitorados em um delineamento experimental *crossover*, no qual, foram utilizados quatro animais, submetidos a três tratamentos, avaliados em três períodos diferentes. Cada período teve duração de 24 horas e *washout* entre períodos de 7 dias. Os tratamentos foram: UnMet (12g de DL-metionina não protegida da degradação ruminal, n = 4), RPMet (12g de DL-metionina protegida da degradação ruminal, n = 4) e Controle (sem suplementação de metionina, n° = 4). Para análises de estabilidade ruminal de metionina foram monitorados apenas os grupos UnMet e RPMet, que receberam a suplementação em *bags* F57. Nos demais parâmetros, o grupo controle foi incluído na análise. Foram quantificados no plasma: metionina e glicose; no soro: albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), haptoglobina e proteínas totais; além disso, foram avaliados a digestibilidade da matéria seca e o pH ruminal. Dentre os resultados obtidos, a estabilidade ruminal de RPMet foi de 94,05 ± 1,42% e a de UnMet foi de 20,30 ± 1,22% ($P < 0,01$). A metionina plasmática, a digestibilidade de matéria seca e o pH ruminal foram similares entre os grupos. Conseguimos demonstrar com o estudo que a proteção da DL-metionina no tratamento RPMet foi eficiente em garantir a estabilidade ruminal, comparado com UnMet.

Palavras-chave

aminoácidos rúmen protegidos
canulas ruminais

Highlights

- A metionina protegida apresentou 94,05% de estabilidade ruminal.
- Os resultados plasmáticos comprovam a estabilidade ruminal de RPMet *in situ*.
- Foi comprovada a alta estabilidade ruminal de um nova fonte de metionina protegida.

1. Introdução

Ao longo dos anos a metionina foi considerada um aminoácido limitante para a produção de leite (NRC, 2001). Entretanto, embora a metionina seja um aminoácido essencial que influencia a produção e composição do leite, atualmente é reconhecido que outros aminoácidos são da mesma forma importantes para esse processo (NASEM, 2021). Ainda assim, além de aumentar a síntese de gordura e proteína, bem como o volume de leite produzido, a metionina desempenha outras funções no metabolismo animal, por exemplo, ela é precursora de fosfatidilcolina e da carnitina, moléculas associadas a β -oxidação hepática e transporte de lípidos do fígado para a corrente sanguínea, mecanismos essenciais para evitar a cetose e lipidose hepática, que acomete vacas leiteiras no período de transição (Ardalan et al., 2011; Osorio et al., 2014; Zhou et al., 2016; Coleman et al., 2020). Além disso, a metionina pode diminuir o estresse oxidativo por ser precursora dos antioxidantes glutationa e taurina (Coleman et al., 2020), auxilia no desenvolvimento embrionário (Lopes et al., 2019), reduz o balanço energético negativo de vacas no pós-parto (Batistel et al., 2018) e pode auxiliar na termorregulação, contribuindo para a menor incidência de estresse térmico (Jorge-Smeding et al., 2024).

A microbiota ruminal é capaz de sintetizar pequenas concentrações de metionina e esta pode ser absorvida através da proteína microbiana, que é a principal fonte de aminoácidos para o ruminante. Ainda assim, essa síntese é incapaz de suprir as necessidades do animal (Willke, 2014; Ayyat et al., 2021). Nesse contexto, a dieta acaba sendo a principal forma de obtenção de metionina (Kaur et al., 2024). Porém, a concentração de metionina é baixa em muitos alimentos que normalmente são ofertados para bovinos leiteiros; alfafa, caroço de algodão, silagem de milho, farelo de soja, entre outros (Südekum et al., 2004; Ayyat et al., 2021). Essas proteínas, com baixa concentração de metionina, quando chegam no rúmen são degradadas em peptídeos e aminoácidos, e alguns desses são degradados em amônia, ácidos orgânicos e dióxido de carbono (Ayyat et al., 2021; Kaur et al., 2024). A amônia, peptídeos e aminoácidos livres são utilizados para a formação de proteína microbiana (Berchielli et al., 2011; Ayyat et al., 2021) enquanto os aminoácidos não degradados dão origem aos ácidos graxos de cadeia ramificada (Kaur et al., 2024). Logo, a degradação ruminal de proteínas, torna a metionina pouco disponível ao animal.

Desde 1960 sabe-se que é possível proteger a metionina da degradação ruminal (Willke, 2014) através de tratamento térmico, modificação química do aminoácido, uso de análogos de metionina e utilização de matriz lipídica (Chalupa, 1975; Schwab, 1995; 16, Kaur et al., 2024).

A proteção da degradação ruminal, pode ser útil para reduzir as emissões de nitrogênio para o meio ambiente, considerando que a eficiência de bovinos leiteiros em converter nitrogênio dietético em nitrogênio do leite varia entre 25 a 35% (Hristov et al., 2004; Huang et al., 2023; Qin et al., 2025). Logo a proteção da degradação ruminal aumenta a quantidade de aminoácido que potencialmente será absorvido no intestino, melhorando o aproveitamento do nutriente pelo animal, bem como, contribuindo para fazendas mais econômicas e sustentáveis (Qin et al., 2025).

A DL-metionina é a principal forma de metionina sintetizada pela indústria como aditivo alimentar. Ela está presente em formulações rúmen protegidas (Ayyat et al., 2021). Mas além da DL-metionina, existem outros análogos de metionina, na composição de produtos comerciais, extensivamente investigados pela literatura científica, dos quais já se sabe informações a respeito de estabilidade ruminal e biodisponibilidade de metionina plasmática (Südekum et al., 2004; Graulet et al., 2005; Junior et al., 2021). Uma das metodologias que pode ser utilizada para avaliar a estabilidade ruminal da metionina é através de experimentos *in situ* com a utilização de bovinos canulados no rúmen. Dessa maneira, neste estudo, nós investigamos pela primeira vez uma nova fonte comercial de metionina rúmen protegida, com o objetivo em determinar a estabilidade ruminal *in situ* e os níveis plasmáticos desse aminoácido.

2. Metodologia

2.1 Animais, desenho experimental e dieta

Todos os procedimentos foram supervisionados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Federal de Pelotas, registrado sob o nº 23110.011543/2024-96. Quatro (4) novilhos canulados no rúmen, provenientes do cruzamento entre as raças $\frac{1}{2}$ Angus e $\frac{1}{2}$ Holandês, com 1 ano de idade, peso médio de $277,3 \pm 21,2$ Kg foram selecionados para um estudo *in situ* com 28 dias de duração. Os animais eram mantidos em *compost barn*, em uma fazenda comercial localizada no sul do Brasil ($32^{\circ}, 16' S$, $52^{\circ} 67' E$).

Durante o experimento, os animais foram monitorados em um delineamento experimental *crossover*, no qual, foram utilizados quatro animais e três tratamentos, avaliados em três períodos diferentes. Cada período teve duração de 24 horas e *washout* entre períodos de 7 dias. Os tratamentos foram: UnMet (metionina não protegida da degradação ruminal, n = 4), RPMet (metionina protegida da degradação ruminal, com matriz lipídica, produto comercial AminoPass[®], Safeeds, Brasil, n = 4) e Controle (sem suplementação de metionina, n = 4).

O delineamento experimental está exposto no **Quadro 1**:

Quadro 1. Delineamento *crossover*

Animal	Período 1	Período 2	Período 3
A	UnMet	RPMet	Controle
B	RPMet	Controle	UnMet
C	Controle	UnMet	RPMet
D	UnMet	Controle	RPMet

As doses de metionina dos tratamentos RPMet e UnMet, foram ajustadas de acordo com as recomendações do fabricante e estão de acordo com o NASEM (2021), garantindo que os animais recebessem 12 g de DL-metionina. Para o tratamento RPMet, isso correspondeu a 24 g do produto comercial, enquanto para o tratamento UnMet, foram administrados 12 g de metionina não protegida da degradação ruminal.

Os animais receberam água *ad libitum* e a mesma dieta. A dieta foi fornecida na forma totalmente misturada (TMR), contendo 75% volumoso e 25% concentrado. Os ingredientes utilizados foram silagem de milho, pré-secado de azevém com trevo, além de concentrado comercial. A dieta base foi formulada seguindo os requerimentos sugeridos pelo NASEM, (2021), para atender as demandas de novilhos leiteiros em crescimento, com oferta estimando 5% de sobras.

Amostras de dieta foram coletadas semanalmente para determinação da porcentagem de matéria seca e análise química. A matéria seca da dieta foi avaliada a partir de secagem em estufa com ventilação de ar forçado à 55°C, por 72 horas (Ribas et al., 2021). Através da espectrofotometria de infravermelho próximo (NIR), foram determinados os valores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), matéria mineral (MM) e amido.

A composição química da dieta com base na matéria seca foi: matéria seca 47,83%, matéria mineral 8,01%, proteína bruta 15,13%, extrato etéreo 3,05%, fibra em detergente neutro 37,87%, fibra em detergente ácido 24,58% e amido 23%.

2.2 Determinação da digestibilidade ruminal de metionina e digestibilidade da matéria seca (dMS)

No rúmen foram incubadas amostras de 5g de dieta e os tratamentos RPMet e UnMet. Previamente à incubação, amostras da dieta total foram secas, a 55°C, por 72 horas em estufa com ventilação de ar forçado e posteriormente moídas a 1mm, em moinho Lucadema (Lucadema®, São Paulo, Brasil).

A digestibilidade ruminal da metionina foi avaliada após 4 diferentes tempos de incubação. Os tratamentos foram incubados em triplicata, em *bags* F57 (Ankom Technology Corp., Macedon®, NY, EUA) com dimensões de 5x5 cm e porosidade de 25 µm. No grupo RPMet, cada *bag* recebeu 1 g de DL-metionina (2g do produto comercial metionina protegida da degradação ruminal). No total foram incubadas 12 *bags*, totalizando 12 g de DL-metionina. No grupo UnMet, cada *bag* recebeu 1 g de DL-metionina (1g do produto sem proteção ruminal). No total foram 12 *bags*, totalizando 12 g de DL-metionina. Amostras de 1 g em sacos F57 foram utilizadas por Woo et al. (2024), volumes maiores como 0,5 gramas de amostra, misturado a 5g de esferas de vidro, em sacos F57, foram utilizadas por Adesogan. (2005).

Para a incubação as *bags* em triplicatas foram acomodadas em *bags* maiores, com dimensões 10x20cm, com porosidade de 50 µm (Ankom Technology Corp., Macedon®, NY, EUA), com o objetivo de facilitar a recuperação dos tratamentos ao término do período de incubação. Além disso, *bags* deste mesmo tamanho e porosidade foram utilizadas para a incubação da dieta total, para posterior determinação da dMS, após 10 horas de incubação ruminal. O tempo de incubação utilizado neste estudo foi o mesmo aplicado por Haugen et al. (2006).

Assim como no trabalho de Assunção et al. (2022), a incubação foi realizada em ordem cronológica reversa: as *bags* com tratamento e dieta total foram inseridas no rúmen, através das cânulas na hora 0, posteriormente somente *bags* com as triplicatas dos tratamentos, foram inseridas no rúmen, nas horas 2, 4 e 7. Na hora 10, todas as *bags* foram retiradas simultaneamente, resultando em 10 horas de incubação dos tratamentos e dieta total, além de tempos de incubação de 8, 6, 3 e 0 horas, para os tratamentos. As *bags* contendo os tratamentos correspondentes a 0 horas de incubação foram lavados em água corrente até que a mesma atingisse um estado límpido, com objetivo de parar a fermentação ruminal.

Em seguida, as *bags* com os tratamentos foram secas em estufa com ventilação de ar forçado a 40°C até atingirem peso constante, conforme indicado por Rossi et al. (2003) para aminoácidos protegidos com matriz lipídica. A digestibilidade ruminal dos tratamentos à base

de metionina foi determinada pela diferença entre o peso dos produtos de DL-metionina antes da incubação e após a incubação e secagem.

A determinação da dMS, nos grupos UNMet, RPMet e Controle foi feita pela diferença entre o peso residual da amostra após incubação por 10 horas e secagem em estufa com ventilação de ar forçado a 55°C por 72 horas, pelo peso da amostra original antes da incubação (Cagle et al., 2020).

2.3 pH ruminal

O pH ruminal foi avaliado nas horas 0, 2, 7 e 10, nos grupos UNMet, RPMet e Controle. O líquido ruminal foi coletado a partir das cânulas e filtrado em três camadas de gaze. A análise de pH foi conduzida com a utilização de pHmetro de bancada (Tecnopon-HMMPB-2010®, Brasil). O objetivo dessa análise era avaliar a existência de possíveis intercorrências à saúde ruminal, devido a abertura periódica das cânulas.

2.4 Quantificação de metionina no plasma e indicadores de saúde

Amostras de sangue foram obtidas, nos três grupos Controle, RPMet e UnMet, a partir do complexo artério venoso coccígeo, nas horas 0, 6, 10 e 24, a partir da utilização de sistemas de tubos a vácuo (Vacutainer®, diagnostics, Brasil). Para análise de glicose, através do plasma, o sangue foi coletado em tubos contendo fluoreto de sódio. Para análise de albumina, gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), haptoglobina e proteínas plasmáticas totais (PPT), através do soro, o sangue foi coletado em tubos contendo sílica (ativador de coágulo). Para análise de metionina, através do plasma, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina de lítio.

Foram utilizados kits comerciais Labtest (Labtest®, Minas Gerais Brasil) para as análises de glicose, GGT, AST e PPT, além de kit comercial Kovalent (Kovalent®, Rio de Janeiro, Brasil), para análise de haptoglobina. Essas análises foram conduzidas no analisador bioquímico (Labmax Plenno®, Labtest Diagnóstica ltda, Brasil) pelo método espectrofotométrico. A quantificação de metionina no plasma foi realizada pelo método de cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC-MS) (Weaving et al., 2006).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o software JMP pro 14 (SAS Institute Inc. 1989-2024), gráficos boxplot foram utilizados para remoção dos outliers. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk, sendo considerado normal valores de $W > 0,90$ e $P > 0,05$. As variáveis foram testadas pelo Mixed Model, como efeitos fixos foram considerados tratamento, período, hora e interação entre tratamento e hora.

O efeito do animal foi considerado aleatório. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados como significativos. Os dados foram analisados de acordo com o seguinte modelo estatístico (**Equação 1**):

$$\text{Equação 1: } Y_{ijkm} = \mu + \tau_i + \pi_j + \theta_l + \phi_{ij} + (1| \text{Animal}_m) + \epsilon_{ijkm}$$

Onde Y_{ijkm} representa a variável contínua, τ_i o efeito fixo do tratamento (RPMet, UNMet e Controle), π_j o efeito fixo do período j (Período 1, 2, 3 ou 4), θ_l o efeito fixo da hora de coleta (Amostras de sangue: horas 0, 6, 10 ou 24; Digestibilidade ruminal da metionina: horas 0, 3, 6, 8 e 10; pH ruminal: horas 0, 2, 7 ou 10), ϕ_{ij} representa a interação entre tratamento e hora de coleta, $(1| \text{Animal}_m)$ indica que o animal (Animal A, B, C ou D) é um efeito aleatório, ϵ_{ijkm} representa o erro aleatório associado a cada observação.

A variável dMS, não foi analisada por medidas repetidas, havendo apenas um ponto de coleta nas 10 horas, portanto, não foram considerados os efeitos do tempo e a interação entre tratamento e tempo.

Para a variável estabilidade ruminal de metionina foram considerados na análise estatística os grupos RPMet e UnMet. Já para todos os outros parâmetros avaliados, incluindo metabólicos, pH ruminal e dMS foram considerados RPMet, UnMet e Controle.

3. Resultados e Discussões

Os parâmetros monitorados no plasma foram metionina e glicose; no soro: albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), haptoglobina e proteínas totais (Tabela 1). Esses parâmetros foram avaliados para monitorar a saúde dos animais após a colocação das cânulas.

Efeitos do tratamento foram observados para as variáveis PPT e haptoglobina. A variável PPT foi maior para Controle em relação a UnMet ($P = 0,05$), enquanto, RPMet não diferiu entre os dois tratamentos citados ($P > 0,05$). A haptoglobina foi maior para UnMet em relação ao Controle ($p=0,04$), mas não diferiu em relação ao grupo RPMet ($p>0,05$).

Tabela 1. Média ± erro padrão (EP) dos níveis séricos de gama glutamil transferase, aspartato aminotransferase, albumina, proteínas plasmáticas totais e haptoglobina e níveis plasmáticos de glicose e metionina em animais tratados com RPMet (n = 4), UnMet (n = 4), Controle (n = 4).

Parâmetro	RPMet			UnMet			Controle			P value		
	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro	Tratamento	Período	Hora	T*H		
GGT ¹ U/L	25,84	5,66	24,06	5,38	25,84	5,65	0,78	<0,01	0,17	0,50		
AST ² U/L	47,31	7,15	46,00	7,15	44,06	7,15	0,88	0,12	0,23	0,79		
Albumina g/dL	2,23	0,13	2,43	0,13	2,30	0,12	0,61	0,05	0,25	0,43		
Glicose mg/dL	58,31	3,70	52,44	3,70	58,81	3,70	0,07	0,04	0,50	0,08		
PPT ³ g/dL	6,20 ^{ab}	0,22	5,98 ^b	0,16	6,55 ^a	0,14	0,05	0,80	0,86	0,99		
Hp ⁴ mg/dL	4,66 ^{ab}	0,43	5,19 ^a	0,43	3,36 ^b	0,43	0,04	0,01	0,44	0,88		
Metionina μmol/L	16,80	0,92	15,75	0,92	15,68	0,99	0,46	0,23	0,24	0,48		

¹GGT - Gama glutamil transferase; ²AST - Aspartato aminotransferase; ³PPT- proteínas plasmáticas totais; ⁴Hp - haptoglobina.

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda positiva, sintetizada por hepatócitos, nos casos de dano tecidual, inflamação, estresse e infecções (Murata et al., 2004; Lomborg et al., 2008; Smith et al., 2010). Em bovinos saudáveis as concentrações de haptoglobina são menores do que 10mg/dL. (Panndorf et al., 1976; Conner et al., 1986; Smith et al., 2010). Os valores aumentados de haptoglobina nos grupos UnMet e Controle, não ultrapassaram os limites considerados fisiológicos para espécie, logo não refletem problemas de saúde devido ao pós-operatório dos animais, indicando que estes estavam aptos para a pesquisa.

Os dados de digestibilidade ruminal de metionina são apresentados na Figura 1. Observou-se um efeito significativo da interação entre tratamento e hora para todos os tempos de incubação ruminal (p<0,01), indicando que a digestibilidade ruminal da metionina foi influenciada tanto pelo tratamento oferecido quanto pelo tempo de incubação. A média de estabilidade ruminal para RPMet foi de 94,05 ± 1,42% e para UnMet 20,30 ± 1,22% (P < 0,01).

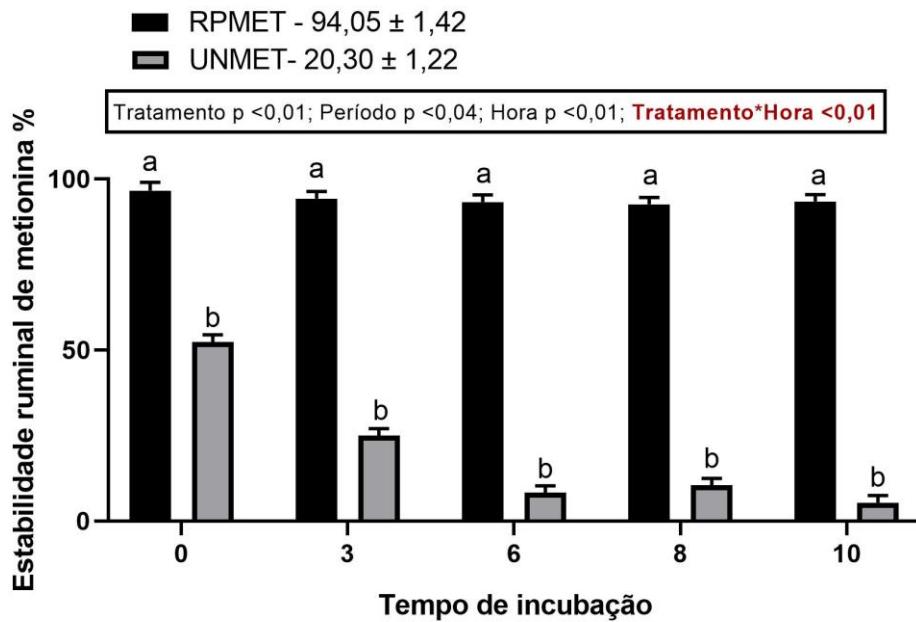


Figura 1. Estabilidade ruminal de metionina ao longo das horas de incubação

Em todos os diferentes tempos de incubação, RPMet foi superior a UnMet em resistir à degradação ruminal da metionina. Logo a matriz lipídica foi eficiente na proteção da DL-metionina. A estabilidade ruminal de $96,89 \pm 2,42$ após 10 horas de incubação, no grupo RPMet, se assemelha ao encontrado em estudos *in situ* com o Smartamine M™ (Adisseo, Inc., Antony, França), sendo a metionina protegida da degradação ruminal mais estudada, que apresenta uma estabilidade ruminal superior a 90% em 24 horas (Ayyat et al., 2021).

Como o objetivo desse estudo foi avaliar a estabilidade ruminal de um novo produto comercial contendo DL-metionina, revestida por lipídios, para a partir desse dado, serem realizados estudos *in vivo*, acreditamos que nenhum dos tratamentos utilizados neste estudo foi capaz de suplementar os animais significativamente com metionina. Vale ressaltar que os animais do grupo controle não receberam metionina na dieta. Os animais do grupo RPMet, ainda que tenham recebido o aminoácido protegido, este foi, em sua maioria, resistente à digestão ruminal e recuperado através das *bags*. Já nos animais que receberam UnMet, as bactérias ruminais que possuem o diâmetro médio de 0,5 a 2 μ M (Kozloski, 2017), certos protozoários com tamanho de 20 μ M (Silva et al., 2024) e outras espécies ruminais de tamanho inferior a 25 μ M, provavelmente ultrapassaram a porosidade das *bags* e incorporaram a metionina na produção de proteína microbiana.

Entretanto, como a proteína microbiana não consegue suprir as demandas de metionina do animal (Kaur et al., 2024), não ocorreu aumento nos níveis de metionina no plasma em nenhum dos tratamentos, conforme demonstra a Tabela 1. Os nossos dados se assemelham aos resultados de metionina plasmática de novilhos de corte que não receberam suplementação com metionina ($16,07 \pm 1,429 \mu\text{mol}$, Liu et al., 2025).

Todavia, é preciso considerar que pode ser difícil quantificar a biodisponibilidade de metionina a partir do plasma. Isso porque, os picos plasmáticos são distintos a depender da fonte de metionina. Os autores (Graulet et al., 2005) compararam duas fontes de metionina a DL-metionina e o éster isopropílico do ácido 2-hidroxi -4- (metiltio) butanoico (HMBi). O produto de DL-metionina utilizado por Graulet et al. (2005) tinha o tamanho de 2 mm, o que é condizente com o tamanho da partícula da fonte de RPMet do presente estudo. Para esse tamanho de partícula é estimado um tempo de retenção no trato gastrointestinal de aproximadamente 31,9 horas, provavelmente somente após esse período conseguiríamos observar aumento nas concentrações plasmáticas de metionina, caso o produto não tivesse sido recuperado das *bags*. Logo, é plausível considerar a necessidade de considerar um tempo de coleta superior a 31,9 horas para avaliar os efeitos da suplementação de metionina.

Ainda, avaliar parâmetros produtivos pode ser uma maneira de avaliar mais fidedignamente a biodisponibilidade de metionina. Em um estudo *in vivo*, subsequente a este presente estudo, conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, com vacas leiteiras em lactação que receberam na dieta totalmente misturada (TMR) os mesmos suplementos aqui citados, foi possível observar aumento na produção de leite nos animais que receberam RPMet.

O pH ruminal não diferiu entre os grupos RPMet, UnMet e Controle ($p= 0,67$). Além disso, foram observados dados semelhantes para a digestibilidade de matéria seca da TMR (dMS) para os grupos avaliados ($p=0,73$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm erro padrão (EP) do pH e da digestibilidade ruminal da matéria seca para os grupos RPMet ($n = 4$), UnMet ($n = 4$), Controle ($n = 4$)

Parâmetro	RPMet				UnMet				Controle				Tratamento	Período	Hora	valor de P
	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro				
pH	6,26	0,11	6,18	0,11	6,11	0,11	0,67		0,82		0,02					
dMS% ¹	48,71	5,49	50,62	5,49	54,91	5,49	0,73		0,02							

¹dMS% - digestibilidade da matéria seca

Durante o estudo foram monitorados dois parâmetros ruminais, o pH e a digestibilidade da matéria seca, para os quais não foram encontradas diferenças. O pH ruminal, se manteve na faixa fisiológica entre 6,0 a 7,0 (Perez et al., 2024) e a dMS foi similar, indicando que não houve nenhum prejuízo causado pelo tratamento, na digestibilidade ruminal.

Os dados obtidos neste estudo demonstram que a matriz lipídica do tratamento RPMet foi eficiente em proteger a DL-metionina da degradação ruminal, sendo superior a 90% após 10 horas de incubação ruminal.

Ethical Statement

The animal experiments were approved by the Ethics and Animal Experimentation Committee of the Universidade Federal de Pelotas, registration number 23110.011543/2024-96.

CRedit authorship contribution statement

Laura Valadão Vieira: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing. **Muryllo Botelho Medeiros:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Leonardo Marins:** Methodology, Validation, Writing – original draft. **Noéliton Freitas dos Santos:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Rafaela Ortiz Zirzke:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Mário Toyo Vieira:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Eliza Rossi Komninou:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – review and editing. **Marcio Nunes Côrrea:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – review and editing.

Declaration of competing interest

I have nothing to declare.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgements

The authors would like to thank the postgraduate scholarships granted and the postgraduate programs in Veterinary Medicine and Biotechnology at the Federal University of Pelotas.

Referências

- Adesogan, A. T. (2005). Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM DaisyII incubators. *Animal feed science and technology*, 119(3-4), 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.012>
- Ardalan, M., Dehghan-Banadaky, M., Rezayazdi, K., & Hossein-Zadeh, N. G. (2011). The effect of rumen-protected methionine and choline on plasma metabolites of Holstein dairy cows. *The Journal of Agricultural Science*, 149, 639–646. <https://doi.org/10.1017/S0021859610001292>
- Assunção, A. D. S., Silva, T. E. D., Quirino, D., Franco, M. D. O., & Detmann, E. (2022). Variability among animals and incubation protocols for ruminant in situ degradation studies with tropical feeds. *Animals*, 12, 1901. <https://doi.org/10.3390/ani12151901>
- Ayyat, M. S., Al-Sagheer, A., Noreldin, A. E., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., Abdel-Latif, M. A., Swelum, A. A., Arif, M., & Salem, A. Z. (2021). Beneficial effects of rumen-protected methionine on nitrogen-use efficiency, histological parameters, productivity and reproductive performance of ruminants. *Animal Biotechnology*, 32, 51–66. <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1653314>
- Batistel, F., Arroyo, J. M., Garces, C. I. M., Trevisi, E., Parys, C., Ballou, M. A., Cardoso, F. C., & Loor, J. J. (2018). Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101, 480–490. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13185>
- Berchielli, T. T., Pires, A. V., & Oliveira, S. G. (2011). *Nutrição de Ruminantes*.
- Cagle, C. M., Fonseca, M. A., Callaway, T. R., Runyan, C. A., Cravey, M. D., & Tedeschi, L. O. (2020). Evaluation of the effects of live yeast on rumen parameters and in situ digestibility of dry matter and neutral detergent fiber in beef cattle fed growing and finishing diets. *Applied Animal Science*, 36, 36–47. <https://doi.org/10.15232/aas.2019-0188>
- Chalupa, W. (1975). Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. *Journal of Dairy Science*, 58, 1198–1218. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84697-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84697-2)
- Chandler, T. L., & White, H. M. (2019). Glucose metabolism is differentially altered by choline and methionine in bovine neonatal hepatocytes. *PLOS One*, 14, e0217160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217160>
- Coleman, D. N., Lopreiato, V., Alharthi, A., & Loor, J. J. (2020). Amino acids and the regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 98, S175–S193. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa138>

- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Doherty, M., & Douglas, T. A. (1986). Acute phase response and mastitis in the cow. *Research in Veterinary Science*, 41, 126–128. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)30585-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30585-x)
- Graulet, B., Richard, C., & Robert, J. C. (2005). Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. *Journal of Dairy Science*, 88, 3640–3649. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73049-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73049-6)
- Haugen, H. L., Ivan, S. K., MacDonald, J. C., & Klopfenstein, T. J. (2006). Determination of undegradable intake protein digestibility of forages using the mobile nylon bag technique. *Journal of animal science*, 84(4), 886-893. <https://doi.org/10.2527/2006.844886x>
- Hristov, A. N., Price, W. J., & Shafii, B. (2004). A meta-analysis examining the relationship among dietary factors, dry matter intake, and milk and milk protein yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 2184–2196. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70039-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70039-9)
- Huang, B., Khan, M. Z., Kou, X., Chen, Y., Liang, H., Ullah, Q., Khan, N., Khan, A., Chai, W., & Wang, C. (2023). Enhancing metabolism and milk production performance in periparturient dairy cattle through rumen-protected methionine and choline supplementation. *Metabolites*, 13, 1080. <https://doi.org/10.3390/metabo13101080>
- Hu, K., Wu, H., Wang, Y., Liu, H., & Wei, X. (2025). Effects of rumen-protected lysine and different sources of methionine on lactation performance and ruminal bacterial community in dairy cows. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5151567>
- Jorge-Smeding, E., Ruiz-González, A., Leung, Y. H., Trujillo, A. I., Astessiano, A. L., Ouellet, D. R., Lapierre, H., & Kenéz, Á. (2024). Increased dietary methionine, lysine and histidine supply modulated the heat stress-induced metabolic remodeling of dairy cows. *Frontiers in Animal Science*, 5, 1364779. <https://doi.org/10.3389/fanim.2024.1364779>
- Junior, V. C., Lopes, F., Schwab, C. G., Toledo, M. Z., & Collao-Saenz, E. A. (2021). Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. *PLOS One*, 16, e0243953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243953>
- Kaur, J., Kaur, R., Mahesh, M. S., & Thakur, S. S. (2024). Rumen-protected amino acids for ruminants. In *Feed additives and supplements for ruminants* (pp. 143–166). Springer Nature Singapore.
- Kozloski, G. V. (2017). *Bioquímica dos Ruminantes*. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência-Editora UFSM.
- Lapierre, H., Holtrop, G., Calder, A. G., Renaud, J., & Lobley, G. E. (2012). Is D-methionine bioavailable to the dairy cow? *Journal of Dairy Science*, 95, 353–362. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4553>
- Liu, Y., Liu, C., Zhang, S., Hu, J., Li, M. M., & Zhao, G. (2025). Comparison of the effects of taurine and methionine supplementation on the nitrogen metabolism of beef steers elucidated through plasma metabolome profiling. *Animal Nutrition*, 20, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.11.009>

- Lomborg, S. R., Nielsen, L. R., Heegaard, P. M., & Jacobsen, S. J. V. R. C. (2008). Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary Research Communications*, 32, 575–582. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9057-7>
- Lopes, M. G., Dominguez, J. H. E., Corrêa, M. N., Schmitt, E., & Fischer, G. (2019). Rumen-protected methionine in cattle: influences on reproduction, immune response, and productive performance. *Arquivos do Instituto Biológico*, 86, e1292018. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001292018>
- NASEM. (2021). *Nutrient requirements of dairy cattle* (8th rev. ed.). The National Academies Press.
- NRC (2001). National Research Council. *Basic research opportunities in earth science*. National Academy, Washington DC
- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
- Osorio, J. S., Trevisi, E. R., Ji, P., Drackley, J. K., Luchini, D., Bertoni, G., & Loor, J. J. (2014). Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of Dairy Science*, 97, 7437–7450. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7679>
- Panndorf, H., Richter, H., & Dittrich, B. (1976). Haptoglobin in domestic mammals. V. Plasma haptoglobin level in cattle under pathological conditions. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, 30, 193–202.
- Perez, H. G., Stevenson, C. K., Lourenco, J. M., & Callaway, T. R. (2024). Understanding rumen microbiology: An overview. *Encyclopedia*, 4, 148–157. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010013>
- Qin, X., Lin, X., Hanigan, M. D., Zhao, K., Hu, Z., Wang, Y., Hou, Q., & Wang, Z. (2025). Ruminally protected isoleucine, leucine, methionine, and threonine supplementation of low-protein diets improved the performance and nitrogen efficiency of dairy cows. *Animals*, 15, 1210. <https://doi.org/10.3390/ani15091210>
- Ribas, W. F. G., Monção, F. P., Rocha Júnior, V. R., Maranhão, C. M. D. A., Ferreira, H. C., Santos, A. S. D., Gomes, M. V., & Rigueira, J. P. S. (2021). Effect of wilting time and enzymatic-bacterial inoculant on the fermentative profile, aerobic stability, and nutritional value of BRS capiáu grass silage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 50, e20200207. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200207>
- Rossi, F., Maurizio, M., Francesco, M., Giovanna, C., & Gianfranco, P. (2003). Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen-protected amino acids: Comparison between in situ and in vitro data. *Animal Feed Science and Technology*, 108, 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00131-7)

Schwab, C. G. (1995). Protected proteins and amino acids for ruminants. In *Biotechnology in animal feeds and animal feeding* (p. 141).

Silva, É. B. R. D., Silva, J. A. R. D., Silva, W. C. D., Belo, T. S., Sousa, C. E. L., Santos, M. R. P. D., Neves, K. A. L., Rodrigues, T. C. G. C., Camargo-Júnior, R. N. C., & Lourenço-Júnior, J. D. B. (2024). A review of the rumen microbiota and the different molecular techniques used to identify microorganisms found in the rumen fluid of ruminants. *Animals*, 14, 1448. <https://doi.org/10.3390/ani14101448>

Smith, B. I., Kauffold, J., & Sherman, L. (2010). Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *The Veterinary Journal*, 186, 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.012>

Südekum, K. H., Wolffram, S., Ader, P., & Robert, J. C. (2004). Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.11.001>

Weaving, G., Rocks, B. F., Iversen, S. A., & Titheradge, M. A. (2006). Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine, and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 43, 474–480. <https://doi.org/10.1258/000456306778904605>

Willke, T. (2014). Methionine production—a critical review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9893–9914. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6156-y>

Woo, J. S., Jang, S. S., Kim, J. H., Lee, H. G., & Park, K. K. (2024). Dietary effects of protected fat, soybean meal, and heat-treated soybean meal on performance, physiological parameters, and behavioral measurements of early-fattening Hanwoo steers under heat stress conditions. *Animal Bioscience*, 38(2), 278. <https://doi.org/10.5713/ab.24.0236>

Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Drackley, J. K., Luchini, D. N., & Loor, J. J. (2016). Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, 99, 8716–8732. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10525>

4 Considerações Finais

Nesta tese foram avaliadas três diferentes estratégias nutricionais para bovinos leiteiros. No artigo 1, conduzido *in vivo*, com animais em lactação, consumindo dietas altas em amido, o blend de tamponantes composto por óxido de magnésio, bicarbonato de sódio, algas marinhas calcárias, carbonato de cálcio e calcário calcítico, demonstrou-se capaz de tamponar o rúmen e com potencial de tamponar também o intestino, promovendo, consequentemente, maior eficiência alimentar dos animais que receberam a suplementação do blend de tamponantes. Esperávamos encontrar efeitos em redução de amido fecal, que justificassem a eficiência alimentar, entretanto um maior número de coletas de fezes, diariamente, por animal, poderá elucidar, em estudos futuros, se o blend exerce efeitos na excreção de amido.

O artigo 2, com uma metodologia conduzida *in vitro*, avaliou os efeitos do co-cultivo de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* na digestibilidade de nutrientes presentes em três TMRs. Ainda que sejam escassos os trabalhos de pesquisa que avaliem a associação conjunta destes dois fungos, os resultados apresentados nesta tese demonstram que o co-cultivo desses fungos pode contribuir para a digestibilidade de dietas mais fibrosas, como é o caso daquelas formuladas com palha de trigo.

O artigo 3, utilizando uma abordagem *in situ*, investigou pela primeira vez um produto de metionina rúmen-protégida, disponível comercialmente e produzido no Brasil. Os resultados encontrados demonstraram que a DL- metionina, com revestimento lipídico, resistiu a digestão microbiana ruminal. Nossos dados de digestibilidade ruminal da metionina são semelhantes ao de outras fontes comerciais de metionina protegidas, previamente validadas. Atualmente, outros pesquisadores do NUPEEC HUB, membros do Time Turbo Metabolismo, se concentram em avaliar a biodisponibilidade e os impactos em desempenho produtivo dessa mesma metionina rúmen-protégida, dessa vez em um estudo *in vivo*.

Além dos trabalhos expostos na tese, tive a oportunidade de conduzir e escrever o artigo de um estudo também conduzido com abordagem *in situ*, no qual foi avaliada a suplementação com colina rúmen-protégida.

Durante o doutorado fui bolsista CNPq- Doutorado Acadêmico para Inovação (DAI), através desse fomento participei de projetos de inovação com potencial de transferência de tecnologia. Minhas outras atividades de doutorado envolveram a liderança de, pelo menos, três diferentes experimentos de pesquisa conduzidas no NUPEEC. Participei de treinamento de pessoas, ministrei aulas e palestras, além de ter organizado eventos acadêmicos de extensão. Fui líder do laboratório de metabolismo do NUPEEC. Participei de processos seletivos de estagiários. Durante o doutorado tive a oportunidade de ir duas vezes aos Estados Unidos, a primeira vez para o American Dairy Science Association (2021) e a segunda como doutoranda visitante na University of Wisconsin, Madison (2024). Recebi prêmios destaque pela apresentação de trabalhos em eventos acadêmicos e publiquei trabalhos em congressos internacionais como American Dairy Science Association e World Buiatrics Congress.

Referências

- ABEYTA, M.A. et al. Effects of hindgut acidosis on metabolism, inflammation, and production in dairy cows consuming a standard lactation diet. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 2, p. 1429-1440, 2023.
- ADESOGAN, A.T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisyll incubators. **Animal feed science and technology**, v. 119, n. 3-4, p. 333-344, 2005.
- AKULA, S. et al. Identification of the major protein components of human and cow saliva. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 23, 2023.
- ALLEN, M.S. Symposium review: Integrating the control of energy intake and partitioning into ration formulation. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 3, p. 2181–2190, 2023.
- ALTOP, A.; GÜNGÖR, E; ERENER, G. Aspergillus niger may improve nutritional quality of grape seed and its usability in animal nutrition through solid-state fermentation. **International Advanced Researches and Engineering Journal**, v. 2, n. 3, p. 273–277, 2018.
- AMARAL, L.F. et al. Mecanismos de hidratação do óxido de magnésio. **Ceramica**, v. 53, n. 328, p. 368–372, 2007.
- AMARO, G.A. et al. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: A review. **Bioresource technology**, v. 339, n. 125594, p. 125594, 2021.
- ANDERSEN, P.H.; HESSELHOLT, M.; JARLØV, N. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic and arterial blood of cattle with acute ruminal acidosis. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 35, n. 3, p. 223–234, 1994.
- ANTANAITIS, R. et al. Can rumination time and some blood biochemical parameters be used as biomarkers for the diagnosis of subclinical acidosis and subclinical ketosis?. **Veterinary and animal science**, v. 8, n. 100077, p. 100077, 2019.
- AOAC- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Association of Official Analytical Chemists. **Sci Educ**, 1995.
- ARDALAN, M. et al. The effect of rumen-protected methionine and choline on plasma metabolites of Holstein dairy cows. **The journal of agricultural science**, v. 149, n. 5, p. 639-646, 2011.

ASSUNÇÃO, A.S. et al. Variability among animals and incubation protocols for ruminant in situ degradation studies with tropical feeds. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 15, p. 1901, 2022.

ATALAY, H.; BILAL, T.; EKIZ, B. The effect of physically effective neutral detergent fiber on milk composition and milk yield. **Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**, v. 32, n. 2, p. 140-144, 2021.

AYYAT, M.S. et al. Beneficial effects of rumen-protected methionine on nitrogen-use efficiency, histological parameters, productivity and reproductive performance of ruminants. **Animal biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 51-66, 2021.

BACH, A. et al. Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 11, p. 9777-9788, 2018.

BACH, A. et al. Effects on rumen pH and feed intake of a dietary concentrate challenge in cows fed rations containing pH modulators with different neutralizing capacity. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 7, p. 4580-4598, 2023.

BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 1, p. 480-490, 2018.

BATT, A. **Aspergillus oryzae**. In: CARL, A.; BATT, M.L (Ed). Encyclopedia of Food Microbiology. Califórnia: Academic Press, 2014, pp. 92-96.

BEAUCHEMIN, K.A. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4762-4784, 2018.

BEHARKA, A.A.; NAGARAJA, T.G. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 6, p. 1591-1598, 1998.

BEHARKA, A.A.; NAGARAJA, T.G.; MORRILL, J.L. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 12, p. 4326-4336, 1991.

BENOIT-GELBER, I. et al. Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 102, p. 31-37, 2017.

BERCHIELLI, T.T.A.V.; PIRES, S.G. **Metabolismo de Proteínas**. In: SANTOS, F.A.P. (Ed) Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2011, pp. 255-284.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; DE OLIVEIRA, S.G. **Metabolismo dos carboidratos não estruturais**. In: ANTUNES, R.C.; RODRIGUEZ, N.M. (Ed) Nutrição de Ruminantes. São Paulo: Prol Editora Gráfica, 2011, pp. 229- 253.

BERNARD, J.K. et al. Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. **The professional animal scientist**, v. 30, n. 6, p. 649-656, 2014.

BERTONI, G. et al. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 9, p. 3300-3310, 2008.

BICA, R. et al. Nuclear magnetic resonance to detect Rumen metabolites associated with Enteric methane emissions from beef cattle. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 5578, 2020.

BIONAZ, M.; LOOR, J.J. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle. **Bioinformatics and biology insights**, v. 5, p. 83-98, 2011.

BITTENCOURT, G.A. et al. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 339, 2021.

BRITO, L.F. et al. Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 15 Suppl 1, n. 100292, p. 100292, 2021.

BRITTON, R.A.; STOCK, R.A. Acidosis, rate of starch digestion and intake. **Oklahoma Agricultural Experiment Station MP-121**, p. 125, 1987.

BROSNAN, J.T. et al. Methionine: A metabolically unique amino acid. **Livestock science**, v. 112, n. 1-2, p. 2-7, 2007.

CACCAMO, M. et al. Association of total mixed ration particle fractions retained on the Penn State Particle Separator with milk, fat, and protein yield lactation curves at the cow level. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2502-2511, 2014.

CAGLE, C.M. et al. Evaluation of the effects of live yeast on rumen parameters and in situ digestibility of dry matter and neutral detergent fiber in beef cattle fed growing and finishing diets. **Applied Animal Science**, v. 36, n. 1, p. 36-47, 2020.

CALAMARI, L. et al. Rumination time around calving: an early signal to detect cows at greater risk of disease. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 3635-3647, 2014.

CANTET, J.M. et al. A meta-analysis of the impact of an *Aspergillus oryzae* fermentation product on ruminal fermentation and dairy cow performance. **Animal Feed Science and Technology**, 2025.

- CAO, Y. et al. Physically effective neutral detergent fiber improves chewing activity, rumen fermentation, plasma metabolites, and milk production in lactating dairy cows fed a high-concentrate diet. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 5631-5642, 2021.
- CARDOSO, F.C.; KALSCHEUR, K.F.; DRACKLEY, J.K. Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 5684-5693, 2020.
- CASTRILLO, C. et al. Effect of compound feed pelleting and die diameter on rumen fermentation in beef cattle fed high concentrate diets. **Animal feed science and technology**, v. 180, n. 1-4, p. 34-43, 2013.
- CAVALLINI, D. et al. Immune-metabolic-inflammatory markers in Holstein cows exposed to a nutritional and environmental stressing challenge. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 105, p. 42-55, 2021.
- CAVALLINI, D. et al. Evaluation of fecal sampling time points to estimate apparent nutrient digestibility in lactating Holstein dairy cows. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 1065258, 2022.
- CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of dairy science**, v. 58, n. 8, p. 1198-1218, 1975.
- CHANDLER, T.L.; WHITE, H.M. Glucose metabolism is differentially altered by choline and methionine in bovine neonatal hepatocytes. **PLoS one**, v. 14, n. 5, p. e0217160, 2019.
- CHEN, L. et al. Relative significances of pH and substrate starch level to roles of *Streptococcus bovis* S1 in rumen acidosis. **AMB express**, v. 6, n. 1, p. 80, 2016.
- CHIQUETTE, J. *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*, used alone or in combination, as a feed supplement for beef and dairy cattle. **Canadian journal of animal science**, v. 75, n. 3, p. 405-415, 1995a.
- CHOUDHURY, P.K. et al. Rumen microbiology: An overview. **Rumen microbiology: from evolution to revolution**. p. 3-16, 2015.
- CHRISTIANSEN; W.I.E. Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide beef cattle fed a high-concentrate diet with, defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. **Journal of animal science**, v. 68, p. 2105-2118, 1990.
- CHRISTODOULOPOULOS, G. **Recent Advances in the Clinical Management of Subacute Ruminal Acidosis in Cattle**, 2025.
- COLEMAN, D.N. et al. Amino acids and the regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. **Journal of animal science**, v. 98, n. Suppl 1, p. S175-S193, 2020.

CONNER, J.G. et al. Acute phase response and mastitis in the cow. **Research in veterinary science**, v. 41, n. 1, p. 126-128, 1986.

COOPER, R.J. et al. Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. **Journal of animal science**, v. 77, n. 5, p. 1093-1099, 1999.

COPPOCK, C.E.; BATH, D.L.; HARRIS, B., Jr. From feeding to feeding systems. **Journal of dairy science**, v. 64, n. 6, p. 1230-1249, 1981.

CORRÊA, M.N.; GONZÁLEZ, F.D.; SILVA, S.C. **Transtornos do equilíbrio ácido-básico**. In: CORRÊA, M.N.; et al. (Ed). *Transtornos metabólicos nos animais domésticos*. Rio Grande do Sul: Editora e Gráfica Universitária, 2010, p. 67-90.

CRUYWAGEN, C.W.C. et al. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 8, p. 5506-5514, 2015.

DA MATA, D.G. et al. Ruminal responses, digestibility, and blood parameters of beef cattle fed diets without forage with different hybrids and processing of the corn. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 107, n. 2, p. 367-378, 2023.

DANSCHER, A.M. et al. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 39, 2015.

DE ALMEIDA OLLÉ, M. et al. Effects of substituting sweet potato flour for ground corn on performance, feeding behavior, and metabolism of dairy cows. **Tropical animal health and production**, v. 53, n. 3, p. 390, 2021.

DE CAMPOS, F.T. et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 980-984, 2010.

DEVOS, C. **Effect of feed additive supplementation on rumen bacterial amino acid profile and fermentation dynamics in dairy cows**. 2019. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências), University of Pretoria, 2019.

DEVRIES, T.J.; GILL, R.M. Adding liquid feed to a total mixed ration reduces feed sorting behavior and improves productivity of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 5, p. 2648-2655, 2012.

DHIMAN, T.R. et al. Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. **Animal feed science and technology**, v. 101, n. 1-4, p. 115-125, 2002.

DIEPERSLOOT, E.C. et al. Effect of cutting height, microbial inoculation, and storage length on fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage. **Translational animal science**, v. 6, n. 2, p. txac037, 2022.

DONG, L.F. et al. Effects of diet forage proportion on maintenance energy requirement and the efficiency of metabolizable energy use for lactation by lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 12, p. 8846-8855, 2015.

ELGHANDOUR, M.M.M.Y. et al. Fungi as a Source of Exogenous Enzymes in Ruminant Feeding. In: SALEM; A.Z.M.; HASSEN, A.; ANELE, U.Y.; (Ed) Exogenous Enzymes as Feed Additives in Ruminants. Cham: Springer International Publishing, 2023a. pp. 129-150.

ELMHADI, M.E. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: Microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. **Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)**, v. 10, p. 148-155, 2022.

EMMANUEL, B.; KENNELLY, J.J. Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 9, p. 1912-1918, 1984.

ENEMARK, J.M.D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 176, n. 1, p. 32-43, 2008.

ERDMAN, R.A. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 12, p. 3246-3266, 1988.

EVCI, Şevket. Ruminal Acidosis: A Systematic Review. **International Journal of Veterinary and Animal Research (IJVAR)**, v. 7, n. 3, p. 92-99, 2024.

FACTORY, B. et al. **Mammary Gland and Milk. Dairy Processing and Quality Assurance**, p. 60, 2015.

FANIYI, T.O. et al. Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 1, p. 2-11, 2019.

FERRARETTO, L.F. Impact of starch content and digestibility in dairy cattle diets. **Anais da 28th annual florida ruminant nutrition symposium**. p. 112-123, 2017.

FERREIRA, G.; MERTENS, D.R. Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects on in vitro disappearance. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 12, p. 4414-4425, 2005.

FERREIRA, J.A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource technology**, v. 215, p. 334-345, 2016.

FONDEVILA, M. et al. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. **Animal science (Penicuik, Scotland)**, v. 51, n. 2, p. 422-425, 1990.

GIBSON, G.R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GIGER-REVERDIN, S. Recent advances in the understanding of subacute ruminal acidosis (SARA) in goats, with focus on the link to feeding behaviour. **Small Ruminant Research**, v. 163, p. 24-28, 2018.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)**, 1970.

GOESER, J.P.; COMBS, D.K. An alternative method to assess 24-h ruminal in vitro neutral detergent fiber digestibility. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 8, p. 3833-3841, 2009.

GOLDER, H.M. et al. Characterizing ruminal acidosis risk: A multiherd, multicountry study. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 5, p. 3155-3175, 2023.

GOLDER, H.M.; LEAN, I.J. Ruminal acidosis and its definition: A critical review. **Journal of Dairy Science**, 2024.

GOMEZ-ALARCON, R.A.; DUDAS, C.; HUBER, J.T. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 3, p. 703-710, 1990.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Perfil Bioquímico Sanguíneo**. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; et al. (Ed) *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. Rio Grande do Sul: Editora UFRGS, 2022, pp. 463–515

GRANT, R.J.; COTANCH, K.W. Perspective and Commentary: Chewing behavior of dairy cows: Practical perspectives on forage fiber and the management environment. **Applied Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 146-155, 2023.

GRANT, R.J.; FERRARETTO, L. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4111-4121, 2018.

GRAULET, B.; RICHARD, C.; ROBERT, J.C. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 10, p. 3640-3649, 2005.

GUO, C. et al. Effects of different forage types on Rumen fermentation, microflora, and production performance in peak-lactation dairy cows. **Fermentation**, v. 8, n. 10, p. 507, 2022a.

GUO, L. et al. Supplementation of *Aspergillus oryzae* culture improved the feed dry matter digestibility and the energy supply of total volatile fatty acid concentrations in the Rumen of Hu sheep. **Frontiers in nutrition**, v. 9, p. 847156, 2022b.

GUO, W. et al. Effect of whole-plant corn silage treated with lignocellulose-degrading bacteria on growth performance, rumen fermentation, and rumen microflora in sheep. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 16, n. 7, p. 100576, 2022c.

HAO, X. et al. Effects of feeding corn bran and soybean hulls on nutrient digestibility, rumen microbial protein synthesis, and growth performance of finishing lambs. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 15, n. 3, p. 100172, 2021.

HASAN, F.; SHAH, A.A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASSAN, F.U. et al. Phytopathogenic additives can modulate Rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet-microbe interaction. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 575801, 2020.

HAUGEN, H.L. et al. Determination of undegradable intake protein digestibility of forages using the mobile nylon bag technique. **Journal of animal science**, v. 84, n. 4, p. 886-893, 2006.

HAUSER, A. et al. Effect of heat stress and solar radiation on dry matter intake, biochemical indicators, production, and quality of Holstein and Jersey cows' milk. **Arquivo Brasileiro De Med Veterinária E Zootecnia**, v. 75, p. 721-734, 2023.

HAVEKES, C.D. et al. Effects of wheat straw chop length in high-straw dry cow diets on intake, health, and performance of dairy cows across the transition period. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 1, p. 254-271, 2020.

HIGGINBOTHAM, G.E. et al. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* extract on milk yield in a commercial dairy herd. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 1, p. 343-348, 1994a.

HOLLAND, C. et al. The pioneer forage manual: a nutritional guide. **Pioneer Hi-Bred**, 1990.

HRISTOV, A.N.; PRICE, W.J.; SHAFII, B. A meta-analysis examining the relationship among dietary factors, dry matter intake, and milk and milk protein yield in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 7, p. 2184-2196, 2004.

HU, H. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248-252, 2011.

HU, K. et al. Effects of Rumen-protected lysine and different sources of methionine on lactation performance and ruminal bacterial community in dairy cows. **Social Science Research Network**, 2025.

HUANG, B. et al. Enhancing metabolism and milk production performance in periparturient dairy cattle through Rumen-protected methionine and choline supplementation. **Metabolites**, v. 13, n. 10, p. 1080, 2023.

HUMER, E. et al. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 2, p. 872-888, 2018.

HUOT, F. et al. Relationship between farm management strategies, reticuloruminal pH variations, and risks of subacute ruminal acidosis. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 4, p. 2487-2497, 2023.

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Soyhulls as an alternative feed for lactating dairy cows: a review. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 4, p. 1052-1073, 2003.

IQBAL, A. et al. Role of cationic and anionic feeding in farm animals. **Journal of Animal Science and Products**, v. 2, p. 38-45, 2019.

ISO 9622:2013 and IDF 141:2013: **Milk and liquid milk productsGuidelines for the application of mid-infrared spectrometry**. 2013. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/56874.html> Acesso em: 20 set. 2025.

JANOVICK, N.A.; BOISCLAIR, Y.R.; DRACKLEY, J.K. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 3, p. 1385-1400, 2011.

JORGE-SMEDING, E. et al. Increased dietary methionine, lysine and histidine supply modulated the heat stress-induced metabolic remodeling of dairy cows. **Frontiers in animal science**, v. 5, 2024.

JUNIOR, V.C. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on the performance of high production dairy cows in the tropics. **PLoS one**, v. 16, n. 4, p. e0243953, 2021.

KACHHADIA, L.; KATOLE, S.B.; PATEL, N. Acidosis in ruminants: Nutritional overview. **The pharma innovation**, v. 12, n. 1, p. 20-22, 2023.

KAHYANI, A. et al. Performance of dairy cows fed diets with similar proportions of undigested neutral detergent fiber with wheat straw substituted for alfalfa hay, corn silage, or both. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 12, p. 10903-10915, 2019.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Serum proteins and the dysproteinemias**. In: KANEKO, J.J.; et al. (Ed) biochemistry of domestic animals. Massachusetts: Editora Academic Press, 1997, p. 117-138.

KARIMI, S. et al. Evaluation of nutritional composition of pure filamentous fungal biomass as a novel ingredient for fish feed. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 152, 2021.

KAUR, J. et al. **Rumen-protected amino acids for ruminants**. In: KAUR, J.; et al. (Ed) Feed Additives and Supplements for Ruminants. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024, pp. 143-166.

KELLEMS, R.O.; LAGERSTEDT, A.; WALLENTINE, M.V. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 10, p. 2922-2928, 1990.

KEYSER, R.B. et al. Characterization of limestones and their effects in vitro and in vivo in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 68, n. 6, p. 1376-1389, 1985.

KHATTAB, M.S.A.E.; ABD EL TAWAB, A.M. *In vitro* evaluation of palm fronds as feedstuff on ruminal digestibility and gas production. **Acta scientiarum. Animal sciences**, v. 40, n. 1, p. 39586, 2018.

KHORRAMI, B. et al. Variations in fecal pH and fecal particle size due to changes in dietary starch: Their potential as an on-farm tool for assessing the risk of ruminal acidosis in dairy cattle. **Research in veterinary science**, v. 152, p. 678-686, 2022.

KHUDYAKOVA, K.K.; KOSOLAPOVA, V.G. Determining the structural carbohydrates and lignin levels in forage using the van soest and kizel methods. **Russian Agricultural Sciences**, v. 48, n. 5, p. 400-404, 2022.

KI, Y.W. et al. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. **Toxicology letters**, v. 218, n. 3, p. 235-245, 2013.

KIHAL, A.; RODRIGUEZ-PRADO, M.E.; CALSAMIGLIA, S.B. Relative bioavailability of 3 rumen-undegradable methionine sources in dairy cows using the area under the curve technique. **JDS communications**, v. 2, n. 4, p. 182-185, 2021.

KLEEN, J.L. et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003.

KOMARAGIRI, M.V.; ERDMAN, R.A. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 5, p. 929-937, 1997.

KONG, F. et al. *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* co-cultivation extract affects in vitro degradation, fermentation characteristics, and bacterial composition in a diet-specific manner. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 11, n. 5, p. 1248, 2021.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciencia-Editora UFSM. 2017, 211p.

KUMAR, B.S.B. et al. **Rumen buffers to harness nutrition, health and productivity of ruminants.** In: KUMAR, B.S.B.; et al. (Ed) Feed Additives and Supplements for Ruminants. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 495-518.

LAPIERRE, H. et al. Is D-methionine bioavailable to the dairy cow? **Journal of dairy science**, v. 95, n. 1, p. 353-362, 2012.

LI, P. et al. FABP5 is a critical regulator of methionine-and estrogen-induced SREBP-1c gene expression in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 1, p. 537-549, 2019.

LI, Q. et al. Recent advances in the development of Aspergillus for protein production. **Bioresource technology**, v. 348, n. 126768, p. 126768, 2022.

LI, S. et al. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 1, p. 294-303, 2012.

LINN, J. Feed efficiency: its economic impact in lactating dairy cows. **WCDS Advances in Dairy Technology**, p.19-28, 2006.

LIU, Y. et al. GRP78 regulates milk biosynthesis and the proliferation of bovine/mammary epithelial cells through the mTOR signaling pathway. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 24, p. 1-12, 2019.

LIU, Y. et al. Comparison of the effects of taurine and methionine supplementation on the nitrogen metabolism of beef steers elucidated through plasma metabolome profiling. **Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)**, v. 20, p. 376-386, 2025.

LOBO, R.R. et al. Production, physiological response, and calcium and magnesium balance of lactating Holstein cows fed different sources of supplemental magnesium with or without ruminal buffer. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 2, p. 990-1001, 2023.

LOCKARD, C.L. et al. Effects of roughage type on particle separation, rumination, fiber mat characteristics, in situ degradation, and ruminal fermentation parameters in beef steers. **Journal of animal science**, v. 99, n. 11, 2021.

LOERCH, S.C.; OKE, B.O. **Rumen Protected Amino Acids in Ruminant Nutrition.** In: Friedmen, M. (Ed) Absorption and Utilization of Amino Acids. CRC Press, 2018. pp. 187-200.

LOMBORG, S.R. et al. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. **Veterinary research communications**, v. 32, n. 7, p. 575-582, 2008.

LOPES, M.G. et al. Rumen-protected methionine in cattle: influences on reproduction, immune response, and productive performance. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

LUBIS, D.; WINA, E.; HARYANTO, B. Growth response of sheep fed concentrate with *Aspergillus oryzae* fermentation culture. **International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP)**, v. 2, p. 62-70, 2002.

MALIK, M.I. et al. Effect of physical form and level of wheat straw inclusion on growth performance and blood metabolites of fattening goat. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 10, n. 10, p. 1861, 2020.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. **Gut pathogens**, v. 10, p. 21, 2018.

MARTINEZ, F.A.C. et al. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 4, p. 482-488, 2013.

MARTINS, L.F. et al. Effects of an exogenous enzyme preparation extracted from a mixed culture of *Aspergillus* spp. on lactational performance, metabolism, and digestibility in primiparous and multiparous cows. **Journal of dairy science**, v. 105, n. 9, p. 7344-7353, 2022.

MARUTA, C.A. et al. The measurement of urine pH to predict the amount of buffer used in the treatment of acute rumen lactic acidosis in cattle. **Ciencia rural**, v. 38, n. 3, p. 717-722, 2008.

MERRILL, S. D. Apple poisoning in dairy cows. **Med. Vet.**, p. 405, 1952.

MICHELOTTI, T.C.A. et al. Effects of rumen-protected methionine supplementation on dairy cows during early postpartum. **Journal of applied animal research**, v. 49, n. 1, p. 257-263, 2021.

MILLEN, D. et al. **Ruminal acidosis**. In: MILLEN, D.; et al. (Ed) Rumenology. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 127–156.

MILLER, M.D. et al. Influence of fiber degradability of corn silage in diets with lower and higher fiber content on lactational performance, nutrient digestibility, and ruminal characteristics in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 2, p. 1728-1743, 2021.

MINAMI, N.S. et al. Subacute ruminal acidosis in zebu cattle: clinical and behavioral aspects. **Animals**, v. 11, n. 1, p.21, 2020.

MOJSOV, K.D. **Aspergillus Enzymes for Food Industries**. In: Gupta, V.K.; (Ed) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 2016, p. 215–222.

MONTEIRO, H.F.; FACIOLA, A.P. Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides. **Journal of animal science**, v. 98, n. 8, 2020.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

MUTSVANGWA, T. et al. Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 12, p. 3454-3461, 2002.

NASEM. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 8nd ed. Washington DC: The National Academies Press, 2021. 502p.

NASROLLAHI, S.M. et al. Variability in susceptibility to acidosis among high producing mid-lactation dairy cows is associated with rumen pH, fermentation, feed intake, sorting activity, and milk fat percentage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 72-82, 2017.

NASROLLAHI, S.M. Challenges in the definition and measurement of subacute ruminal acidosis in holstein dairy cows: A review. **Farm Animal Health and Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 63-70, 2023.

NATNAEL, D.A. et al. Effects of physically effective fiber on rumen and milk parameters in dairy cows: a review. **Indian Journal of Animal Research**, v. 54, n. 11, p. 1317-1323, 2020.

NAYAN, N. et al. Improving ruminal digestibility of various wheat straw types by white-rot fungi: Ruminal degradability of wheat straw by fungi. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 99, n. 2, p. 957-965, 2019.

NEIDERFER, K.P. et al. Effects of calcium carbonate, magnesium oxide and encapsulated sodium bicarbonate on measures of post-ruminal fermentation. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 104, n. 3, p. 802-811, 2020.

NEUBAUER, V. et al. Starch-rich diet induced Rumen acidosis and hindgut dysbiosis in dairy cows of different lactations. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 10, n. 10, p. 1727, 2020.

NEVILLE, E.W. et al. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk production in mid-lactation dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 8027-8039, 2019.

NEVILLE, E.W. et al. Effects of calcareous marine algae on milk production, feed intake, energy balance, mineral status, and inflammatory markers in transition dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 105, n. 8, p. 6616-6627, 2022.

NEWBOLD, C.J.; BROCK, R.; WALLACE, R.J. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). **The journal of agricultural science**, v. 116, n. 01, p. 159, 1991.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N.R.; SYLVESTER, J.T. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 1, p. 223-237, 2005.

NOUSIAINEN, J.I.; RINNE, M.; HUHTANEN, P.J. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows. 1. The effects of forage and concentrate factors on total diet digestibility. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 5019-5030, 2009.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7nd ed. Washington DC, 2001. 405p.

OGUNADE, I.M.; MCCOUN, M. Effects of adding live *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus*-based enzyme extracts on ruminal fermentation, plasma polyamine concentrations, and fiber digestibility in beef steers fed a high-forage diet. **Applied Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 21-26, 2021.

OKPARA, M.O. Microbial enzymes and their applications in food industry: A mini-review. **Advances in enzyme research**, v. 10, n. 01, p. 23-47, 2022.

OMINSKI, K.H. et al. Physiological and production responses when feeding *Aspergillus oryzae* to dairy cows during short-term, moderate heat stress. **Animal science (Penicuik, Scotland)**, v. 77, n. 03, p. 485-490, 2003.

ORTOLANI, E.L.; MARUTA, C.A.; MINERVINO, A.H.H. Aspectos clínicos da indução experimental de acidose láctica ruminal em zebuínos e taurinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 4, p. 253-261, 2010.

ORTOLANI, E.L. et al. Acidoses ruminais em bovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Buiatria - RBB**, v. 2, n. 2, p. 39-64, 2021.

OSORIO, J.S. et al. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 10, p. 6248-6263, 2013.

OSORIO, J.S. et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 12, p. 7437-7450, 2014.

OWENS, F.N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998.

OWENS, F.N.; BASALAN, M. **Ruminal Fermentation**. In: MILLEN, D.D.; ARRIGONI, M.B.; PACHECO, R.D.L.; (Ed) Rumenology. Cham: Springer International Publishing, 2016. pp. 63-102.

OXENBØLL, K. **Aspergillus Enzymes and Industrial Uses**. In: POWELL, K.A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J.F.; (Ed) The Genus *Aspergillus*. Boston: Springer US, 1994, pp. 147-154.

PALHANO, R.L.A. et al. Exploring the impact of high-energy diets on cattle: Insights into subacute rumen acidosis, insulin resistance, and hoof health. **Journal of dairy science**, v. 107, n. 7, p. 5054-5069, 2024.

PANNDORF, H.; RICHTER, H.; DITTRICH, B. Haptoglobin in domestic mammals. V. Plasma haptoglobin level in cattle under pathological conditions. **Archiv für experimentelle Veterinarmedizin**, v. 30, n. 2, p. 193-202, 1976.

PEREZ, H.G. et al. Understanding rumen microbiology: An overview. **Encyclopedia**, v. 4, p. 148-157, 2024.

PODVERSICH, F. et al. 327 Effects of Inclusion of Amaferm on Animal Performance, Chewing Activity, and Nutrient Digestibility of Backrounding Beef Heifers Fed Either a Sorghum Silage-or a Byproducts-based Diet. **Journal of Animal Science**, v. 99, n. Supplement_3, p. 181-182, 2021a.

PRADEEP, M. Application of acute phase proteins as biomarkers in modern veterinary practice. **Indian J Veterinary Anim Sci Res**, v. 43, p. 1-13, 2014.

PRILLIGE, R.W. et al. The effects of altering hay:grain ratios on digestibility and rate of passage of dry malter in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 1, 1979.

PUNIYA, A.K. et al. **Rumen Microbiology: An Overview**. In: PUNIYA, A.K.; SINGH, R.; KAMRA, D.N.; (Ed) Rumen microbiology: from evolution to revolution. India: Springer, 2015, pp. 3-16.

PUPO, M.R.; FERRARETTO, L.F. Effects of laboratory ensiling method, microbial inoculation, and storage length on the fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage and high-moisture corn. **Animal feed science and technology**, v. 306, n. 115818, p. 115818, 2023.

QIN, X. et al. Ruminally protected isoleucine, leucine, methionine, and threonine supplementation of low-protein diets improved the performance and nitrogen efficiency of dairy cows. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 15, n. 9, 2025.

RAGHUVANSHI, S.; MISRA, S.; SAXENA, R.K. Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2014.

REDDY, P.R.K.; HYDER, I. Ruminant Digestion. **Textbook of Veterinary Physiology**. p. 353-366, 2023.

RIBAS, W.F.G. et al. Effect of wilting time and enzymatic-bacterial inoculant on the fermentative profile, aerobic stability, and nutritional value of BRS capiáu grass silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 50, 2021.

RICCI, S. et al. Supplementation with phytogenic compounds modulates salivation and salivary physico-chemical composition in cattle fed a high-concentrate diet. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 645529, 2021.

ROBERT, J.; WILLIAMS, P. Influence of forage type on the intestinal availability of methionine from a rumen protected form. **Journal of Dairy Science**, v. 80, 1997.

ROGERS, J.A.; DAVIS, C.L; CLARK, J.H. Alteration of rumen fermentation, milk fat synthesis, and nutrient utilization with mineral salts in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 65, n. 4, p. 577-586, 1982.

ROSSI, C.A.S. et al. Replacing sodium bicarbonate with half amount of calcareous marine algae in the diet of beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019.

ROSSI, F. et al. Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen-protected amino acids: Comparison between in situ and in vitro data. **Animal Feed Science and Technology**, v. 108, p. 223-229, 2003.

RUSSELL, J.B; CHOW, J.M. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 3, p. 826-830, 1993.

RYAN, R. K. Concentrations of glucose and low-molecular-weight acids in the rumen of sheep following the addition of large amounts of wheat to the rumen. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p. 646-652, 1964.

SAGHEBI, M. et al. Evaluation of the effects of biological processing of wheat straw by *Aspergillus oryzae* on rumen fermentation parameters and fiber degradability in ruminants. **Journal of Ruminant Research**, 2023.

SANTOS, D.A. et al. Is the total mixed ration the best option for feeding crossbred dairy cows using diets based on cactus cladodes on family farms? **Tropical Grasslands-Forrajes Tropical**, v. 10, p. 124-133, 2022a.

SAR, T.; FERREIRA, J.A.; TAHERZADEH, M.J. Conversion of fish processing wastewater into fish feed ingredients through submerged cultivation of *Aspergillus oryzae*. **Systems microbiology and biomanufacturing**, v. 1, n. 1, p. 100-110, 2021.

SAVELA, M.F.B. et al. Comparison of marine algae-based rumen buffer with sodium bicarbonate buffer and its role in increasing milk value. **The Journal of dairy research**, v. 91, n. 4, p. 391-396, 2024.

SCHINGOETHE, D.J. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10143-10150, 2017.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*--a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 426-435, 2002.

SCHWAB, C.G. **Protected proteins and amino acids for ruminants**. In: WALLACE, R.J.; CHESSON, A.; (Ed) *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. pp. 115-141.

SEO, J.K. et al. Direct-fed microbials for ruminant animals. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 23, n. 12, p. 1657-1667, 2010.

SERVA, L. et al. Short communication: The relationship between dietary particle size and undegraded neutral detergent fibre in lactating dairy cows: A prospective cohort

observational study. **Animal feed science and technology**, v. 279, n. 115017, p. 115017, 2021.

SHARMA, H. et al. Effect of feeding buffer on feed intake, milk production and rumen fermentation pattern in lactating animals: a review. **J Entomol Zool Stud**, v. 6, p. 916-922, 2018.

SHRIVASTAVA, B. et al. White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 823-831, 2011.

SHRIVASTAVA, B. Bioprocessing of wheat straw into nutritionally rich and digested cattle feed. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 6360, 2014.

SIEVERT, S.J.; SHAVER, R.D. Carbohydrate and Aspergillus oryzae effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 1, p. 245-254, 1993.

SILBERBERG, M. et al. Sensor-captured modifications in cow behaviour under subacute ruminal acidosis. **Animal - Open Space**, v. 3, n. 100063, p. 100063, 2024.

SILVA, É.B.R. et al. A review of the Rumen Microbiota and the different molecular techniques used to identify microorganisms found in the Rumen fluid of ruminants. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 14, n. 10, p. 1448, 2024.

SILVESTRE, T. et al. Performance of dairy cows fed normal-or reduced-starch diets supplemented with an exogenous enzyme preparation. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 2288-2300, 2022.

SMITH, B.I.; KAUFFOLD, J.; SHERMAN, L. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 186, n. 2, p. 162-165, 2010.

SOARES, B.B. et al. Correlação do consumo alimentar residual com características de desempenho em animais da raça nelore. **Anais da reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia - congresso brasileiro de zootecnia**, v. 55, 2018

SOUFIZADEH, M. et al. Indigestible neutral detergent fibers: Relationship between forage fragility and neutral detergent fibers digestibility in total mixed ration and some feedstuffs in dairy cattle. **Veterinary research forum: an international quarterly journal**, v. 9, n. 1, p. 49-57, 2018.

STEELE, M.A. et al. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4955-4966, 2016.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. **The rumen bacteria**. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S.; (Ed) *The Rumen Microbial Ecosystem*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997, pp. 10-72.

ST-PIERRE, N.R; SYLVESTER, J.T. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 7, p. 2487-2497, 2005.

STYPINSKI, J.D. et al. Effect of acid detergent lignin concentration for diets formulated to be similar in NDF content on energy utilization in lactating Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, 2024.

SUCU, E. et al. Effects of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation product to transition Holstein cows on performance and health. **Canadian journal of animal science**, v. 99, n. 2, p. 237-243, 2019.

SÜDEKUM, K.H. et al. Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. **Animal feed science and technology**, v. 113, n. 1-4, p. 17-25, 2004.

SUN, H. et al. Effects of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on in vitro Rumen fermentation and microbial populations between different roughage sources. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 9, p. 1285-1292, 2014.

TAJIK, J. et al. Evaluation of rumenocentesis practicability as a routine diagnostic evaluation of rumenocentesis practicability as a routine diagnostic technique in veterinary practice technique in veterinary practice. **Veterinarski Arhiv**, v. 81, p. 557-561, 2011.

TAKIYA, C.S. et al. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal feed science and technology**, v. 228, p. 159-167, 2017.

TAYE, D.; ETEFA, M. Review on improving nutritive value of forage by applying exogenous enzymes. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 5, p. 72-79, 2020.

THAREJA, A. et al. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. **Archives of animal nutrition**, v. 60, n. 5, p. 412-417, 2006.

TONDE, P. et al. Performance of lactating buffaloes on soybean hulls based concentrate mixture. **Buffalo Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 187-195, 2024.

TRICARICO, J.M; JOHNSTON, J.D.; DAWSON, K.A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal feed science and technology**, v. 145, n. 1-4, p. 136-150, 2008.

TURNER, A.W.; HODGETTS, V.E. Second annual report of the commonwealth scientific and industrial research organization 1949-1950. **Commonwealth of Australia**, p.43, 2007.

TYASI, T.L. et al. Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: a review assessment of production systems and breeding practices of goat and

donkey farmers in Limpopo Province. **International Journal of Current Science**, v. 17, p. 56-63, 2015.

USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foreign Agricultural Service. Production, Commodity “0410000”**. 2024. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/0410000> Acesso em: 20 set. 2024.

UNGERFELD, E.M. Metabolic hydrogen flows in Rumen fermentation: Principles and possibilities of interventions. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 589, 2020.

UWINEZA, C. et al. Recent developments in the application of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* in ruminant feed. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 14, n. 16, p. 2427, 2024.

VALLEJO-TIMARÁN, D. et al. Incidence and effects of subacute ruminal acidosis and subclinical ketosis with respect to postpartum anestrus in grazing dairy cows. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03712, 2020.

VIEIRA-NETO, A. et al. Duration and degree of diet-induced metabolic acidosis prepartum alter tissue responses to insulin in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 2, p. 1660-1679, 2021.

VOULGARAKIS, N. et al. Ruminal Acidosis Part I: Clinical manifestations, epidemiology and impact of the disease. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 74, n. 3, p. 5883-5891, 2023.

WANG, K. et al. Effects of high-grain diet on performance, ruminal fermentation, and Rumen microbial flora of lactating Holstein dairy cows. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 14, n. 17, p. 2522, 2024.

WEAVING, G. et al. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine, and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 474-480, 2006.

WEI, C. et al. Meta-analysis of Rumen-protected methionine in milk production and composition of dairy cows. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 12, p. 1505, 2022.

WEIMER, P.J.; HALL, M.B. The potential for biomimetic application of rumination to bioreactor design. **Biomass & bioenergy**, v. 143, n. 105822, p. 105822, 2020.

WESTER, T. J. et al. Synthesis of methionine (Met) from 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid (HMB) in growing lambs. **Journal of Animal Science**, v. 78, 2000.

WHITE, R.R. et al. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations. I: Deriving equations that identify factors that influence effectiveness of fiber. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 9551-9568, 2017.

WIEDMEIER, R.D.; ARAMBEL, M.J.; WALTERS, J.L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of dairy science**, v. 70, n. 10, p. 2063-2068, 1987a.

WILLKE, T. Methionine production--a critical review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9893-9914, 2014.

WOO, J.S. et al. Dietary effects of protected fat, soybean meal, and heat-treated soybean meal on performance, physiological parameters, and behavioral measurements of early-fattening Hanwoo steers under heat stress conditions. **Animal bioscience**, v. 38, n. 2, p. 278-292, 2025.

YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A. Effect of physically effective fiber on digestion and milk production of dairy cows fed diets containing barley or corn grains. **Journal of Animal Science**, 2006.

YU, R. et al. *Aspergillus niger* as a Secondary Metabolite Factory. **Frontiers in chemistry**, v. 9, p. 701022, 2021.

ZANTON, G.I.; TOLEDO, M.Z. Systematic review and meta-analysis of dairy cow responses to rumen-protected methionine supplementation before and after calving. **JDS communications**, v. 5, n. 4, p. 293-298, 2024.

ZARDIN, P. Chemical composition of corn silage produced by scientific studies in Brazil-A meta-analysis Composição bromatológica de silagens de milho produzidas em condições experimentais no Brasil-Metanálise. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 503-512, 2017.

ZERBY, H.N. et al. Effects of diet and *Aspergillus oryzae* extract or *Saccharomyces cerevisiae* on growth and carcass characteristics of lambs and steers fed to meet requirements of natural markets. **Journal of animal science**, v. 89, n. 7, p. 2257-2264, 2011a.

ZHANG, R. et al. Effect of high-concentrate diets on microbial composition, function, and the VFAs formation process in the rumen of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, 2020.

ZHANG, T. et al. Responsive changes of rumen microbiome and metabolome in dairy cows with different susceptibility to subacute ruminal acidosis. **Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)**, v. 8, n. 1, p. 331-340, 2022.

ZHANG, X. et al. Effect of isopropyl ester of hydroxy analogue of methionine on Rumen microbiome, active enzymes, and protein metabolism pathways of yak. **Fermentation**, v. 10, n. 2, p. 94, 2024.

ZHAO, C. et al. Inflammatory mechanism of Rumenitis in dairy cows with subacute ruminal acidosis. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 135, 2018.

ZHOU, Y. et al. Methionine and valine activate the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway through heterodimeric amino acid taste receptor

(TAS1R1/TAS1R3) and intracellular Ca²⁺ in bovine mammary epithelial cells. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 12, p. 11354-11363, 2018.

ZHOU, Z. et al. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 11, p. 8716-8732, 2016.

Anexos

Anexo A- Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº 52/2021/CEEA/REITORIA PROCESSO Nº 23110.013784/2021-27

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Influência da suplementação com diferentes tamponantes no ambiente ruminal, perfil comportamental, desempenho zootécnico e produtividade de ruminantes”**, registrada com o nº 23110.013784/2021-27, sob a responsabilidade de **Márcio Nunes Corrêa** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **11 de junho de 2021**.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da autorização	18/06/2021 a 30/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Holandês
Nº de animais	54
Idade	Adultos lactantes
Sexo	Fêmeas

Origem	Fazenda comercial localizada no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul.
--------	---

Código para cadastro nº **CEEA 13784-2021**

Parecer 52 (1335718) SEI 23110.013784/2021-27 / pg. 1

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**,
Médico Veterinário, em 18/06/2021, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com



fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador
1335718 e o código CRC A0D1CDB5. Referência: Processo nº 23110.013784/2021-27 SEI nº 1335718
Parecer 52 (1335718) SEI

Anexo B- Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº 141/2024/CEUA/REITORIA PROCESSO Nº 23110.011543/2024-96

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação da degradabilidade ruminal in situ de metionina e colina rúmen protegidas em bovinos”**, registrada com o nº **23110.011543/2024-96**, sob a responsabilidade de **Marcio Nunes Corrêa** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da Autorização	Início: 21/10/2024 Término: 01/10/2026
Espécie/linhagem/raça	Bos taurus / Mestiços (Angus X Holandês)
Nº de animais	4
Idade	6 meses
Sexo	Machos

Origem	Granjas 4 Irmãos S.A. - BR-471, 68 - Zona Rural, Rio Grande - RS, sobre as coordenadas geográficas 32 ° 16 'S, 52 ° 32' O.
--------	--

Código para cadastro nº **CEUA 011543/2024-96**

Parecer 141 (2796046) SEI 23110.011543/2024-96 / pg. 1

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA

Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2024, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0

, informando o código verificador **2796046** e o código CRC **9E696127**.

Referência: Processo nº 23110.011543/2024-96 SEI nº 2796046 Parecer 141 (2796046) SEI