

LAYS DÉBORA SILVA MARIZ

**DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DOS AMINOÁCIDOS E UTILIZAÇÃO DE <sup>15</sup>N E BASES PURINAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM ZEBUÍNOS PUROS E CRUZADOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Viçosa  
Minas Gerais – Brasil  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M343d  
2016

Mariz, Lays Débora Silva, 1987-  
Digestibilidade intestinal dos aminoácidos e utilização de  
15N e bases purinas para a quantificação da síntese da proteína  
microbiana em zebuínos puros e cruzados alimentados com  
diferentes níveis dietéticos de proteína bruta / Lays Débora Silva  
Mariz. – Viçosa, MG, 2016.  
72f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Nutrição animal. 2. Bovino de corte. 3. Proteína bruta na  
nutrição animal. 4. Aminoácidos na nutrição animal.  
5. Digestibilidade. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em  
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0852

LAYS DÉBORA SILVA MARIZ

DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DOS AMINOÁCIDOS E UTILIZAÇÃO DE  $^{15}\text{N}$  E BASES PURINAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM ZEBUÍNOS PUROS E CRUZADOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 11 de março de 2016.

---

Márcio de Souza Duarte  
(Coorientador)

---

Marcos Inácio Marcondes  
(Coorientador)

---

Antonio Pinheiro Faciola

---

Stefanie Alvarenga Santos

---

Sebastião de Campos Valadares Filho  
(Orientador)

## **DEDICO**

À minha mãe Silvana e à minha irmã Emanuely.

Aos meus sobrinhos, Felipe e Raíssa.

E em memória de meu pai César e avô Bastião.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, família e amigos.

À minha mãe Silvana e à minha irmã Manu, por serem meu exemplo de vida. Obrigada pelo apoio de todos os dias. Sem vocês esse sonho seria impossível.

Aos meus sobrinhos Felipe e Raíssa, pelo amor que sinto por vocês.

À Palominha, pelos grandes momentos e eternos dias de experimento que passamos juntas. Obrigada pela sua amizade, carinho e por ser meu carminha.

Ao professor Sebastião, pelos ensinamentos e por me proporcionar esta grande oportunidade.

À Stefanie, pela nossa amizade, paciência, conselhos e pelas inúmeras estatísticas rodadas. Obrigada pela grande contribuição neste trabalho e no meu crescimento profissional.

Ao Antonio Faciola, pelos conselhos e pelas palavras de incentivo, paciência e pela grande experiência em Nevada.

Ao CNPq, Fapemig, CAPES e INCT de Ciência Animal pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de estudos.

Aos participantes da banca pelas sugestões e críticas, e ao professor Marcos Marcondes pela coorientação e grande contribuição neste trabalho.

Às amigas Aline e Eduarda, pelos anos de Viçosa e amizade que prevalecerá para sempre.

À Lorryny, Eduardim (brodi), Beth e Pedrão, pelos momentos em Nevada e por nossa amizade.

À Lauret, pela presença (mesmo de longe), carinho e pela ajuda no dias apertados do experimento.

Ao Gustavo, pelos momentos, pelo carinho e grande companhia.

À família das formigas: Lyvian, Danilo, Jarbinha, Marcelo Grossi, Tio Jojo e Zezé.

À todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial à Fernadinha.

Obrigada à todos que contribuíram diariamente com esse trabalho no campo: Pedro, Marquinhos, Jessiquinha, Maysinha, Letícia (Letlet), Ana, Flavão, Jayminho, Lucas, Luciano, Breno, Letícia, Pum e Niel.

“Se tens fé, cumpre saberes que tudo é possível aquele que a tem.”

## **BIOGRAFIA**

Lays Débora Silva Mariz, filha de Jadir César Mariz e Silvana Consuelo de Cássia Silva Mariz, nasceu em Curvelo, Minas Gerais, 26 de fevereiro de 1987.

Em 2006, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso de graduação em julho de 2010.

Iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, em agosto de 2010, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes e Produção de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de agosto de 2012.

Em setembro de 2012, iniciou o curso de doutorado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes e Produção de Ruminantes, com período sandwich na Universidade de Nevada nos Estados Unidos, submetendo-se à defesa de tese em 11 de março de 2016.

## ÍNDICE

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	6
<b>CAPÍTULO 1 - Digestibilidade verdadeira de aminoácidos em bovinos Nelore e cruzados alimentados com diferentes níveis dietéticos de proteína bruta</b>	
Resumo .....	9
Abstract .....	11
Introdução .....	13
Material e Métodos .....	14
Resultados e Discussão .....	22
Conclusão .....	42
Referências Bibliográficas .....	43
<b>CAPÍTULO 2 - Utilização de <sup>15</sup>N e bases purinas para a quantificação da síntese microbiana e digestibilidade intestinal da proteína bruta microbiana de zebuínos</b>	
Resumo .....	48
Abstract .....	50
Introdução .....	52
Material e Métodos .....	53
Resultados e Discussão .....	60
Conclusão .....	69
Referências Bibliográficas .....	70

## RESUMO

MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Digestibilidade intestinal dos aminoácidos e utilização de  $^{15}\text{N}$  e bases purinas para a quantificação da síntese da proteína microbiana em zebuínos puros e cruzados alimentados com diferentes níveis dietéticos de proteína bruta.** Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Coorientadores: Márcio de Souza Duarte e Marcos Inácio Marcondes

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta (PB) sobre o consumo, os locais de digestão dos constituintes da dieta, a excreção dos compostos nitrogenados e a absorção de aminoácidos no intestino delgado de bovinos de corte. Objetivou-se também, quantificar a síntese de PB microbiana utilizando  $^{15}\text{N}$  e BP e avaliar a digestibilidade intestinal verdadeira PB total e da PB microbiana em bovinos de corte alimentados com três níveis dietéticos de PB. Oito bovinos, sendo quatro Nelore (com peso corporal (PC) médio inicial de  $241,3 \pm 43\text{Kg}$  e 14 meses de idade) e quatro cruzados Angus x Nelore (com PC médio inicial  $263,4 \pm 47\text{Kg}$  e 14 meses de idade), canulados no rúmen e no íleo, foram distribuídos em dois quadrados latinos  $4 \times 4$  sendo um para cada grupo genético. O experimento foi conduzido em quatro períodos de 17 dias, sendo 10 dias de adaptação e sete dias de amostragens. As quatro dietas foram constituídas de níveis crescentes de PB: 10; 12 ou 14% oferecidas à vontade, e dieta de consumo restrito com 12% PB. As dietas foram constituídas de 50% de silagem de milho e 50% de concentrado com base na MS. Uma coleta total de fezes e urina de cada animal foi realizada durante três dias consecutivos. Posteriormente, oito coletas de digesta omasal e ileal foram realizadas em intervalos de nove horas durante três dias. Para calcular os fluxos da digesta omasal e ileal, utilizou-se o sistema de indicador duplo (Co-EDTA e FDNi) e único (FDNi), respectivamente. Para quantificar a síntese microbiana, foi realizada uma infusão contínua de 7,03 g de sulfato de amônio enriquecido com 10% de átomos de  $^{15}\text{N}$  no rúmen de cada animal, em todos os períodos experimentais. As quantidades de aminoácidos (AA) absorvidas foram calculadas pela diferença do fluxo dos AA presentes no omaso e no íleo. O consumo de MS (g/Kg de PC) não foi afetado ( $P > 0,05$ ) pelos grupos genéticos e níveis dietéticos de PB. De maneira geral, as digestibilidades aparentes parciais e totais dos nutrientes não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre grupos genéticos. As digestibilidades aparentes ruminais (%) da MS, MO, EE e CNF não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelos níveis dietéticos de PB. Os consumos e as

digestibilidade totais da PB aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) com os níveis dietéticos de PB. As equações obtidas entre as excreções de N total (ENT), urinário (ENU) e fecal (ENF) com o N ingerido (NI) e o consumo de NDT foram:  $ENU = 23,213 + 0,716 NI - 16,390 NDT$ ,  $r^2 = 0,75$ ;  $ENF = 0,438 + 0,092 NI + 4,631 NDT$ ,  $r^2 = 0,84$  e  $ENT = 23,653 + 0,809 NI - 11,756 NDT$ ,  $r^2 = 0,90$ . Houve efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) sobre as quantidades dos AA absorvidos no intestino delgado em resposta aos níveis crescentes de PB. As digestibilidades verdadeiras estimadas dos AA essenciais, não essenciais e totais foram 77; 74,4 e 75,5%, respectivamente. As relações  $^{15}N:^{14}N$  nas bactérias associadas à fase líquida (BAL) e à fase sólida (BAP) isoladas no omaso foram similares ( $P > 0,05$ ). Houve efeito linear negativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre a relação  $^{15}N:^{14}N$  das bactérias isoladas no omaso. A síntese de PB microbiana foi maior ( $P < 0,05$ ) para animais cruzados em relação ao Nelore. Houve efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) para a síntese de PB microbiana em resposta aos níveis crescentes de PB. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre  $^{15}N$  e bases purinas (BP) para a eficiência microbiana. A digestibilidade da PB microbiana estimada com BP e  $^{15}N$  foi próxima ao valor de 80% reportado pelo NRC e BR Corte. A digestibilidade verdadeira da PB total estimada foi de 75,4%. Os resultados indicam que os aumentos dos níveis dietéticos de PB podem potencialmente aumentar as excreções de N pelos bovinos de corte e que as digestibilidades verdadeiras dos aminoácidos são condizentes com o valor adotado pelo NRC e BR Corte. Conclui-se também que, as BP podem ser utilizadas como indicador microbiano alternativo ao  $^{15}N$  e que a digestibilidade intestinal da PB microbiana no intestino delgado é de aproximadamente 80% em zebuínos.

## ABSTRACT

MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Intestinal digestibility of amino acids and use of  $^{15}\text{N}$  and purine bases for quantification of microbial protein synthesis in purebred and crossbred zebu cattle fed different dietary crude protein levels.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Co-advisers: Márcio de Souza Duarte and Marcos Inácio Marcondes

The objective of this study was to evaluate the effect of genetic groups and dietary crude levels (CP) on intake, the site of dietary constituents digestion, nitrogen excretion and absorption of amino acids from the small intestine of beef cattle. Additionally, the objective was to quantify the microbial protein synthesis using  $^{15}\text{N}$  and purine bases (BP) and to evaluate the true intestinal digestibility of total protein and microbial protein of beef cattle fed three dietary CP levels. Eight animals, being four Nellore ( $241 \pm 43$  kg of initial BW; 14 months) and four crossed Angus x Nellore ( $263 \pm 47$  kg of initial BW; 14 months), with ruminal and ileum cannulas were distributed into two  $4 \times 4$  Latin squares, one for each genetic group. Four experimental periods lasting 17 d each were completed with 10 d for adaptation and 7 d for sampling. The diets had increasing levels of CP: 10, 12, or 14%, offered ad libitum, and a 12% CP fed at maintenance level. The diets contained 50% corn silage and 40% concentrate (on a dry matter (DM) basis). Total fecal and urine collection of each animal was performed for three consecutive days. A total of eight digesta samples were collected from the omasum and ileum at 9h intervals over a 3 d period. The double (Co-EDTA and NDFi) and single marker systems (NDFi) were used to calculate the digesta flow of the omasum and ileum, respectively. Continuous infusion of 7.03 g of ammonium sulfate enriched with 10 atom%  $^{15}\text{N}$  was included in the rumen for each animal in all experimental periods. The quantities of absorbed amino acids (AA) were calculated by AA flow difference in the omasum and ileum. The DM intake ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was not affected ( $P > 0.05$ ) by genetic groups or dietary CP levels. In general, the partial and total apparent digestibility of nutrients did not differ ( $P > 0.05$ ) between genetic groups. The apparent ruminal digestibility (%) of DM, OM, EE, and NFC were not affected ( $P > 0.05$ ) by dietary CP levels. The intake and total digestibility of CP increased linearly ( $P < 0.05$ ) with dietary CP levels. The equations between the N urinary excretion (NUE), N fecal excretion (NFE) and total N excretion (TNE) with N intake (NI) and the intake of TDN were:  $\text{NUE} = 23.213 + 0.716 \text{ NI} - 16.390 \text{ NDT}$ ;  $\text{NFE} = 0.438 + 0.092 + 4.631 \text{ NI NDT}$  and  $\text{TNE} = 23.653 + 0.809 \text{ NI} - 11,756 \text{ NDT}$ . There was a positive linear effect

( $P < 0.05$ ) on quantities of absorbed AA from small intestine in response to increasing CP level. The true digestibility of essential AA, nonessential AA and total AA were 77, 74.4 and 75.5%; respectively. The  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  ratio was similar ( $P > 0.05$ ) between liquid - (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria isolated in the omasum. There was a negative linear effect ( $P < 0.05$ ) of dietary CP levels on the  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  ratio in isolated bacteria in the omasum. The crossbred animals had a greater microbial protein synthesis ( $P < 0.05$ ) than Nellore. There was a positive linear effect ( $P < 0.05$ ) of microbial protein synthesis in response to increasing CP levels. There was no difference ( $P > 0.05$ ) between  $^{15}\text{N}$  and purine bases (BP) for microbial efficiency. The digestibility of microbial CP estimated by BP and  $^{15}\text{N}$  was close to the value of 80% reported by the NRC and BR Corte. The total true digestibility of CP estimated was 75.4%. The results indicate that increasing dietary CP levels may potentially increase N excretion by beef cattle and that the true amino acid digestibility values are consistent with the values adopted by the NRC and BR Corte. Additionally, we conclude that BP can be used as an alternative microbial indicator to  $^{15}\text{N}$  and intestinal digestibility of microbial protein from small intestine is about 80% in Zebu cattle.

## Introdução Geral

A busca por estratégias que resultam em aumentos na eficiência dos sistemas de produção de bovinos de corte no Brasil, tem incrementado o interesse pela utilização de animais mestiços *Bos taurus* x *Bos indicus* (Euclides Filho et al., 2001). A utilização de animais mestiços cria a oportunidade de exploração das características desejadas de ambos grupos genéticos, além de um possível incremento na produtividade, mesmo com menor adaptabilidade em relação às raças zebuínas puras (Marcondes et al., 2011). Estudos em condições tropicais, tem demonstrado que existem diferenças na utilização dos alimentos e nas respostas produtivas entre os grupos genéticos, sendo que maiores desempenhos tem sido observados nos animais cruzados em relação aos zebuínos (Euclides Filho et al., 2001; Marcondes et al., 2011).

As diferentes respostas produtivas dos animais, podem ser explicadas através do entendimento da cinética da digestão dos nutrientes nos diferentes locais do trato gastrintestinal, e da disponibilidade dos nutrientes para absorção no intestino delgado para que possam ser convertidos em produto animal. O rúmen tem papel definitivo na eficiência de utilização da dieta, na síntese de nutrientes, assim como nos produtos de excreção fecal e urinária (Sauvant e Van Milgen, 1995). Portanto, a disponibilidade e a extensão do uso dos nutrientes neste local, são essenciais para garantir eficiente produtividade (Franzolin e Alves, 2010).

A contribuição da produção de bovinos de corte nas emissões de amônia para o ambiente é vista como importante questão ambiental. Os bovinos de corte apresentam baixa eficiência de utilização do nitrogênio (N), sendo que em média apenas 20 a 30% do N dietético é convertido em produto animal, com a maior parte sendo excretada nas fezes ou urina (Wessels e Titgemeyer, 1997). As excreções de compostos nitrogenados pelos ruminantes afetam as emissões de amônia no ambiente. Enquanto que a uréia

urinária é rapidamente hidrolisada, a produção de amônia fecal geralmente é baixa devido à lenta taxa de mineralização dos compostos orgânicos nitrogenados (Muck e Steenuis, 1982), isso demonstra que N urinário é mais volátil em relação ao N fecal (Todd et al., 2013). Portanto os fatores que aumentam as excreções de N urinário podem aumentar as emissões de amônia (Erickson et al., 2001).

Devido às implicações ambientais geradas pelas emissões de amônia, tem aumentado o interesse por estudos que avaliem a relação entre a nutrição de bovinos de corte com as excreções de N. A partição da excreção de N nas fezes e urina é dependente da dieta e tem sido reportados aumentos nas excreções dos compostos nitrogenados com níveis crescentes de PB nas dietas de bovinos de corte (Waldrip et al., 2013). Cole et al. (2005) e Todd et al. (2006) demonstraram que as perdas de N na urina foram de 24 a 50% maiores em animais que recebiam dieta com 13% de PB comparados aos animais consumindo 11,5% de PB na dieta.

Os modelos de nutrição de bovinos de corte, consideram que as exigências dietéticas de proteína metabolizável (PM) para ruminantes são atendidas mediante a absorção dos aminoácidos no intestino delgado oriundos proteína bruta (PB) microbiana e da proteína dietética não degradada no rúmen (PNDR) digestível (Valadares Filho et al., 2010). Portanto, aumentos nas eficiências produtivas dos animais podem ser obtidas por estratégias dietéticas que maximizem as quantidades de aminoácidos que chegam no intestino delgado.

A quantidade de aminoácidos absorvidos para manutenção da produção animal, são dependentes dos fluxos e das digestibilidade intestinais das frações protéicas no intestino delgado (Calsamiglia et al., 1995). Alguns estudos demonstram que os fluxos das frações nitrogenadas para o intestino delgado podem ser maximizados em resposta à níveis crescentes de PB nas dietas (Colmero et al., 2006; Cunningham et al., 1996),.

porém ressalta-se que o excesso de nitrogênio nas dietas incrementam as excreções de N pelo animal.

Em condições tropicais, dados recentemente publicados tem demonstrado uma utilização em excesso de PB nas dietas para bovinos. Isso pode ser verificado ao comparar os consumos de PB observados nos experimentos, com os consumos de PB preditos pelo sistema de exigências de zebuínos puros e cruzados do Brasil (BR-Corte) descrito por (Valadares et al., 2010). Amaral et al. (2014), trabalhando com bovinos cruzados em terminação também encontraram valores superiores (17%) para os consumos de PB preditos pelo BR Corte em relação aos consumos observados. Prados (2012), trabalhando com bovinos cruzados em crescimento, observou que os valores estimados para os consumos de PB (1020 g/dia) foram, em média, 17,2% superiores valores observados para consumo de PB neste experimento (870 g/dia). Estes resultados indicam que os sistema de proteína metabolizável necessita de novos ajustes.

Uma possível explicação à necessidade de ajustes pode ser atribuída aos valores adotados pelo sistema para estimar a proteína metabolizável. A estimativa da digestibilidade da fração proteica que chega no intestino delgado é essencial elemento do sistema de PM. O BR Corte considera que a PB microbiana e a PNDR apresentam um valor constante de digestibilidade de 80%, similar ao proposto pelo sistema americano NRC (2000) que tem como base a utilização de raças taurinas. Porém, antigos relatos publicados na literatura internacional indicam que existem variações nos valores de digestibilidade dos aminoácidos individuais que alcançam o intestino delgado (Tas et al., 1981; Storm et al., 1983), mas estes dados são ainda limitados e podem não ser representativos das características dos animais e dietas nos trópicos.

Portanto, para que o sistema de PM seja aprimorado, é necessário que os valores de digestibilidade dos aminoácidos estejam bem estabelecidos, demonstrando a

necessidade de confirmação do valor de 80% adotado pelos sistemas. Ressalta-se que apesar da raça Nelore ser a mais difundida no Brasil, na literatura consultada não há informações sobre a digestibilidade individual dos aminoácidos para essa raça.

Além disso, sendo as exigências dos ruminantes de aminoácidos, o conhecimento dos valores de digestibilidade dos aminoácidos permitirá que no futuro sejam desenvolvidos sistemas que expressem os requerimentos de bovinos de corte em termos de aminoácidos ao invés de proteína metabolizável.

A quantificação da síntese microbiana no rúmen é de grande importância para a nutrição de ruminantes (Broderick e Merchen, 1992). A PB microbiana representa a principal fonte de aminoácidos metabolizáveis para os ruminantes (Fonseca et al., 2014), sendo considerada de alta qualidade devido ao seu perfil de aminoácidos e digestibilidade intestinal em torno de 80% (NRC, 2000).

Os indicadores microbianos,  $^{15}\text{N}$  e bases purinas (BP) têm sido amplamente utilizados para estimar a produção de proteína microbiana (Rota et al., 2014). Os estudos envolvendo os fatores que afetam a síntese e eficiência microbiana necessitam de mensurações acuradas da produção microbiana (Reynal et al., 2005), porém nenhum indicador tem sido considerado completamente satisfatório (Broderick e Merchen, 1992).

Alguns estudos demonstram similaridade nas estimativas obtidas com  $^{15}\text{N}$  e BP (Calsamiglia et al., 1996; Reynal et al., 2005). Apesar de bem estabelecido o uso de  $^{15}\text{N}$ , o alto custo da técnica e a necessidade de utilização de equipamentos mais sofisticados, tornam o uso de BP uma alternativa promissora ao  $^{15}\text{N}$ .

É importante ressaltar que existe uma inconsistência nos dados da literatura comparando  $^{15}\text{N}$  e BP (Carro e Miller., 2002), sendo também reportadas estimativas superiores (Firkins et al., 1987) e inferiores (Carro e Miller, 2002) com o uso de  $^{15}\text{N}$  em

comparação às BP. As peculiaridades de cada técnica, assim como os procedimentos de análises nos quais resultam em incompleta degradação de purinas nos diferentes alimentos (Broderick e Merchen, 1992), perdas durante os procedimentos no isolamento (Carro e Miller, 2002), diferenças nas relação N-indicador : N-microbiano (Calsamiglia et al., 1996) dentre outros, explicam as variações das estimativas observadas entre os marcadores microbianos.

As comparações entre indicadores se tornam importantes como forma de se estabelecer alternativas viáveis para a quantificação da síntese proteica permitindo assim, a ampliação de estudos que avaliem adequadamente os valores propostos pelos sistemas de proteína metabolizável estabelecidos sob condições tropicais.

Diante do que foi exposto, os principais objetivos deste estudo foram:

- 1- Avaliar o efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de PB sobre o consumo, os locais de digestão dos constituintes da dieta e as excreções dos compostos nitrogenados e também a absorção verdadeira dos aminoácidos individuais e totais no intestino delgado de bovinos.
- 2- Quantificar a síntese de PB microbiana, utilizando  $^{15}\text{N}$  e BP e avaliar a digestibilidade intestinal verdadeira PB total e da PB microbiana em zebuínos puros (Nelore) e cruzados (Angus x Nelore) alimentados com três níveis dietéticos de PB.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amaral, P. M., S. C. Valadares Filho, E. Detmann, S. A. Santos, L. F. Prados, L. D. S. Mariz, L. C. Alves, A. C. B. Menezes, F. A. C. Villadiego, M. A. S. Novaes, and F. A. S. Silva. 2014. Effect of phase-feeding crude protein on performance and

- carcass characteristics of crossbred beef bulls: an application to reduce nitrogen compounds in beef cattle diets. *Tropical Animal Health Production* 46: 419-426.
- Broderick, G. A., and N. R. Merchen. 1992. Markers for Quantifying Microbial Protein Synthesis in the Rumen<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 75: 2618-2632.
- Calsamiglia, S., and M. D. Stern. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal Animal Science* 73: 1459-1465.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *Journal Animal Science* 74: 1375-1381.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Animal Science Glasgow* 75: 315-322.
- Cole, N. A., R. N. Clark, R. W. Todd, C. R. Richardson, A. Gueye, L. W. Greene, and K. McBride. 2005. Influence of dietary crude protein concentration and source on potential ammonia emissions from beef cattle manure<sup>123</sup>. *Journal of Animal Science* 83.
- Colmenero, J. J. O., and G. A. Broderick. 2006. Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Ruminant Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 89: 1694-1703.
- Cunningham, K. D., M. J. Cecava, T. R. Johnson, and P. A. Ludden. 1996. Influence of Source and Amount of Dietary Protein on Milk Yield by Cows in Early Lactation<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 79: 620-630.
- Erickson, G. E., and T. J. Klopfenstein. 2001. Managing N inputs and the effect on losses following excretion in open-dirt feedlots in Nebraska. *The Science World Journal*. 2:830–835.
- Euclides Filho, K., V. P. B. Euclides, G. R. d. Figueiredo, and R. A. Barbosa. 2001. Eficiência bionutricional de animais Nelore e seus mestiços com Simental e Aberdeen Angus, em duas dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 77-82.
- Firkins, J. L., S. M. Lewis, L. Montgomery, L. L. Berger, N. R. Merchen, and G. C. J. Fahey. 1987. Effects of feed intake and dietary urea concentration on ruminal dilution rate and efficiency of bacterial growth in steers. *Journal Dairy Science* 70:2312–2321.

- Fonseca, A. C., S. M. Fredin, L. F. Ferraretto, C. M. Parsons, P. L. Utterback, and R. D. Shaver. 2014. Short communication: Intestinal digestibility of amino acids in fluid- and particle-associated rumen bacteria determined using a precision-fed cecectomized rooster bioassay. *Journal of Dairy Science* 97: 3855-3859.
- Franzolin, R., and T. C. Alves. 2010. The Ruminant Physiology in Buffalo Compared with Cattle. *Revista Veterinaria* 21.
- Marcondes, M. I., S. C. Valadares Filho, I. M. Oliveira, P. V. R. Paulino, R. F. D. Valadares and E. Detmann. 2011. Eficiência alimentar de bovinos puros e mestiços recebendo alto ou baixo nível de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 1313-1324.
- Muck, R., and T. Steenhuis. 1982. Nitrogen losses from manure storages. *Agricultural wastes* 4: 41-54.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Prados, L. F. 2012. Desempenho e exigências nutricionais de bovinos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Reynal, S. M., G. A. Broderick, and C. Bearzi. 2005. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 4065-4082.
- Rotta, P. P., S. C. Valadares Filho, L. F. Costa e Silva, E. Detmann, F. A. C. Villadiego, T. E. Engle, R. F. D. Valadares, B.C. Silva, M. V. C. Pacheco, and D. Zanetti. 2014. Comparison of purine bases and <sup>15</sup>N for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu cross breed bulls. *Livestock Science* 167: 144-153.
- Sauvant, D., and J. Van Milgen. 1995. Dynamic aspects of carbohydrate and protein breakdown and the associated microbial matter synthesis. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology*, Willingen, Hesse, Germany. p 71-91.
- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. *British Journal of Nutrition* 50: 463-470.
- Tas, M. V., R. A. Evans, and R. F. E. Axford. 1981. The digestibility of amino acids in the small intestine of the sheep. *British Journal of Nutrition* 45: 167-174.

- Todd, R. W., N. A. Cole, and R. N. Clark. 2006. Reducing crude protein in beef cattle diet reduces ammonia emissions from artificial feedyard surfaces. *Journal of environmental quality* 35: 404-411.
- Todd, R. W., N. A. Cole, H. M. Waldrip, and R. M. Aiken. 2013. Arrhenius equation for modeling feedyard ammonia emissions using temperature and diet crude protein. *Journal of Environmental Quality* 42: 666-671.
- Valadares Filho, S. C., M. I. Marcondes, M. L. Chizzotti, and P. V. R. Paulino. 2010. Nutrient requirements of zebu beef cattle - BR-CORTE. Suprema Gráfica e Editora, Viçosa-MG.
- Waldrip, H. M., R. W. Todd, and N. A. Cole. 2013. Prediction of nitrogen excretion by beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Animal Science* 91: 123.
- Wessels, R. H., and E. C. Titgemeyer. 1997. Protein requirements of growing steers limit-fed corn-based diets. *Journal of Animal Science* 75: 3278-3286.

## **CAPÍTULO 1**

### **RESUMO**

MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Digestibilidade verdadeira de aminoácidos no intestino delgado de bovinos Nelore e cruzados alimentados com diferentes níveis dietéticos de proteína bruta.** Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Coorientadores: Márcio de Souza Duarte e Marcos Inácio Marcondes

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta (PB) sobre o consumo, os locais de digestão dos constituintes da dieta e a excreção dos compostos nitrogenados e também a absorção de aminoácidos no intestino delgado de bovinos. Oito bovinos, sendo quatro Nelore (com peso corporal (PC) médio inicial de 241,3±43Kg e 14 meses de idade) e quatro cruzados Angus x Nelore (com PC médio inicial 263,4±47 Kg e 14 meses de idade), canulados no rúmen e íleo, foram distribuídos em dois quadrados latinos 4 x 4 sendo um para cada grupo genético. O experimento foi conduzido em quatro períodos de 17 dias, sendo 10 dias de adaptação e sete dias de amostragens. As quatro dietas foram constituídas de níveis crescentes de PB: 10; 12 ou 14% oferecidas à vontade, e dieta de consumo restrito com 12% PB. As dietas foram constituídas de 50% de silagem de milho e 50% de concentrado com base na MS. Uma coleta total de fezes e urina de cada animal foi realizada durante três dias consecutivos. Posteriormente, oito coletas de digesta omasal e ileal foram realizadas em intervalos de nove horas durante três dias. Para calcular os fluxos da digesta omasal e ileal, utilizou-se o sistema de indicador duplo (Co-EDTA e FDNi) e único (FDNi), respectivamente. As quantidades de aminoácidos (AA) absorvidas foram calculadas pela diferença do fluxo dos AA presentes no omaso e no íleo. Quando o consumo de matéria seca (MS) foi expresso em g/Kg de PC, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos genéticos e níveis dietéticos de PB. De maneira geral, as digestibilidades aparentes parciais e totais dos nutrientes não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre grupos genéticos. As digestibilidades aparentes ruminais (%) da MS, MO, EE e CNF não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelos níveis dietéticos de PB. Os consumos e as digestibilidade totais da PB aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) com os níveis dietéticos de PB. As equações obtidas entre as excreções de N total (ENT), urinário (ENU) e fecal (ENF) com o N ingerido (NI) e o consumo de NDT foram:  $ENU = 23,213 + 0,716 NI - 16,390 NDT$ ,  $r^2 = 0,75$ ;  $ENF = 0,438 + 0,092 NI + 4,631 NDT$ ,  $r^2 = 0,84$  e  $ENT = 23,653 + 0,809 NI - 11,756 NDT$ ,  $r^2 = 0,90$ . Houve efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) sobre as quantidades dos AA absorvidos no intestino delgado em resposta aos níveis crescentes de PB. As digestibilidades verdadeiras estimadas dos AA essenciais, não essenciais e totais foram 77; 74,4 e 75,5% respectivamente. Os resultados indicam que os aumentos dos níveis dietéticos de PB podem potencialmente aumentar as

excreções de N pelos bovinos de corte e que as digestibilidades verdadeiras dos aminoácidos são condizentes com o valor adotado pelo NRC e BR Corte.

#### **ABSTRACT**

MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **True amino acid intestinal digestibility in Nellore and crossbred cattle fed different dietary crude protein levels.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Co-advisers: Márcio de Souza Duarte and Marcos Inácio Marcondes

The objective of this study was to evaluate the effect of genetic groups and dietary crude levels (CP) on intake, the site of dietary constituents digestion, nitrogen excretion and absorption of amino acids from the small intestine of beef cattle. Eight animals, being four Nellore (241±43 kg of initial BW; 14 months) and four crossed Angus x Nellore (263±47 kg of initial BW; 14 months), with ruminal and ileum cannulas were distributed into two 4 x 4 Latin squares, one for each genetic group. Four experimental periods lasting 17 d each were completed with 10 d for adaptation and 7 d for sampling. The diets had increasing levels of CP: 10, 12, or 14%, offered ad libitum, and a 12% CP fed at maintenance level. The diets contained 50% corn silage and 40% concentrate (on a dry matter (DM) basis). Total fecal and urine collection of each animal was performed for three consecutive days. A total of eight digesta samples were collected from the omasum and ileum at 9h intervals over a 3 d period. The double (Co-EDTA and NDFi) and single marker systems (NDFi) were used to calculate the digesta flow of the omasum and ileum, respectively. The quantities of absorbed amino acids (AA) were calculated by AA flow difference in the omasum and ileum. The DM intake ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was not affected ( $P > 0.05$ ) by genetic groups or dietary CP levels. In general, the partial and total apparent digestibility of nutrients did not differ ( $P > 0.05$ ) between genetic groups. The apparent ruminal digestibility (%) of DM, OM, EE, and NFC were not affected ( $P > 0.05$ ) by dietary CP levels. The intake and total digestibility of CP increased linearly ( $P < 0.05$ ) with dietary CP levels. The equations between the N urinary excretion (NUE), N fecal excretion (NFE) and total N excretion (TNE) with N intake (NI) and the intake of TDN were:  $\text{NUE} = 23.213 + 0.716 \text{ NI} - 16.390 \text{ NDT}$ ;  $\text{NFE} = 0.438 + 0.092 + 4.631 \text{ NI NDT}$  and  $\text{TNE} = 23.653 + 0.809 \text{ NI} - 11,756 \text{ NDT}$ . There was a positive linear effect ( $P < 0.05$ ) on quantities of absorbed AA from small intestine in response to increasing CP level. The true digestibility of essential AA, nonessential AA and total AA were 77, 74.4 and 75.5%; respectively. The results indicate that increasing dietary CP levels may potentially increase N excretion by beef cattle and that the true amino acid digestibility values are consistent with the values adopted by the NRC and BR Corte.

## **1.Introdução**

O cruzamento de raças taurinas e zebuínas representa uma oportunidade de combinar os atributos favoráveis de ambas as raças. Estudos em regiões tropicais tem demonstrado que existem diferenças na utilização dos alimentos e superioridade no desempenho dos animais cruzados em relação aos zebuínos (Euclides Filho et al., 2001;

Marcondes et al., 2011). Os estudos de digestão são relevantes, pois o entendimento da disponibilidade e extensão do uso dos nutrientes nos diferentes locais do trato gastrintestinal permitem explicar as diferenças nas respostas produtivas entre os grupos genéticos.

A dieta influencia as quantidades de N excretadas através das fezes ou urina, sendo que os aumentos nos consumos da proteína bruta (PB) dietética proporcionam aumentos nas excreções de N, principalmente pela rota urinária (Waldrup et al., 2013). A rápida hidrólização da uréia urinária no ambiente demonstra que as concentrações de N das dietas influenciam potencialmente as emissões de amônia e assim, o uso adequado de níveis dietéticos de PB implicam não somente em melhorias na eficiência de utilização através da redução dos nutrientes excretados, mas também em menor impacto ambiental.

As exigências dietéticas de proteína metabolizável (PM) para ruminantes são atendidas mediante a absorção no intestino delgado dos aminoácidos oriundos da PB microbiana e da proteína dietética não degradada no rúmen (PNDR) digestível (Valadares Filho et al., 2010). A estimativa da digestibilidade da fração proteica que chega no intestino delgado é essencial elemento do sistema de PM. O sistema de exigências de zebuínos puros e cruzados do Brasil - BR Corte (Valadares et al., 2010), considera que a PB microbiana e a PNDR apresentam um valor constante de digestibilidade de 80%, similar ao proposto pelo sistema americano NRC (2000). Na literatura internacional, antigos relatos indicam que existem variações nos valores de digestibilidade dos aminoácidos individuais que alcançam o intestino delgado (Tas et al., 1981; Storm et al., 1983), porém estes dados são ainda limitados e podem não ser representativos das características dos animais e dietas nos trópicos.

Portanto, para que o sistema de PM seja aprimorado, é necessário que os valores de digestibilidade dos aminoácidos estejam bem estabelecidos, demonstrando a necessidade de confirmação do valor de 80% adotado pelos sistemas. Ressalta-se que apesar da raça Nelore ser a mais difundida no Brasil, na literatura consultada não há informações sobre a digestibilidade individual dos aminoácidos para essa raça.

Diante do que foi exposto, a hipótese deste estudo é que o aumento nos níveis dietéticos de PB eleva as quantidades excretadas dos compostos nitrogenados pelos bovinos e que o valor de 80% usado para estimar a absorção verdadeira dos aminoácidos no intestino delgado pode não ser adequado para os animais e dietas nos trópicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de PB sobre o consumo, os locais de digestão dos constituintes da dieta e as excreções dos compostos nitrogenados e também a absorção verdadeira dos aminoácidos individuais e totais no intestino delgado de bovinos.

## **2. Material e Métodos**

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), protocolo número 06/2013. A técnica de fistulação ileal utilizada nos animais deste estudo, foi descrita por Leão e Coelho da Silva (1980).

### **2.1. Animais, delineamento experimental e dietas**

A pesquisa foi conduzida no Confinamento Experimental e no Laboratório de Nutrição de Ruminantes do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Oito bovinos, sendo quatro Nelore (com peso corporal (PC) médio inicial de

241,3±43Kg e 14 meses de idade) e quatro cruzados Angus x Nelore (com PC médio inicial 263,4±47 Kg e 14 meses de idade), canulados no rúmen e íleo, foram distribuídos em dois quadrados latinos 4 x 4 sendo um para cada grupo genético. O experimento foi conduzido em quatro períodos de 17 dias. Cada período foi constituído de 10 dias de adaptação dos animais às dietas experimentais e sete dias de amostragens. Os animais foram alojados em baias individuais (8m<sup>2</sup>), providas de comedouro e com livre acesso à água durante o experimento.

As quatro dietas experimentais foram constituídas de níveis crescentes de PB: 10; 12 ou 14% oferecidas à vontade, e uma dieta contendo 12% de PB ofertado em consumo restrito à 1,2% do PC. As dietas foram constituídas de 50% de silagem de milho (SM) e 50% de concentrado com base na matéria seca (MS). Para os animais em consumo voluntário, a quantidade total diária de silagem de milho foi fornecida às 7h00 com a metade da quantidade diária do concentrado, e a outra metade foi fornecida às 15h00 (Pazdiora et al., 2014; Zanetti, 2014). O consumo foi ajustado para manter as sobras entre 5 a 10% da quantidade oferecida. Os animais em manutenção receberam a alimentação uma vez ao dia, às 7h00.

As dietas experimentais foram formuladas com base no sistema de exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados (BR Corte) descrito por Valadares Filho et al. (2010). A proporção dos ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química e ingredientes das dietas

Item	Dieta (%PB)		
	10%	12%	14%
Ingrediente	% da MS		
Silagem de Milho	50,0	50,0	50,0
Milho Gão	39,7	39,6	39,6
Farelo de Trigo	5,9	3,0	0,0
Uréia/SA + Farelo de Soja <sup>1</sup>	2,2	5,3	8,3

Cloreto de sódio	0,5	0,5	0,5
Mistura mineral <sup>2</sup>	0,5	0,5	0,5
Bicarbonato de Sódio	0,8	0,8	0,8
Óxido de Magnésio	0,3	0,3	0,3
Composição química			
MO	95,4	94,9	94,4
PB	9,9	12,1	14,2
PDR	66,8	69,6	71,6
EE <sup>3</sup>	4,0	4,0	4,0
FDN <sub>cp</sub> <sup>4</sup>	31,4	30,7	29,9
CNF <sup>5</sup>	50,7	49,4	48,2

<sup>1</sup>Uréia/SA + Farelo de Soja = 83,3% de farelo de soja e 16,7% de uréia + sulfato de amônio. <sup>2</sup>Mistura mineral = 223 g/Kg de cálcio; 174 g/Kg de fósforo; 24 g/Kg de enxofre; 100 mg/Kg de cobalto; 1.250,0 mg/Kg de cobre; 1.795,0 mg/Kg de ferro; 90 mg/Kg de iodo; 2.000,0 mg/Kg de manganês; 15,00 mg/kg de selênio; 5.270,00 mg/kg de zinco e 1.740,00 mg/kg de flúor. <sup>3</sup>PDR = proteína degradável no rúmen, estimada de acordo com a tabela CQBAL 3.0; <sup>4</sup>EE = Extrato etéreo. <sup>5</sup>FDN<sub>cp</sub> = Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína. <sup>6</sup>CNF = Carboidratos não fibrosos.

## 2.2. Procedimentos experimentais e preparação das amostras de digesta omasal e ileal

A silagem de milho e as sobras, foram amostradas durante o período de coletas e submetidos à secagem parcial em estufa de ventilação forçada (55°C) por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas com peneiras de 2 e 1 mm (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA) e compostas (com base no peso seco) por animal para cada período. Os ingredientes que compuseram o concentrado foram amostrados diretamente dos silos da fábrica nos dias das misturas dos mesmos. Estas amostras foram armazenadas para posteriores análises laboratoriais.

Do 11° ao 13° dia de cada período experimental os animais foram submetidos à coleta total de fezes, que foram recolhidas diretamente do piso de concreto. Ao final de cada dia de coleta (24 horas) as fezes foram pesadas, homogeneizadas e uma amostra diária foi submetida à secagem parcial em estufa de ventilação forçada (55°C) por 72 horas e moída em moinho de facas com peneiras de 2 e 1 mm, respectivamente (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA). Posteriormente, foi feita uma amostra composta das fezes de cada animal por período, com base no peso seco de cada dia de coleta.

Para a avaliação do balanço dos compostos nitrogenados, foi realizada em cada período experimental, uma coleta total de urina de cada animal, durante as mesmas 72 horas da coleta total de fezes. Foram utilizados funis coletores acoplados à mangueiras, que conduziram a urina até recipientes plásticos contendo 200 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20%, para a conservação do N. Ao final de cada dia de coleta (24 horas) o volume urinário diário foi quantificado e foi armazenada uma amostra proporcional ao volume diário excretado de cada animal. Posteriormente foi feita uma amostra composta de urina por período para cada animal proporcional ao total excretado em cada dia. A amostra composta foi armazenada a -20°C para análise de N-total.

Para estimar o fluxo da digesta omasal foi utilizado o sistema de indicador duplo (France e Siddons, 1986), no qual foram utilizados os indicadores Co-EDTA associado às fases de líquida e pequenas partículas e a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) à fase de grandes partículas. Foram realizadas infusões contínuas do Co-EDTA (5,0 g/d de Co-EDTA ou 0,7 g de Co), diluídas em 2,7 L de água via fístula ruminal com o auxílio de duas bombas peristálticas (model BP-600.4; Milan Scientific Equipment, Inc., Colombo, Paraná, Brazil), a partir do 11º dia de cada período experimental até a última amostragem da digesta no dia 16. Para estimar o fluxo da MS ileal foi utilizado o FDNi como indicador do sistema único.

Um total de 8 coletas de digesta omasal e ileal foram obtidas do 14º ao 16º dia de cada período, com intervalos de nove horas entre as coletas de cada dia. No dia 14 as coletas foram realizadas às 6h00 e 15h00, no dia 15 às 0h00, 9h00 e 18h00 e no dia 16 às 3h00, 12h00 e 21h00.

Foi utilizada a técnica de amostragem omasal descrita por Huhtanen et al. (1997) e adaptada por Leão (2002). A coleta da digesta omasal foi realizada, introduzindo-se no rúmen a extremidade de um tubo coletor, conduzindo-o em direção ao orifício

retículo-omasal, até que a parte inicial ultrapassasse o referido orifício, onde foi mantido seguro com a mão durante o período da coleta. A outra extremidade do tubo coletor foi adaptada em uma das aberturas do kitassato e a mangueira da bomba a vácuo, na outra abertura do mesmo. No momento da coleta, a bomba a vácuo foi acionada, e por sucção, a digesta foi coletada através da mangueira até o kitassato, sendo coletado aproximadamente 700 mL de digesta por horário de coleta.

A amostragem ileal foi realizada nos mesmos horários da coleta de digesta omasal, com o auxílio de sacos plásticos adaptados na extremidade do tubo da fístula ileal até que a digesta fluísse normalmente, totalizando 200 mL de digesta por horário de coleta.

As amostras individuais das digestas omasal e ileal foram imediatamente congeladas (-20°C) em potes plásticos para posteriormente serem processadas. Ao final de cada período experimental, estas amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e compostas por animal, resultando em uma amostra composta com aproximadamente 5,6 L de digesta omasal e outra com aproximadamente 1,6 L de digesta ileal.

A amostra composta da digesta omasal foi filtrada utilizando filtro de náilon a 100 µm com área de poros de 44% de superfície (Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Switzerland) obtendo assim duas fases: o filtrado constituindo a fase líquida e de pequenas partículas e o resíduo, a fase de grandes partículas.

Após estes procedimentos, as amostras compostas de digesta omasal e ileal foram imediatamente congeladas à -80°C e posteriormente liofilizadas e moídas em moinhos de facas (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA) à 2 e 1 mm, sendo armazenadas para posteriores análises.

A coleta de sangue foi realizada no 17º dia do período experimental, por punção da veia jugular, usando tubos com gel separador. Estas amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000 x g durante 15 minutos e então o soro foi acondicionado em recipientes identificados e armazenados a -20°C para posterior análise de uréia.

### 2.3. Análises químicas

As amostras de alimentos, sobras, fezes e amostras liofilizadas das fases de digesta omasal e ileal, foram analisadas seguindo os procedimentos descritos por Detmann et al. (2012) para quantificação da MS (INCT-CA G-003/1); PB (INCT-CA N-001/1); cinzas (INCT-CA M-001/1) e FDN (INCT-CA F-002/1) corrigida para cinzas (INCT-CA M-002/1) e proteína (INCT-CA N-004/1). As amostras de alimentos, sobras e amostras liofilizadas das fases de digesta, processadas em peneira de 2mm, foram avaliadas quanto ao teor de FDN<sub>i</sub> pelo método INCT-CA F-009/1, utilizando-se sacos F57 (Ankom®) em procedimento de incubação in situ por 288 horas.

A quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) foi realizada de acordo com Detmann e Valadares Filho (2010a) em que  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%MM]$  em que: FDN<sub>cp</sub> = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína.

As amostras das digestas e do indicador Co-EDTA, foram avaliadas quanto a sua concentração de cobalto em espectrofotômetro de absorção atômica (Spectr AA-800; Varian spectrometer, Harbor City, CA). A solução mineral foi preparada segundo método INCT-CA M-004/1 descritos por Detmann et al. (2012).

As concentrações de N-total nas amostras compostas de urina foram quantificadas pelo método (INCT-CA M-002/1) descritos por Detmann et al. (2012).

As determinações das concentrações dos aminoácidos foram realizadas por intermédio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A metodologia envolve a reação de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC), formando os PTC aminoácidos que foram quantificados por HPLC em fase reversa (loop de injeção de 30uL, pH 6,40, em gradiente linear binário com fluxo de 1mL/min e temperatura da coluna 58°C), utilizando detecção em UV a 254nm.

A quantificação da uréia no soro foi realizada pelo método cinético de tempo fixo, utilizando-se o equipamento automático para bioquímica, marca Mindray, modelo: BS200E.

#### 2.4. Cálculos

Admitindo-se a falta de representatividade das amostras da digesta entrando no canal omasal, as concentrações dos indicadores nas diferentes fases da digesta omasal foram usadas como base para calcular o fator de reconstituição (France e Siddons, 1986). O fluxo total da digesta ileal foi obtido dividindo-se o consumo do indicador pela sua concentração nas amostras da digesta ileal. O fluxo dos nutrientes (g/dia) foi obtido multiplicando-se sua concentração na digesta (g/Kg MS) pelo fluxo de MS.

As digestibilidades aparentes ruminal e intestinal dos nutrientes foram calculadas em relação ao total ingerido.

As estimativas do N retido foram obtidas pela subtração das excreções urinárias e fecais do consumo de N. As estimativas do N absorvido foram obtidas pela subtração das excreções fecais do consumo de N.

Os fluxos dos aminoácidos no omaso e no íleo foram calculados multiplicando-se suas respectivas concentrações nas digesta omasal e ileal pelos fluxos da MS calculados com o sistema de indicador duplo e único, respectivamente. As quantidades

absorvidas dos aminoácidos no intestino delgado foram calculadas pelas diferenças entre os fluxos omasal e ileal dos aminoácidos.

As estimativas das digestibilidades verdadeiras intestinais dos aminoácidos essenciais, não essenciais, totais, da lisina e da metionina foram obtidas através da equação:  $Y = a + bX$ ; onde Y representa o desaparecimento entre dois pontos no trato gastrintestinal (sendo neste estudo representado pela diferença entre o fluxo omasal e ileal); X representa a entrada no intestino delgado (sendo neste estudo representado pelo fluxo omasal); a é um valor negativo que representa as perdas endógenas; e b a digestibilidade verdadeira (Van Soest, 1982).

## 2.5. Análises estatísticas

As variáveis referentes ao consumo, coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes e dos aminoácidos nos diferentes locais do trato gastrintestinal e quantidades absorvidas dos aminoácidos foram analisadas por intermédio do PROC MIXED do SAS (versão 9.1) utilizando-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + N_j + GN_{ij} + A_{(i)k} + P_{(i)l} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que  $Y_{ijkl}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $G_i$  = efeito fixo do grupo genético i confundido com o efeito do quadrado latino,  $N_j$  = efeito fixo do nível dietético de proteína bruta j,  $GN_{ij}$  = efeito fixo da interação entre grupo genético i e o nível dietético de proteína bruta j,  $A_{(i)k}$  = efeito aleatório do animal k aninhado ao grupo genético i,  $P_{(i)l}$  = efeito aleatório do período l aninhado ao grupo genético i, e  $\varepsilon_{ijkl}$  = erro aleatório assumindo-se como normal e independentemente distribuído (NID) (0;  $\sigma^2_\varepsilon$ ). Os graus liberdade foram estimados pelo método de Kenward-Roger. O procedimento SLICE dos SAS (versão 9.1) foi utilizado para o desdobramento das interações quando necessário. Em caso de efeitos significativos para os níveis dietéticos de proteína bruta, os seguintes

contrastes ortogonais foram estudados: C1: consumo restrito vs. consumo livre, C2: efeito linear dos níveis dietéticos de proteína bruta 10, 12 e 14% e C3: efeito quadrático dos níveis proteicos 10, 12 e 14%. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

O N ingerido e consumo de NDT foram avaliados quanto a sua capacidade de predição tanto do N urinário, quanto do fecal e N total por meio de regressão linear múltipla utilizando o procedimento STEPWISE do SAS (versão 9.1).

### **3.0. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Consumo e digestão dos nutrientes no trato gastrointestinal**

Não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre grupo genético e níveis dietéticos de PB para nenhuma das variáveis de consumo e digestibilidade aparente avaliadas. Os animais cruzados apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) CMS expresso em kg/dia em relação aos Nelores (Tabela 2), porém quando expresso em função do peso corporal (g/Kg), não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre grupos genéticos. O maior PC médio dos animais cruzados (281,9 Kg) em comparação aos Nelore (239,4 Kg) resultaram em maior CMS expresso em kg/dia.

Não foi verificado efeito significativo ( $P > 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre o CMS (kg/dia e g/kg PC). Este comportamento corrobora com os resultados obtidos em estudos com bovinos de corte alimentados com níveis de PB que variaram entre 9 e 15% de PB (Amaral et al., 2014; Obeid et al., 2006; Prates et al. 2015). Porém, estudos com ruminantes utilizando maiores variações de PB na dieta (Broderick, 2003; Grings et al., 1991) têm demonstrado uma resposta positiva sobre a ingestão de MS, indicando que possivelmente a ausência de efeitos sobre o CMS pode ser relacionada à pequena variação nos níveis de PB utilizados neste estudo.

Os consumos dos nutrientes (kg/dia) foram maiores ( $P < 0,05$ ) para os animais cruzados em relação aos zebuínos puros, isto pode ser atribuído ao comportamento verificado para o CMS em kg/dia. De forma geral, as digestibilidades aparentes parciais e totais (kg/dia e % do ingerido) dos nutrientes não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre grupos genéticos.

As quantidades digeridas (kg/d) da MS e MO foram menores ( $P < 0,05$ ) no consumo restrito em comparação ao voluntário. As maiores ( $P < 0,05$ ) digestibilidades aparentes ruminais da MO (%) e totais da MS e MO (%) no consumo restrito, podem ser atribuídas à possíveis aumentos no tempo de retenção da digesta no rúmen com consequente aumento na extensão da fermentação ruminal (Scholljegerdes et al., 2004).

Não foram verificados efeitos ( $P > 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre as digestibilidades aparentes (%) ruminais, no intestino grosso e totais da MS e MO. A ausência de efeitos dos níveis de PB nas dietas sobre as digestibilidades aparentes ruminais da MS e MO, foram reportadas em estudos com bovinos de corte (Chen et al., 2010; Yuangklang et al., 2010). No entanto, o aumento da digestibilidade da MS tem sido relacionado positivamente com as quantidades de PB nas dietas (Allen, 2000; Archibeque et al., 2007). Isso sugere que fatores envolvidos como, os níveis e as fontes de PB nas dietas podem justificar as variações nas respostas sobre digestibilidades dos nutrientes reportadas na literatura (Dung et al., 2014) .

Tabela 2. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta sobre os consumos e digestibilidades aparentes da matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) e no consumo e teor de nutrientes digestíveis totais (NDT)

Item	Grupo genético		Nível de PB <sup>1</sup>				Efeito principal <sup>2</sup>				Contraste <sup>3</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%	EPM	GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
Consumo de MS													
kg/dia	4,23	5,38	3,04	5,22	5,22	5,72	0,36	0,02	<0,01	0,22	<0,01	0,09	0,31
g/Kg PC	17,72	19,33	11,94	19,81	20,41	21,94	1,75	0,45	<0,01	0,78	<0,01	0,08	0,65
Digestibilidade ruminal													
kg/dia	1,52	2,14	1,20	2,11	1,77	2,25	0,26	0,06	0,03	0,06	<0,01	0,44	0,02
%	35,2	39,5	39,5	39,6	32,9	37,5	3,12	0,22	0,06	0,07	0,18	0,43	0,02
Digestibilidade no intestino delgado													
Kg/dia	1,03	1,11	0,73	0,94	1,38	1,23	0,12	0,49	<0,01	0,22	<0,01	0,02	<0,01
%	24,5	21,2	24,0	18,1	27,2	22,0	2,74	0,28	<0,01	0,25	0,40	0,09	<0,01
Digestibilidade no intestino grosso													
Kg/dia	0,62	0,67	0,42	0,76	0,60	0,78	0,14	0,76	<0,01	0,58	<0,01	0,82	0,05
%	14,6	12,2	13,7	14,3	12,1	13,5	2,83	0,50	0,71	0,58	0,78	0,69	0,29
Digestibilidade total													
Kg/dia	3,19	3,93	2,37	3,82	3,77	4,28	0,31	0,05	<0,01	0,35	<0,01	0,08	0,20
%	74,3	72,9	77,2	71,9	72,2	73,0	1,93	0,31	0,04	0,91	<0,01	0,58	0,87
Consumo de MO													
Kg/dia	3,96	5,02	2,83	4,89	4,89	5,35	0,34	0,02	<0,01	0,21	<0,01	0,09	0,31
Digestibilidade ruminal													
kg/dia	1,72	2,31	1,35	2,25	2,03	2,43	0,25	0,07	<0,01	0,09	<0,01	0,30	0,06
%	42,8	45,8	47,7	45,1	40,8	43,6	3,14	0,40	0,07	0,12	0,03	0,54	0,11
Digestibilidade no intestino delgado													
Kg/dia	0,81	0,88	0,55	0,76	1,07	1,01	0,10	0,38	<0,01	0,49	<0,01	0,02	0,04
%	20,5	17,9	19,3	15,5	22,7	19,3	2,43	0,34	0,02	0,35	0,91	0,07	<0,01
Digestibilidade no intestino grosso													
Kg/dia	0,50	0,54	0,33	0,63	0,48	0,62	0,13	0,81	0,01	0,70	<0,01	0,93	0,06
%	12,6	10,5	11,6	12,7	10,4	11,5	2,83	0,54	0,71	0,76	0,94	0,55	0,32
Digestibilidade total													
Kg/dia	3,04	3,74	2,25	3,65	3,60	4,07	0,30	0,06	<0,01	0,36	<0,01	0,08	0,21
%	75,9	74,2	78,7	73,7	73,9	74,4	1,95	0,24	0,04	0,92	<0,01	0,58	0,98
Consumo de NDT													
kg/dia	3,05	3,75	2,25	3,66	3,61	4,09	0,30	0,07	<0,01	0,22	<0,01	0,04	0,13
Teor; %	71,1	69,6	73,5	68,9	69,2	69,9	1,89	0,25	0,08	0,93	0,01	0,60	0,93

<sup>1</sup>CR = consumo restrito. <sup>2</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>3</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

O efeito linear ( $P < 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre o CNDT pode ter sido em função do aumento do consumo de nutrientes digestíveis nas dietas, como observado para o CPB (Tabela 3).

O CPB aumentou linearmente ( $P < 0,05$ ) com os níveis de PB, demonstrando que maiores concentrações de PB nas dietas são relacionadas com maiores consumos de N em bovinos (Noftsgger and St-Pierre, 2003).

Houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) sobre a digestibilidade aparente ruminal (Kg/dia e % do ingerido) da PB em resposta aos níveis crescentes de PB. O metabolismo de proteína no rúmen é resultado da atividade metabólica dos microrganismos e envolve dois importantes eventos: a degradação da proteína, que fornece fontes de N para as bactérias ruminais e a síntese de microbiana (Bach et al., 2005).

As digestibilidades ruminais negativas obtidas nas dietas com 10% PB (-18,2%); 12% PB (-16,3%) e para os animais em consumo restrito (-23,1%), indicam que os fluxos de PB foram maiores em relação ao consumo. Este balanço negativo no rúmen pode ser atribuído aos ajustes que ocorrem no metabolismo do animal para manter o suprimento de N adequado no rúmen. Sob suprimento deficiente de N, o animal reduz a excreção urinária de N e se torna mais dependente de eventos de reciclagem para prover suprimento adequado de N para assimilação na forma de proteína microbiana no ambiente ruminal (Detmann et al., 2014).

Tabela 3. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta (PB) sobre os consumos e digestibilidade aparentes da PB e extrato etéreo (EE)

Item	Grupo genético		Nível de PB <sup>1</sup>				EPM	Efeito principal <sup>2</sup>			Contraste <sup>3</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%		GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
Consumo de PB													
kg/dia	0,52	0,65	0,36	0,53	0,64	0,82	0,05	0,03	<0,01	0,12	<0,01	<0,01	0,21
Digestibilidade ruminal													
g/dia	-78,3	-30,4	-79,8	-82,8	-102,7	48,0	0,04	0,23	0,01	0,09	0,32	<0,01	0,03
%	-18,3	-9,0	-23,1	-16,3	-18,2	3,0	6,56	0,18	<0,01	0,15	0,01	<0,01	0,03
Digestibilidade no intestino delgado													
g/dia	410,3	477,4	304,7	402,1	527,5	540,9	0,03	<0,01	<0,01	0,14	<0,01	<0,01	0,06
%	80,6	75,6	86,4	75,5	84,0	66,4	5,96	0,39	<0,01	0,12	0,01	0,09	<0,01
Digestibilidade no intestino grosso													
g/dia	54,0	35,4	38,0	44,3	41,7	54,8	0,02	0,22	0,73	0,59	0,48	0,51	0,56
%	10,8	6,0	10,5	8,2	7,7	7,1	3,11	0,16	0,59	0,56	0,20	0,67	0,98
Digestibilidade no intestino total													
g/dia	385,9	482,5	263,0	363,7	466,4	643,7	0,04	0,06	<0,01	0,13	<0,01	<0,01	0,16
%	73,2	73,1	73,4	68,8	73,5	77,0	1,63	0,97	<0,01	0,85	0,80	<0,01	0,69
Consumo de EE													
kg/dia	0,16	0,20	0,12	0,18	0,22	0,21	0,02	0,02	<0,01	0,39	<0,01	<0,01	0,03
Digestibilidade ruminal													
g/dia	-29,8	-10,3	-3,6	-27,5	-21,6	-27,4	0,01	0,20	0,35	0,15	0,08	0,98	0,64
%	-16,1	-5,9	-16,6	-9,5	-14,8	-3,0	7,63	0,20	0,20	0,09	0,06	0,78	0,29
Digestibilidade no intestino delgado													
g/dia	178,0	189,8	110,0	185,8	213,5	226,4	0,02	0,52	<0,01	0,59	<0,01	0,03	0,61
%	104,0	93,0	92,8	102,3	95,5	103,1	8,56	0,18	0,48	0,21	0,25	0,91	0,29
Digestibilidade no intestino grosso													
g/dia	-7,9	-10,4	-4,9	-9,7	-4,2	-17,7	0,01	0,60	0,20	0,43	0,33	0,26	0,11
%	-4,5	-5,0	-4,4	-5,3	-2,1	-7,2	3,90	0,81	0,42	0,68	0,84	0,53	0,13
Digestibilidade total													
g/dia	140,4	169,1	81,8	132,0	187,0	165,4	0,01	0,06	<0,01	0,53	<0,01	<0,01	<0,01
%	83,4	84,3	86,4	80,1	86,6	82,2	2,65	0,66	0,05	0,86	0,12	0,43	0,02

<sup>1</sup>CR = consumo restrito. <sup>2</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>3</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

O balanço positivo de N no rúmen observado para a dieta com 14% de PB, pode estar relacionado à maior disponibilidade de N no ambiente ruminal. Nestas condições, a utilização da proteína metabolizável se torna mais eficiente pois o N absorvido pode ser direcionado para a síntese de tecidos corporais ao invés de ser utilizado para eventos de reciclagem (Detmann et al., 2010b). Ressalta-se que o excesso de PB dietética e maior digestibilidade do N podem levar à maiores quantidades de N-amônia absorvidos no rúmen, e conseqüentemente à maiores excreções de N na urina, aumentando assim as proporções de N urinário no total de N excretado (Dong et al., 2014).

No intestino delgado, as quantidades digeridas de PB em Kg/dia, aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) e quando expressa em percentagem, houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) com o aumento dos níveis dietéticos de PB.

A digestibilidade aparente total da PB aumentou linearmente ( $P < 0,05$ ) em resposta à inclusão dos níveis crescentes de PB, sendo em média 73%. Os aumentos nas concentrações de PB dietética proporcionaram um aumento na digestibilidade aparente total da PB, possivelmente como resultado da diluição do N metabólico fecal, assim como do consumo de fontes de proteína mais digestíveis (Broderick, 2003). Dong et al. (2014) utilizando um banco de dados de 50 estudos com bovinos de corte, observaram um valor médio de 67,6% em dietas contendo níveis de PB entre 9 a 15%.

A regressão linear obtida entre consumo de PB ( $\text{g/Kg}^{0,75}$ ) e a quantidade total de PB absorvida demonstrou que a digestibilidade verdadeira da PB no trato gastrintestinal foi de 77,8% (Figura 1).

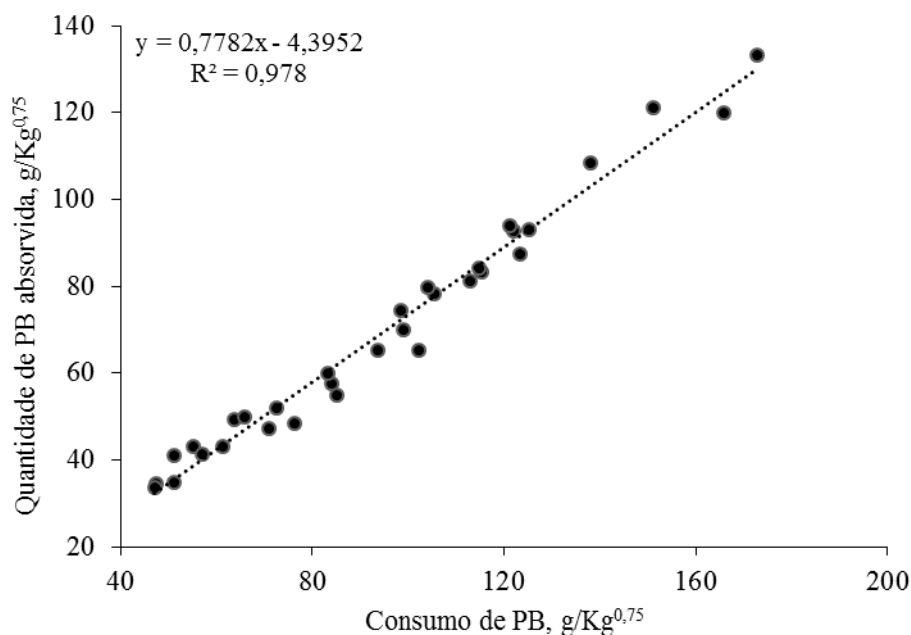


Figura 1. Relação entre a quantidade de PB absorvida no trato gastrointestinal ( $\text{g/Kg}^{0,75}$ ) e o consumo de PB ( $\text{g/Kg}^{0,75}$ ).

Os níveis de PB não afetaram ( $P > 0,05$ ) as digestões ruminais ( $\text{kg/dia}$  e %) do EE. A digestibilidade ruminal negativa do EE indica que houve síntese de lipídeos microbianos neste local, resultando em aumento do fluxo de lipídeos para o trato gastrointestinal inferior. A digestibilidade aparente (%) do EE no intestino delgado não foi afetada ( $P > 0,05$ ) pelos níveis dietéticos de PB. O alto valor observado para a digestibilidade aparente no intestino delgado (102,3%; 95,5% e 103,1% para as dietas de 10%; 12% e 14% de PB) demonstra que este é o principal local de digestão deste nutriente.

Não houve efeito dos níveis dietéticos de PB ( $P > 0,05$ ) sobre o CFDNcp, CFDN indigestível e CFDN indigerida (Tabela 4). O aumento da concentração de PB nas dietas proporcionou um efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) sobre a digestibilidade ruminal ( $\text{Kg/dia}$  e %) da FDNcp. Analisando a digestão no trato gastrointestinal, observou-se que em média a digestibilidade ruminal da FDNcp foi de 44,4% e a digestibilidade aparente

total foi de 60%. Portanto, o rúmen foi o principal local da digestão da fibra, representando 74% da digestão aparente total.

O valor próximo de zero para a digestibilidade da fibra no intestino delgado, pode ser considerado padrão para as estimativas de fluxo de MS por indicadores, uma vez que praticamente não ocorre digestão da fibra neste local. Neste estudo, as quantidades digeridas de FDNcp em kg/dia no intestino delgado, foram praticamente nulas, porém quando expressas em percentagem foi obtida uma média de 7,9%. Neste caso, admite-se que possa ocorrer alguma digestão de componentes da fibra na parte distal do intestino delgado, devido à contaminação por bactérias do intestino grosso, na região ileocecal (Coelho da Silva e Leão, 1979).

Não houve efeito dos níveis dietéticos de PB ( $P > 0,05$ ) sobre o consumo de CNF. Os aumentos dos níveis proteicos afetaram quadraticamente ( $P < 0,05$ ) as quantidades digeridas (kg/dia) de CNF nos diferentes locais do trato gastrintestinal. Não foi observado efeito sobre a digestibilidade aparente total do CNF em resposta aos níveis de PB.

Tabela 4. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta sobre os consumos e digestibilidades aparentes da fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDN<sub>Ncp</sub>) e proteína e dos carboidratos não fibrosos (CNF)

Item	Grupo genético		Nível de PB <sup>1</sup>				EPM	Efeito principal <sup>2</sup>			Contraste <sup>3</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%		GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
CFDN <sub>cp</sub>													
Kg/dia	1,36	1,68	1,00	1,67	1,66	1,77	0,13	0,04	<0,01	0,37	<0,01	0,31	0,46
g/Kg PC	5,70	6,10	3,94	6,34	6,49	6,83	0,66	0,61	<0,01	0,87	<0,01	0,30	0,80
Digestibilidade ruminal													
Kg/dia	0,65	0,77	0,59	0,67	0,83	0,74	0,08	0,21	0,02	0,45	0,01	0,31	0,05
%	48,8	47,1	58,8	40,8	50,5	41,8	4,00	0,69	<0,01	0,19	<0,01	0,73	<0,01
Digestibilidade no intestino delgado													
Kg/dia	0,13	0,09	0,03	0,18	0,05	0,18	0,07	0,61	<0,01	0,35	0,01	0,99	<0,01
%	8,5	4,7	2,6	10,9	2,7	10,2	4,55	0,49	0,01	0,48	0,03	0,81	<0,01
Digestibilidade no intestino grosso													
Kg/dia	0,09	0,15	0,08	0,11	0,13	0,15	0,07	0,47	0,59	0,59	0,25	0,50	0,97
%	6,8	8,3	7,7	6,1	7,7	8,6	4,83	0,78	0,91	0,59	0,93	0,49	0,92
Digestibilidade total													
Kg/dia	0,86	1,00	0,69	0,96	1,00	1,07	0,10	0,11	0,00	0,55	<0,01	0,19	0,90
%	64,4	60,1	69,1	58,3	60,9	60,7	3,46	0,13	0,02	0,88	<0,01	0,49	0,64
Consumo de FDN indigestível													
Kg/dia	0,42	0,52	0,30	0,52	0,51	0,55	0,04	0,08	<0,01	0,30	<0,01	0,38	0,31
g/Kg PC	1,76	1,89	1,17	1,99	1,99	2,14	0,23	0,64	<0,01	0,77	<0,01	0,34	0,55
Consumo de FDN indigerida													
g/Kg PC	2,09	2,47	1,22	2,65	2,55	2,70	0,26	0,28	<0,01	0,90	<0,01	0,84	0,59
Consumo de CNF													
Kg/dia	1,95	2,50	1,38	2,55	2,39	2,59	0,19	0,03	<0,01	0,23	<0,01	0,78	0,14
Digestibilidade ruminal													
Kg/dia	1,19	1,62	0,86	1,70	1,38	1,69	0,17	0,06	<0,01	0,12	<0,01	0,92	<0,01
%	59,1	63,6	62,1	65,2	55,3	63,0	4,07	0,30	0,06	0,48	0,73	0,52	0,01
Digestibilidade no intestino delgado													
Kg/dia	0,10	0,11	0,11	-0,01	0,26	0,05	0,06	0,84	<0,01	0,96	0,81	0,32	<0,01
%	6,4	5,1	8,1	-0,3	12,2	2,9	3,69	0,74	<0,01	0,91	0,20	0,28	<0,01
Digestibilidade no intestino grosso													
Kg/dia	0,37	0,37	0,23	0,49	0,32	0,44	0,07	0,98	<0,01	0,57	<0,01	0,31	<0,01
%	18,4	14,7	16,2	19,0	14,4	16,5	3,07	0,22	0,49	0,69	0,84	0,41	0,21
Digestibilidade total													
Kg/dia	1,66	2,09	1,20	2,18	1,95	2,18	0,17	0,05	<0,01	0,32	<0,01	0,97	0,05
%	83,7	83,1	86,3	83,3	81,7	82,2	1,67	0,68	0,03	0,87	<0,01	0,49	0,45

<sup>1</sup>CR = consumo restrito. <sup>2</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>3</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

### 3.2. Balanço dos compostos nitrogenados e nitrogênio uréico no soro

Não houve interação entre grupo genético e nível dietético de PB ( $P < 0,05$ ) sobre o balanço de compostos nitrogenados e nitrogênio uréico no soro (Tabela 5).

Os animais cruzados apresentaram maiores ( $P < 0,05$ ) quantidades de N retido (g/dia) em relação ao Nelore. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do grupo genético sobre o N retido expresso em relação ao N ingerido e absorvido (%).

O aumento dietético de PB resultou em um aumento linear ( $P < 0,05$ ) nas excreções de N urinário (g/dia), sendo em média 40,4 g/dia. Estudos demonstram que existe uma relação positiva entre o consumo de N e a excreção total de N na urina (Archibeque et al., 2007; Brake et al., 2010).

Neste estudo, a equação obtida para prever a excreção de N urinário (ENU, g/dia) em função do N ingerido (NI, g/dia) e do consumo de NDT (CNDT, kg/dia) foi:  $ENU = 23,213 + 0,716 NI - 16,390 CNDT$ ,  $r^2 = 0,75$ . Esta equação demonstra que ocorreu um aumento na excreção de N de  $0,7 \text{ g} \times \text{dia}^{-1}$  para cada grama de N ingerido. Waldrip et al. (2013) demonstraram que a excreção de N urinário em bovinos de corte pode ser melhor predita em função do consumo diário de N e observaram que a excreção de N aumentou  $0,6 \text{ g} \times \text{dia}^{-1}$  em função do aumento em gramas do N ingerido.

A relação negativa entre as excreções de N urinário e CNDT pode estar relacionada com maior eficiência de utilização dos compostos nitrogenados pelos microrganismos ruminais quando fontes de nutrientes digestíveis são disponibilizadas adequadamente no ambiente ruminal. Dentre os fatores que afetam a síntese de PB microbiana, a disponibilidade e sincronização entre energia e compostos nitrogenados no rúmen, têm sido conhecidos como os mais importantes (Russel et al., 1992). Portanto, a adequada disponibilização de substratos para o crescimento microbiano permite uma eficiente utilização dos compostos nitrogenados no ambiente ruminal, reduzindo assim as excreções de N para o ambiente.

As excreções fecais variaram de 26,7 para 31,9 g/dia, e apresentaram uma tendência linear ( $P = 0,07$ ) em resposta aumento da PB dietética. A equação obtida entre a excreção de N fecal (ENF, g/dia) com o NI (g/dia) e CNDT (Kg/dia) foi:  $ENF = 0,438 + 0,092 NI + 4,631 CNDT$ ,  $r^2 = 0,84$ . Esta equação demonstra que ocorreu um aumento na excreção de N de  $0,09 \text{ g} \times \text{dia}^{-1}$  para cada grama de N ingerido.

A partição das excreções de N na forma de urina e fezes é largamente influenciada pela dieta (Dong et al., 2014). O N urinário é mais volátil em relação ao N fecal, indicando que a excreção de N na forma de urina representa uma importante via de contribuição para emissões de amônia na atmosfera. Esse estudo demonstrou que, o aumento dos níveis de PB contribuiu significativamente para o aumento das excreções de N urinário.

A equação obtida entre a excreção de N total (NT, g/dia) com o NI (g/dia) e CNDT (Kg/dia) foi:  $ENT = 23,653 + 0,809 NI - 11,756 CNDT$ ,  $r^2 = 0,90$ . Waldrip et al. (2013) desenvolveram equações para prever as excreções de N fecal e urinária à partir de estudos que variaram os níveis de PB entre 12,5 e 13,5% PB, e observaram que o N urinário contribuiu com 63% da excreção de N total em função do N ingerido em dietas com maiores concentrações de N.

O N retido (g/dia) não foi afetado ( $P > 0,05$ ) pelos níveis dietéticos de PB. Valadares et al. (1997) observaram que o balanço de N foi menor para o teor de 7% de PB na dieta em relação à maiores níveis (9,5 à 14,6% de PB), que não diferiram entre si.

Embora sem efeito significativo, houve um aumento de 25,7% no N retido dos animais alimentados com 14% em relação à 10% de PB. O aumento de N retido em resposta aos níveis proteicos na dieta pode ser relacionado com uma maior disponibilidade de aminoácidos em dietas com maiores teores de proteína, proporcionando uma maior taxa de síntese proteica.

Tabela 5. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta sobre as excreções de nitrogênio, balanço de nitrogênio e nitrogênio uréico no soro

Item <sup>1</sup>	Bactéria		Nível de PB <sup>2</sup>				EPM	Efeito principal <sup>3</sup>			Contraste <sup>4</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%		GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
NU, g/dia	34,18	41,28	29,73	23,93	33,66	63,60	7,16	0,23	<0,01	0,27	0,08	<0,01	0,12
NF, g/dia	22,35	28,21	15,13	26,73	27,34	31,91	2,72	0,08	<0,01	0,72	<0,01	0,07	0,39
N retido, g/dia	27,70	38,84	12,13	35,44	40,96	44,55	5,26	0,04	<0,01	0,89	<0,01	0,10	0,83
N retido/N ing, %	30,73	36,79	20,19	40,64	38,43	35,77	3,77	0,11	<0,01	0,80	<0,01	0,19	0,94
N retido/N abs, %	43,73	50,09	30,16	59,11	52,49	45,87	4,89	0,13	<0,01	0,89	<0,01	0,01	0,99
NUS, mg/dL	13,81	11,18	13,75	9,38	11,38	15,50	1,57	0,06	<0,01	0,17	0,20	<0,01	0,43

<sup>1</sup>NU = excreção de nitrogênio urinário; NF = excreção de nitrogênio fecal; NUS = nitrogênio uréico no soro; N ing = nitrogênio ingerido; Nabs = nitrogênio absorvido. <sup>2</sup>CR = consumo restrito. <sup>3</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>4</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

O N uréico no soro (NUS) aumentou linearmente ( $P < 0,05$ ) de 9,38 para 13,05 mg/dL com o aumento do nível de PB dietético. O teor de NUS tem sido utilizado para obtenção de informações adicionais sobre a nutrição protéica de ruminantes, por meio da resposta metabólica à determinada dieta (Chizzotti et al., 2006).

Existe uma correlação positiva entre o consumo diário de N e a concentração de uréia no sangue (Valadares et al., 1997; Muscher et al., 2010), porém concentrações elevadas de NUS podem estar relacionadas à utilização ineficiente da PB da dieta, resultando em maiores excreções de N urinário. O comportamento positivo entre a excreção de N urinário (ENU, g/dia) com o N uréico no soro NUS (g/dia) foi observado através da equação:  $ENU = 8,566 + 2,383 NU$ ,  $r^2 = 0,40$ .

### 3.3. Digestibilidade intestinal dos aminoácidos

O fluxo dos aminoácidos no omaso e íleo, as digestibilidades intestinais aparentes e as quantidades absorvidas dos aminoácidos essenciais estão demonstradas na Tabela 6. Não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre grupo genético e nível dietético de PB para os fluxos de aminoácidos avaliados.

Os fluxos dos aminoácidos essenciais e não essenciais no omaso aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) em resposta aos níveis crescentes de PB. A maximização do fluxo de aminoácidos para o intestino delgado é de grande interesse na nutrição de ruminantes, pois as exigências dietéticas de proteína metabolizável (PM) são atendidas mediante a absorção no intestino delgado dos aminoácidos oriundos da PB microbiana e da proteína dietética não degradada no rúmen digestível (Valadares Filho et al., 2010). Ressalta-se que a maior parte dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é proveniente da PB microbiana sintetizada no rúmen.

Tabela 6. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta sobre os fluxos dos aminoácidos, digestibilidades aparentes e quantidades absorvidas dos aminoácidos essenciais

Item <sup>1</sup>	Grupo genético		Nível de PB <sup>2</sup>				EPM	Efeito principal <sup>3</sup>			Contraste <sup>4</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%		GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
Fluxos dos aminoácidos essenciais e não essenciais (g/dia)													
AAE no omaso	253,6	275,9	160,8	264,0	288,4	345,9	0,02	0,35	<0,01	0,39	<0,01	<0,01	0,38
AANE no omaso	301,5	331,5	189,5	313,7	353,0	409,7	0,03	0,27	<0,01	0,52	<0,01	<0,01	0,69
AAE no íleo	64,5	73,3	43,7	73,8	71,6	86,4	0,01	0,27	<0,01	0,67	<0,01	0,10	0,19
AANE íleo	84,8	96,5	56,8	97,1	93,7	115,2	0,01	0,24	<0,01	0,83	<0,01	0,05	0,11
Quantidades absorvidas dos aminoácidos essenciais (g/dia)													
Arginina	19,6	22,6	12,7	20,5	23,8	27,3	0,002	0,12	<0,01	0,66	<0,01	<0,01	0,91
Histidina	8,7	8,6	5,4	8,3	9,7	11,2	0,001	0,98	<0,01	0,67	<0,01	0,02	0,91
Isoleucina	21,0	23,1	13,1	21,8	24,5	28,7	0,002	0,24	<0,01	0,25	<0,01	<0,01	0,67
Leucina	38,7	41,7	23,8	39,1	45,1	52,9	0,004	0,45	<0,01	0,49	<0,01	<0,01	0,78
Lisina	30,6	31,6	17,5	30,1	33,3	43,5	0,004	0,82	<0,01	0,13	<0,01	<0,01	0,21
Metionina	8,1	9,9	5,5	8,6	10,1	11,8	0,001	0,05	<0,01	0,90	<0,01	<0,01	0,83
Fenilalanina	19,5	20,4	12,1	19,5	21,6	26,7	0,002	0,61	<0,01	0,32	<0,01	<0,01	0,45
Treonina	18,1	19,1	10,7	17,5	21,0	24,9	0,002	0,60	<0,01	0,07	<0,01	<0,01	0,87
Triptofano	3,0	3,2	1,9	2,7	3,8	3,92	0,001	0,65	<0,01	0,30	<0,01	<0,01	0,12
Valina	22,0	22,5	14,5	22,0	24,0	28,7	0,003	0,81	<0,01	0,50	<0,01	0,05	0,61
Digestibilidades aparentes dos aminoácidos essenciais (%)													
Arginina	77,5	78,2	76,6	76,4	79,7	78,9	1,76	0,61	0,08	0,56	0,16	0,10	0,11
Histidina	79,7	76,4	78,0	75,1	80,4	78,7	2,05	0,02	0,08	0,33	0,93	0,07	0,05
Isoleucina	73,9	73,3	72,0	72,8	74,8	74,8	1,94	0,56	0,12	0,18	0,07	0,15	0,39
Leucina	76,0	75,0	74,2	73,5	77,1	77,1	1,85	0,45	0,02	0,65	0,13	0,01	0,14
Lisina	73,3	72,0	71,1	71,1	73,1	75,1	4,41	0,75	0,61	0,30	0,49	0,26	0,99
Metionina	81,4	83,3	81,9	80,5	83,4	83,5	1,78	0,27	0,15	0,32	0,61	0,05	0,26
Fenilalanina	74,2	72,6	72,5	71,9	74,5	74,7	2,13	0,25	0,33	0,30	0,44	0,13	0,43
Treonina	66,3	65,4	64,1	63,7	68,3	67,4	2,87	0,57	0,14	0,15	0,21	0,12	0,18
Triptofano	68,1	68,4	68,7	61,9	73,1	69,2	5,16	0,93	0,06	0,04	-	-	-
Valina	72,1	69,6	70,9	68,7	72,3	71,5	2,76	0,16	0,54	0,44	0,95	0,28	0,33
Total	74,2	73,9	72,7	71,8	75,1	75,1	0,02	0,51	0,15	0,39	0,34	0,07	0,27

<sup>1</sup>AAE = aminoácidos essenciais; aminoácidos não essenciais. <sup>2</sup>CR = consumo restrito. <sup>3</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>4</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

De maneira geral, com exceção da digestibilidade da histidina, não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do grupo genético sobre as quantidades absorvidas e sobre as digestibilidades aparentes dos aminoácidos essenciais individuais.

As quantidades absorvidas dos aminoácidos essenciais individuais no intestino delgado aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) em resposta aos níveis de PB. Os níveis dietéticos de PB não afetaram ( $P > 0,05$ ) as digestibilidades aparentes intestinais dos aminoácidos essenciais individuais, com exceção da leucina. As digestibilidades aparentes totais dos aminoácidos essenciais foram em média de 74%. A digestibilidade aparente da lisina no intestino delgado variou de 71,1% à 75,1% entre os níveis de PB e foi em média 73,08%. Para a metionina, a digestibilidade aparente variou 80,5% à 83,5% sendo em média de 82,5%.

A lisina e metionina são considerados os dois principais aminoácidos limitantes em bovinos em crescimento (Klemesrud et al., 2000; Loest et al., 2002). Tem sido demonstrado que, em ingredientes comumente utilizados nas dietas de ruminantes existe uma deficiência destes aminoácidos (Klemesrud et al., 2000; Titgemeyer et al., 1988). Em comparação à composição da proteína de concentrados proteicos de origem vegetal, a PB microbiana contém maior proporção de metionina e lisina (Valadares Filho et al., 2010), demonstrando a importância de maximizar o fluxo da PB microbiana para o intestino delgado através da manipulação da dieta.

As quantidades absorvidas dos aminoácidos não essenciais individuais aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) em resposta aos níveis dietéticos de PB (Tabela 7). Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre o grupo genético e nível dietético de PB para a quantidade absorvida de cistina

Tabela 7. Efeito dos grupos genéticos e níveis dietéticos de proteína bruta sobre os fluxos dos aminoácidos, digestibilidades aparentes e quantidades absorvidas dos aminoácidos essenciais

Item <sup>1</sup>	Grupo genético		Nível de PB <sup>2</sup>				EPM	Efeito principal <sup>3</sup>			Contraste <sup>4</sup>		
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%		GG	N	GG x N	CR x CV	L	Q
Quantidades absorvidas dos aminoácidos não essenciais, g/dia													
Alanina	28,2	30,6	16,6	28,2	34,0	38,9	0,003	0,45	<0,01	0,07	<0,01	<0,01	0,81
Aspártico	44,1	45,1	26,3	43,1	51,2	57,8	0,01	0,80	<0,01	0,62	<0,01	0,01	0,87
Cistina	5,6	8,31	5,2	7,2	7,0	8,5	1,81	0,02	0,01	0,04	-	-	-
Glutamina	58,2	63,5	36,3	58,7	70,0	78,3	0,01	0,24	<0,01	0,50	<0,01	<0,01	0,78
Glicina	21,6	23,6	12,5	21,3	26,7	30,0	0,003	0,41	<0,01	0,13	<0,01	<0,01	0,54
Prolina	21,5	23,3	12,0	21,3	27,0	29,4	0,002	0,47	<0,01	0,40	<0,01	<0,01	0,34
Serina	19,8	21,3	12,2	19,1	23,4	27,5	0,002	0,45	<0,01	0,25	<0,01	<0,01	0,92
Tirosina	17,6	19,3	11,7	17,7	20,2	24,2	0,002	0,17	<0,01	0,19	<0,01	<0,01	0,60
Digestibilidades aparentes dos aminoácidos não essenciais, %													
Alanina	69,4	68,9	66,8	67,5	71,5	70,8	2,35	0,80	<0,01	0,14	0,01	0,02	0,05
Aspártico	79,9	77,8	79,1	77,4	81,2	77,6	3,39	0,20	0,33	0,54	0,84	0,93	0,07
Cistina	61,2	69,7	68,7	64,1	61,1	68,0	11,08	0,03	0,48	0,41	0,34	0,48	0,30
Glutamina	73,4	72,5	72,3	70,7	75,6	73,3	2,12	0,46	0,04	0,27	0,50	0,12	0,02
Glicina	63,2	63,4	60,6	60,9	66,1	65,6	2,83	0,90	<0,01	0,05	0,01	0,01	0,05
Prolina	66,2	65,6	62,3	63,4	69,4	68,5	2,60	0,73	<0,01	0,65	<0,01	<0,01	0,02
Serina	71,0	70,4	69,8	67,6	73,1	72,3	2,26	0,67	0,01	0,21	0,41	0,01	0,04
Tirosina	68,0	66,8	68,3	65,3	68,5	67,6	2,68	0,43	0,42	0,16	0,51	0,28	0,26
Total	71,4	70,6	68,9	73,4	71,9	70,0	0,02	0,50	0,04	0,19	0,27	0,06	0,03
Aminoácidos totais <sup>5</sup>													
Dig. aparente, %	72,7	71,8	71,2	70,2	74,2	73,4	0,02	0,48	0,08	0,29	0,30	0,06	0,10
Q.absorvidas, g/dia	40,6	43,8	25,0	40,7	47,6	55,4	0,04	0,39	<0,01	0,32	<0,01	<0,01	0,89

<sup>1</sup>Q.absorvidas = quantidades absorvidas. <sup>2</sup>CR = consumo restrito. <sup>3</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB. <sup>4</sup>R = consumo restrito; CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático. <sup>5</sup>Aminoácidos totais = aminoácidos essenciais + aminoácidos não essenciais.

Para as digestibilidades aparentes dos aminoácidos não essenciais; alanina, glicina, prolina e serina; houve efeito linear significativo ( $P < 0,05$ ) em resposta aos níveis dietéticos de PB. As digestibilidades aparentes totais dos aminoácidos não essenciais foram em média 71,7%. A maior digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais em relação aos aminoácidos não essenciais foi relatada em outros estudos (Armstrong et al., 1977; Tamminga e Oldham, 1980).

As quantidades absorvidas dos aminoácidos totais (essenciais e não essenciais) aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) em resposta aos níveis dietéticos proteicos. O aumento na absorção de todos os aminoácidos, indica que não houve limitação de transportadores de aminoácidos no intestino delgado.

As digestibilidades aparentes dos aminoácidos totais não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelos níveis dietéticos de PB e apresentaram uma média de 72,6%, próxima às digestibilidades aparentes dos aminoácidos (70%) reportadas pelo NRC (1985). Foram obtidas as seguintes equações para os aminoácidos essenciais (Figura 2), não essenciais (Figura 3) e aminoácidos totais (Figura 4), respectivamente:  $Y = - 8,0818 + 0,7704 x$ ,  $r^2=0,96$  e  $Y = -9,4914 + 0,7435x$ ,  $r^2= 0,96$  e  $Y = - 17,051 + 0,7549x$ ,  $r^2=0,96$ . As digestibilidades verdadeiras dos aminoácidos totais foram de 75,5%. Essas estimativas obtidas foram próximas à ao valor de 80% reportados pelo NRC (2000) para digestibilidade verdadeira dos aminoácidos.

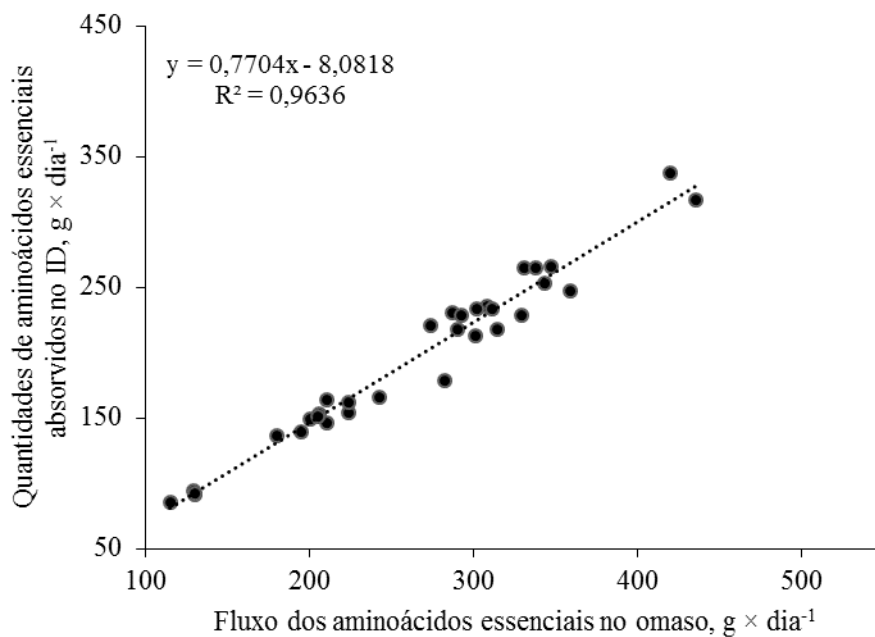


Figura 2. Relação entre as quantidades de aminoácidos essenciais absorvidos ( $g \times dia^{-1}$ ) no intestino delgado (ID) e o fluxo dos aminoácidos essenciais no omaso ( $g \times dia^{-1}$ ).

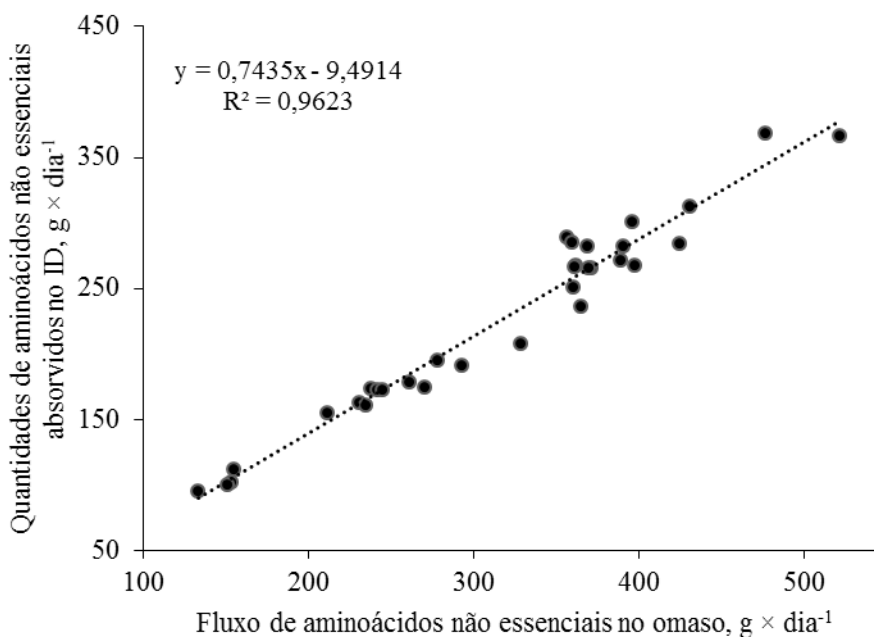


Figura 3. Relação entre as quantidades de aminoácidos não essenciais absorvidos ( $g \times dia^{-1}$ ) no intestino delgado (ID) o fluxo de aminoácidos não essenciais no omaso.

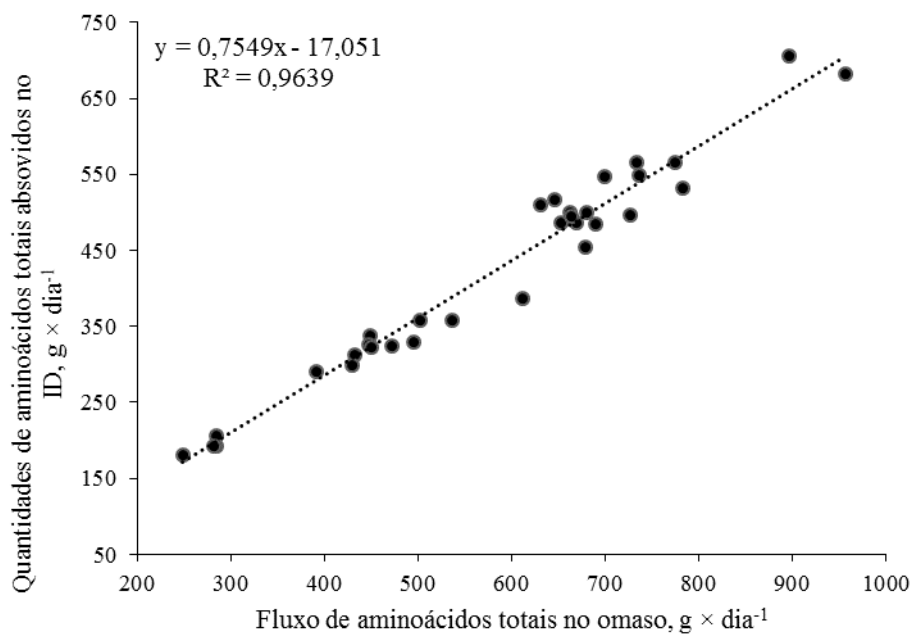


Figura 4. Relação entre as quantidades de aminoácidos totais absorvidos (g x dia<sup>-1</sup>) no intestino delgado (ID) e o fluxo de aminoácidos totais no omaso (g x dia<sup>-1</sup>).

As digestibilidades verdadeiras dos aminoácidos essenciais e não essenciais totais foram de 77,0% e 74,4% respectivamente.

A equação obtida entre a quantidade de lisina absorvida e o fluxo de lisina no omaso foi :  $Y = -2,0041 + 0,779x$ ,  $r^2 = 0,88$ . Portanto, a digestibilidade verdadeira da lisina obtida neste estudo foi de 77,9% .

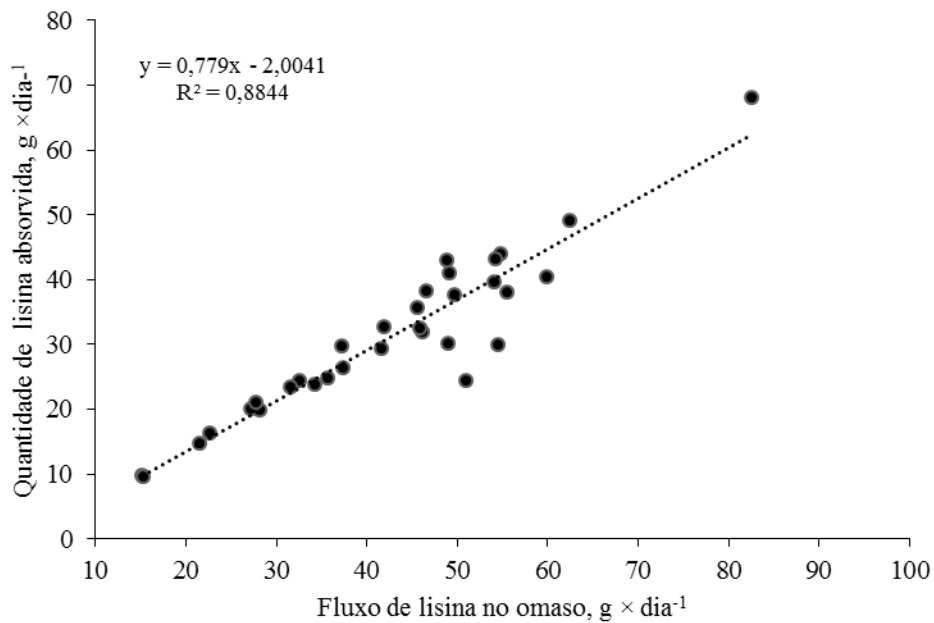


Figura 5. Relação entre a quantidade de lisina absorvida (g x dia<sup>-1</sup>) e o fluxo de lisina no omaso (g x dia<sup>-1</sup>).

A Figura 6 demonstra a relação entre a quantidade de metionina absorvida (g x dia<sup>-1</sup>) e fluxo de metionina no omaso (g x dia<sup>-1</sup>).

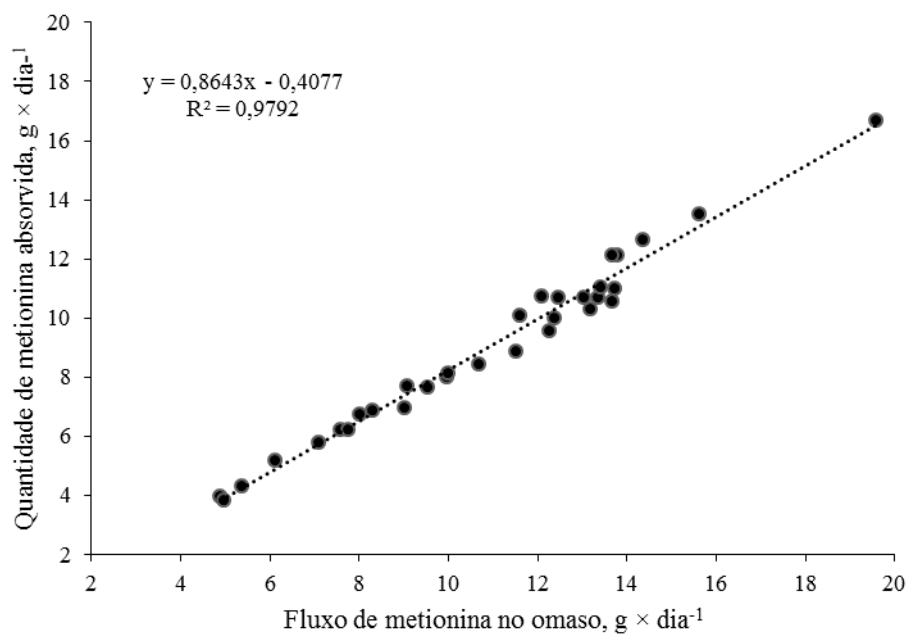


Figura 6. Relação entre a quantidade de metionina absorvida (g x dia<sup>-1</sup>) e fluxo de metionina no omaso (g x dia<sup>-1</sup>).

A equação obtida,  $Y = -0,4077 + 0,8643x$ ,  $r^2=0,97$  indica que a digestibilidade verdadeira da metionina neste estudo foi de 86,4%. Outros estudos também relataram altos valores para a digestibilidade da metionina (Armstrong e Hutton, 1975; Lee e Tasaki, 1977).

Nesse estudo, os valores para a digestibilidade dos aminoácidos foram próximos ao reportado pelo sistema americano NRC e BR Corte. Apesar disso, a escassez de dados na literatura, justificam a aplicação de novos estudos para a avaliação das digestibilidades dos aminoácidos sob condições tropicais.

#### **4.0. Conclusão**

O consumo de MS e as digestões dos nutrientes nos diferentes locais do trato gastrintestinal são similares entre os animais zebuínos e cruzados. As equações obtidas para as excreções de N foram:  $ENU = 23,213 + 0,716 NI - 16,390 CNDT$ ,  $r^2 = 0,75$ ;  $ENF = 0,438 + 0,092 NI + 4,631 CNDT$ ,  $r^2 = 0,84$  e  $ENT = 23,653 + 0,809 NI - 11,756 CNDT$ ,  $r^2 = 0,90$ . Não há efeito dos grupos genéticos e nem dos níveis de PB sobre as digestibilidades aparentes dos aminoácidos essenciais e totais. As digestibilidades verdadeiras dos aminoácidos essenciais, não essenciais e totais são de 77%; 74,4% e 75,5% respectivamente. A digestibilidade verdadeira da lisina é de 77,9% e da metionina é de 86,4%. Os resultados indicam que as excreções dos compostos nitrogenados são positivamente relacionadas com o aumento dos níveis de PB nas dietas e que os valores de digestibilidades dos aminoácidos obtidos sob condições tropicais são condizentes com o valor reportado pelo NRC e pelo BR Corte.

#### **Referências Bibliográficas**

- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83:1598-1624.
- Amaral, P. M., S. C. Valadares Filho, E. Detmann, S. A. Santos, L. F. Prados, L. D. S. Mariz, L. C. Alves, A. C. B. Menezes, F. A. C. Villadiego, M. A. S. Novaes, and F. A. S. Silva. 2014. Effect of phase-feeding crude protein on performance and carcass characteristics of crossbred beef bulls: an application to reduce nitrogen compounds in beef cattle diets. *Tropical Animal Health Production* 46: 419-426.
- Archibeque, S. L., H. C. Freetly, N. A. Cole, and C. L. Ferrell. 2007. The influence of oscillating dietary protein concentrations on finishing cattle. II. Nutrient retention and ammonia emissions. *Journal of Animal Science* 85: 1496-1503.
- Armstrong, D., G. Savage, and D. Harrison. 1977. Digestion of nitrogenous substances entering the small intestine with particular reference to amino acids in ruminant livestock. Publication-European Association for Animal Production (Netherlands). no. 22.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science* 88: E9-E21.
- Brake, D. W., E. C. Titgemeyer, M. L. Jones, and D. E. Anderson. 2010. Effect of nitrogen supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming corn-based diets<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 88.
- Broderick, G. A. 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 1370-1381.
- Chen, S., P. Paengkoum, X. Xia, and P. Na-Lumpang. 2010. Effects of dietary protein on ruminal fermentation, nitrogen utilization and crude protein maintenance in growing Thai-indigenous beef cattle fed rice straw as roughage. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 2396-2400.
- Coelho da Silva, J. F., and M. I. Leão. 1979. Fundamentos de nutrição dos ruminantes. Piracicaba: Livrocetes.
- Chizzotti, M. L., S. C. Valadares Filho, R. F. Valadares, F. H. M. Chizzotti, J. M. S. Campos, M. I. Marcondes, and M. A. Fonseca. 2006. Intake, digestibility and

- urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:1813-1821.
- Detmann, E., É. E. L. Valente, E. D. Batista, and P. Huhtanen. 2014. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Livestock Science* 162: 141-153.
- Detmann, E.; Paulino, M.F and Valadares Filho, S.C. 2010b. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: *Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 7, Viçosa. p 191-240.
- Detmann, E., and S. C. Valadares Filho. 2010a. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 62: 980-984.
- Detmann, E., M. A. Souza, S. C. Valadares Filho, T. T. Berchielli, L. S. Cabral, M. M. Ladeira, M. A. Souza, A. C Queiroz, E. O. S. Saliba, D. S. Pina, and J. A. G. Azevedo. 2012. *Métodos para análise de alimentos*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Suprema, Visconde do Rio Branco-MG.
- Dong, R. L., G. Y. Zhao, L. L. Chai, and K. A. Beauchemin. 2014. Prediction of urinary and fecal nitrogen excretion by beef cattle<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 92.
- Dung, D. V., W. W. Shang, and W. Yao. 2014. Effects of crude protein level in concentrate and concentrate level in diet on in vitro fermentation. *Asian-Australian Journal Animal Science.* 27: 797-805.
- Euclides Filho, K., V. P. B. Euclides, G. R. d. Figueiredo, and R. A. Barbosa. 2001. Eficiência bionutricional de animais Nelore e seus mestiços com Simental e Aberdeen Angus, em duas dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 77-82.
- France, J., and R. C. Siddons. 1986. Determination of digesta flow by continuous market infusion. *Journal of Theoretical Biology* 121: 105-119.
- Grings, E.E., R. E. Roffler, D. P. Deitelhoff. 1991. Response of dairy cows in early lactation to additions of cottonseed meal in alfafa-based diets. *Journal of Dairy Science* 74 : 2580-2587.
- Huhtanen, P., P. G. Brotz, and L. D. Satter. 1997. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *Journal of Animal Science.* 75.
- Klemesrud, M. J., T. J. Klopfenstein, and A. J. Lewis. 2000. Metabolizable methionine and lysine requirements of growing cattle. *Journal Animal Science* 78:199–206

- Leão, M. 2002. Metodologias de coletas de digestas omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- Leão, M., and J. Coelho da Silva. 1980. Técnicas de fistulação de abomaso em bezerros. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia. p 37.
- Lee, K. S., and I. Tasaki. 1977. Effects of methionine supplementation on amino acid concentration of intestinal digesta and on its absorption from the small intestine in goats fed a urea diet. *Journal Zootech. Science*. 48:474–480.
- Loest., C. A., E. C. Titgemeyer, G. St-Jean, D. C. Van Metre, and J. S. Smith. 2002. Methionine as a methyl group donor in growing cattle. *Journal Animal Science* 80:2197–2206.
- Marcondes, M. I., S. C. Valadares Filho, I. M. Oliveira, P. V. R. Paulino, R. F. D. Valadares and E. Detmann. 2011. Eficiência alimentar de bovinos puros e mestiços recebendo alto ou baixo nível de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 1313-1324.
- Muscher, A. S., B. Schröder, G. Breves, and K. Huber. 2010. Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 88.
- Noftsgger, S., and N. R. St-Pierre. 2003. Supplementation of Methionine and Selection of Highly Digestible Rumen Undegradable Protein to Improve Nitrogen Efficiency for Milk Production<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 86: 958-969.
- NRC. 1985. *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC. 2000. *Nutrient requirements of beef cattle*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Obeid, J.A., O. G. Pereira, D. H. Pereira, S. C. Valadare Filhos, I. P. Carvalho, J. M. Martins. 2006. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: consumo, digestibilidade e desempenho produtivo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:2434-2442.
- Pazdiora, R., R. Pacheco, I. Brondani, D. Alves Filho, L. Menezes, A. Callegaro, L. Pizzuti, M. Weise, A. Mayer, and D. Borchate. 2014. Frequências do fornecimento do alimento no desempenho de vacas e novilhas em confinamento. *Arquivos de Zootecnia* 63: 3-12.

- Prates, L. L. 2015. Utilização da  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ -ureia infundida intravenosamente em bovinos Nelore. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Russell, J.B., J. D. O'Connor, D. J. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal Animal Science* 70:3551-3561.
- Scholljegerdes, E. J., P. A. Ludden, and B. W. Hess. 2004. Site and extent of digestion and amino acid flow to the small intestine in beef cattle consuming limited amounts of forage. *Journal Animal Science* 82:1146-1156.
- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. *British Journal of Nutrition* 50: 463-470.
- Tamminga, S., and J. D. Oldham. 1980. Amino acid utilisation by dairy cows. II. Concept of amino acid requirements. *Livestock Production Science* 7: 453-463.
- Tas, M. V., R. A. Evans, and R. F. E. Axford. 1981. The digestibility of amino acids in the small intestine of the sheep. *British Journal of Nutrition* 45: 167-174.
- Titgemeyer, E. C., N. R. Merchen, L. L. Berger, and L. E. Deetz. 1988. Estimation of lysine and methionine requirements of growing steers fed corn silage-based or corn-based diets. *Journal Dairy Science* 71:421-434.
- Valadares Filho, S. C., M. I. Marcondes, M. L. Chizzotti, and P. V. R. Paulino. 2010. Nutrient requirements of zebu beef cattle - BR CORTE. Suprema Gráfica e Editora, Viçosa-MG.
- Valadares, R. F. D., L. C. Gonçalves, N. M. Rodrigues, S. C. Valadares Filho, and I. B. Sampaio. 1997. Protein levels in cattle diets. 4. Ruminal ammonia N concentration, plasma urea N, and urea and creatine excretions. *Revista Brasileira de Zootecnia* 26: 1270-1278.
- Van Soest, P. et al. 1982. A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. In: Protein requirements for cattle: Symposium. Oklahoma State Univ Stillwater.
- Waldrip, H. M., R. W. Todd, and N. A. Cole. 2013. Prediction of nitrogen excretion by beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Animal Science* 91: 123.
- Yuangklang, C., K. Vasupen, S. Wongsuthavas, and S. Bureenok. 2010. Effect of Protein Level on Nutrient Digestion and Nitrogen Utilization in Beef Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 1776-1779.

Zanetti, D. 2014. Exigências nutricionais, frequência de alimentação e níveis de cálcio e fósforo para bovinos Holandês x Zebu em confinamento. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.

## **CAPÍTULO 2**

### **RESUMO**

**MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. Utilização de  $^{15}\text{N}$  e bases purinas para a quantificação da síntese microbiana e**

**digestibilidade intestinal da proteína bruta microbiana de zebuínos.** Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Coorientadores: Márcio de Souza Duarte e Marcos Inácio Marcondes.

O objetivo desse estudo foi quantificar a síntese de proteína bruta (PB) microbiana utilizando  $^{15}\text{N}$  e bases purinas (BP) e avaliar a digestibilidade intestinal verdadeira da PB total e da PB microbiana em bovinos alimentados com três níveis dietéticos de PB. Oito bovinos, sendo quatro Nelore (com peso corporal (PC) médio inicial de  $241,3 \pm 43$  Kg e 14 meses de idade) e quatro cruzados Angus x Nelore (com PC médio inicial  $263,4 \pm 47$  Kg e 14 meses de idade), canulados no rúmen e íleo, foram distribuídos em dois quadrados latinos  $4 \times 4$  sendo um para cada grupo genético. O experimento foi conduzido em quatro períodos de 17 dias (10 dias de adaptação e sete dias de amostragens). As quatro dietas foram constituídas de níveis crescentes de PB: 10; 12 ou 14% oferecidas à nível de consumo voluntário, e dieta de consumo restrito com 12% PB, sendo constituídas de 50% de silagem de milho e 50% de concentrado com base na MS. O fluxo de MS omasal foi obtido utilizando o sistema de dois indicadores: Co-EDTA para a fase líquida e de pequenas partículas e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) para a fase de grandes partículas. Para estimar o fluxo da MS ileal foi utilizada a FDNi como indicador único. Foi realizada uma infusão contínua de 7,03 g de sulfato de amônio enriquecido com 10% de átomos de  $^{15}\text{N}$ , fornecendo uma quantidade de 150 mg de  $^{15}\text{N}$  diariamente para cada animal. As relações  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  nas bactérias associadas à fase líquida (BAL) e à fase sólida (BAP) isoladas no omaso foram similares ( $P > 0,05$ ). Houve efeito linear negativo ( $P < 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre a relação  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  das bactérias isoladas no omaso. A síntese de PB microbiana foi maior ( $P < 0,05$ ) para animais cruzados em relação aos Nelore. Houve efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) para a síntese de PB microbiana em resposta aos níveis crescentes de PB. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre  $^{15}\text{N}$  e bases purinas (BP) para a produção e eficiência microbiana. A digestibilidade da PB microbiana estimada com BP e  $^{15}\text{N}$  foi próxima ao valor de 80% reportado pelo NRC e BR Corte. A digestibilidade verdadeira da PB total estimada foi de 75,4%. Os resultados indicam que as BP podem ser utilizadas como indicador microbiano alternativo ao  $^{15}\text{N}$  e que a digestibilidade intestinal da PB microbiana no intestino delgado é de aproximadamente 80% em zebuínos.

## **ABSTRACT**

MARIZ, Lays Débora Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016.  
**Quantification of ruminal microbial growth and microbial crude protein intestinal**

**digestibility in Zebu cattle using  $^{15}\text{N}$  and purine bases.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Co-advisers: Márcio de Souza Duarte and Marcos Inácio Marcondes.

The objective of this study was to evaluate the effect of genetic groups and dietary crude levels (CP) on intake, the site of dietary constituents digestion, nitrogen excretion and absorption of amino acids from the small intestine of beef cattle. Additionally, the objective was to quantify the microbial protein synthesis using  $^{15}\text{N}$  and purine bases (BP) and to evaluate the true intestinal digestibility of total protein and microbial protein of beef cattle fed three dietary CP levels. Eight animals, being four Nellore ( $241 \pm 43$  kg of initial BW; 14 months) and four crossed Angus x Nellore ( $263 \pm 47$  kg of initial BW; 14 months), with ruminal and ileum cannulas were distributed into two  $4 \times 4$  Latin squares, one for each genetic group. Four experimental periods lasting 17 d each were completed with 10 d for adaptation and 7 d for sampling. The diets had increasing levels of CP: 10, 12, or 14%, offered ad libitum, and a 12% CP fed at maintenance level. The diets contained 50% corn silage and 40% concentrate (on a dry matter (DM) basis). Total fecal and urine collection of each animal was performed for three consecutive days. A total of eight digesta samples were collected from the omasum and ileum at 9h intervals over a 3 d period. The double (Co-EDTA and NDFi) and single marker systems (NDFi) were used to calculate the digesta flow of the omasum and ileum, respectively. Continuous infusion of 7.03 g of ammonium sulfate enriched with 10 atom%  $^{15}\text{N}$  was included in the rumen for each animal in all experimental periods. The  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  ratio was similar ( $P > 0.05$ ) between liquid - (LAB) and solid-associated (SAB) bacteria isolated in the omasum. There was a negative linear effect ( $P < 0.05$ ) of dietary CP levels on the  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  ratio in isolated bacteria in the omasum. The crossbred animals had a greater microbial protein synthesis ( $P < 0.05$ ) than Nellore. There was a positive linear effect ( $P < 0.05$ ) of microbial protein synthesis in response to increasing CP levels. There was no difference ( $P > 0.05$ ) between  $^{15}\text{N}$  and purine bases (BP) for microbial efficiency. The digestibility of microbial CP estimated by BP and  $^{15}\text{N}$  was close to the value of 80% reported by the NRC and BR Corte. The total true digestibility of CP estimated was 75.4%. The results indicate that BP can be used as an alternative microbial indicator to  $^{15}\text{N}$  and intestinal digestibility of microbial protein from small intestine is about 80% in Zebu cattle.

## **1. Introdução**

A proteína microbiana sintetizada no rúmen representa a principal fonte de aminoácidos metabolizáveis absorvidos pelos ruminantes (Fonseca et al., 2014), sendo

que a maioria dos microrganismos que fluem para o intestino delgado são de origem bacteriana (NRC, 2000). Portanto, a quantificação da síntese microbiana no rúmen é de grande importância para a nutrição de ruminantes (Broderick e Merchen, 1992). A quantificação da síntese microbiana sob diferentes condições dietéticas permite o adequado balanceamento dos compostos nitrogenados no rúmen, com consequente reduções nos custos e perdas de N nas dietas.

Diversos indicadores microbianos externos e internos tem sido utilizados para estimar a produção de proteína microbiana, dentre estes,  $^{15}\text{N}$  e bases purinas (BP) são amplamente utilizados (Rotta et al., 2014). Estudos envolvendo os fatores que afetam a síntese e eficiência microbiana necessitam de mensurações acuradas da produção microbiana (Reynal et al., 2005), porém nenhum indicador microbiano tem sido considerado completamente satisfatório (Broderick e Merchen, 1992).

Na literatura dados comparando  $^{15}\text{N}$  e BP são inconsistentes (Carro e Miller, 2002). A utilização de  $^{15}\text{N}$  como indicador microbiano apresentou estimativas de síntese microbiana similares (Calsamiglia et al., 1996; Reynal et al., 2005), maiores (Firkins et al., 1987; Rotta et al., 2014) e menores (Carro e Miller, 2002) em comparação às BP. As peculiaridades de cada técnica, assim como os procedimentos de análises explicam as variações obtidas nos diferentes estudos (Broderick e Merchen, 1992; Carro e Miller, 2002). Apesar de bem estabelecido o uso de  $^{15}\text{N}$ , o alto custo da técnica e a necessidade de utilização de equipamentos mais sofisticados, tornam o uso de BP uma alternativa promissora ao  $^{15}\text{N}$ .

Em recentes estudos sob condições tropicais, tem sido reportados o uso em excesso de proteína nas dietas de bovinos de corte (Amaral et al., 2012; Costa e Silva., 2011), indicando que o sistema de exigências de zebuínos puros e cruzados do Brasil -

BR Corte (Valadares et al., 2010) necessita de novos ajustes para evitar perdas de N e aumentar a eficiência do seu uso de N no metabolismo dos animais.

O BR Corte considera o valor de 80% para a digestibilidade intestinal da PB microbiana, sendo este valor descrito pelo sistema americano NRC (2000) que tem como base a utilização de raças taurinas. Apesar da raça Nelore constituir grande parte do rebanho bovino brasileiro, na literatura consultada, não foram obtidos valores de digestibilidade intestinal da proteína microbiana.

A hipótese deste estudo é que a síntese de proteína microbiana pode ser obtida adequadamente pelas BP e que o valor de 80% para a digestibilidade intestinal da PB microbiana pode não ser adequado. O objetivo deste estudo foi quantificar a síntese de PB microbiana utilizando  $^{15}\text{N}$  e BP e avaliar a digestibilidade intestinal verdadeira PB total e da PB microbiana em zebuínos puros (Nelore) e cruzados (Angus x Nelore) alimentados com três níveis dietéticos de PB.

## **2. Material e Métodos**

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), protocolo número 06/2013. A técnica de fistulação ileal utilizada nos animais deste estudo, foi descrita por Leão e Coelho da Silva (1980).

### **2.1. Animais, delineamento experimental e dietas**

A pesquisa foi conduzida no Confinamento Experimental e no Laboratório de Nutrição de Ruminantes do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

Oito bovinos, sendo quatro Nelore (com peso corporal (PC) médio inicial de

241,3±43Kg e 14 meses de idade) e quatro cruzados Angus x Nelore (com PC médio inicial 263,4±47 Kg e 14 meses de idade), canulados no rúmen e íleo, foram distribuídos em dois quadrados latinos 4 x 4 sendo um para cada grupo genético. O experimento foi conduzido em quatro períodos de 17 dias. Cada período foi constituído de 10 dias de adaptação dos animais às dietas experimentais e sete dias de amostragens. Os animais foram alojados em baias individuais (8m<sup>2</sup>), providas de comedouro e com livre acesso à água durante o experimento.

As quatro dietas experimentais foram constituídas de níveis crescentes de PB: 10; 12 ou 14% oferecidas à nível de consumo voluntário, e dieta de consumo restrito à 1,2% do PC com 12% PB. As dietas foram constituídas de 50% de silagem de milho (SM) e 50% de concentrado com base na matéria seca (MS). Para os animais em consumo voluntário, a quantidade total diária de SM foi fornecida às 7h00 h com a metade da quantidade diária do concentrado, sendo a outra metade do concentrado fornecida às 15h00 (Pazdiora et al., 2014; Zanetti, 2014). O consumo foi ajustado para manter as sobras entre 5 a 10% da quantidade oferecida. Os animais em manutenção receberam a alimentação uma vez ao dia, às 7h00.

As dietas experimentais foram formuladas com base no sistema de exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados (BR Corte) descrito por Valadares Filho et al. (2010). A proporção dos ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química e ingredientes das dietas

Item	Dieta (%PB)		
	10%	12%	14%
Ingrediente	% da MS		
Silagem de Milho	50,0	50,0	50,0
Milho Gão	39,7	39,6	39,6

Farelo de Trigo	5,9	3,0	0,0
Uréia/SA + Farelo de Soja <sup>1</sup>	2,2	5,3	8,3
Cloreto de sódio	0,5	0,5	0,5
Mistura mineral <sup>2</sup>	0,5	0,5	0,5
Bicarbonato de Sódio	0,8	0,8	0,8
Óxido de Magnésio	0,3	0,3	0,3
Composição química			
MO	95,4	94,9	94,4
PB	9,9	12,1	14,2
PDR <sup>3</sup>	66,8	69,6	71,6
EE <sup>4</sup>	4,0	4,0	4,0
FDN <sub>cp</sub> <sup>5</sup>	31,4	30,7	29,9
CNF <sup>6</sup>	50,7	49,4	48,2

<sup>1</sup>Uréia/SA + Farelo de Soja = 83,3% de farelo de soja e 16,7% de uréia + sulfato de amônio. <sup>2</sup>Mistura mineral = 223 g/Kg de cálcio; 174 g/Kg de fósforo; 24 g/Kg de enxofre; 100 mg/Kg de cobalto; 1.250,0 mg/Kg de cobre; 1.795,0 mg/Kg de ferro; 90 mg/Kg de iodo; 2.000,0 mg/Kg de manganês; 15,00 mg/kg de selênio; 5.270,00 mg/kg de zinco e 1.740,00 mg/kg de flúor. <sup>3</sup>PDR = proteína degradável no rúmen, estimada de acordo com a tabela CQBAL 3.0; <sup>4</sup>EE = Extrato etéreo. <sup>5</sup>FDN<sub>cp</sub> = Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína. <sup>6</sup>CNF = Carboidratos não fibrosos.

## 2.2. Procedimentos experimentais e preparação das amostras de digesta omasal e ileal

Do 11° ao 13° dia de cada período experimental foram realizadas amostragens total de fezes e de urina. Do 14° ao 16° dia de cada período experimental foram realizadas amostragens da digesta omasal e ileal. Adicionalmente, os alimentos e sobras foram amostrados.

Para estimar o fluxo da digesta omasal foi utilizado o sistema de indicador duplo (France e Siddons, 1986), no qual foram utilizados os indicadores Co-EDTA associado às fases de líquida e pequenas partículas e a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) à fase de grandes partículas. Para estimar o fluxo da MS ileal foi utilizado o FDNi como indicador do sistema único.

Foram realizadas infusões contínuas do Co-EDTA (5,0 g/d de Co-EDTA ou 0,7 g de Co), diluídas em 2,7 L de água via fístula ruminal com o auxílio de duas bombas peristálticas (model BP-600.4; Milan Scientific Equipment, Inc., Colombo, Paraná, Brazil), a partir do 11° dia de cada período experimental até a última amostragem da

digesta no dia 16. Foi incluída na solução previamente relacionada, 7,03 g de sulfato de amônio enriquecido com 10% de átomos de  $^{15}\text{N}$  [sulfato de amônio ( $^{15}\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$ ] [Sigma Aldrich (Isotec), Miamisburg, OH], fornecendo uma quantidade de 150 mg de  $^{15}\text{N}$  diariamente para cada animal. A infusão do sulfato de amônio foi realizada até o último dia de coleta de digesta e teve início 60 horas antes da primeira coleta de digesta, em todos os períodos experimentais, para resultar em distribuição uniforme do  $^{15}\text{N}$  para incorporação do  $^{15}\text{NH}_3$  no pool microbiano ruminal (Broderick and Merchen, 1992). Antes de iniciar a infusão do  $^{15}\text{N}$ , em cada período experimental, uma amostra do conteúdo ruminal foi coletada de cada animal e armazenada à  $-20^\circ\text{C}$  para determinação do  $^{15}\text{N}$  presente na digesta ruminal (background).

Um total de 8 coletas de digesta omasal e ileal foram obtidas do 14° ao 16° dia de cada período, com intervalos de nove horas entre as coletas de cada dia. No dia 14 as coletas foram realizadas às 6h00 e 15h00, no dia 15 às 0h00, 9h00 e 18h00 e no dia 16 às 3h00, 12h00 e 21h00.

Foi utilizada a técnica de amostragem omasal descrita por Huhtanen et al. (1997) e adaptada por Leão (2002). As amostragens e preparações das amostra omasal foram detalhadas em (Mariz et al., 2013). A amostragem ileal foi realizada com o auxílio de sacos plásticos adaptados na extremidade do tubo da fístula ileal até que a digesta fluísse normalmente. Após as amostragens, todas as amostras de digesta omasal e ileal foram imediatamente congeladas à  $-80^\circ\text{C}$  e posteriormente liofilizadas e moídas em moinhos de facas (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA) à 2 e 1 mm, sendo armazenadas para posteriores análises.

Para o isolamento das bactérias, foi utilizado os procedimentos de Reynal et al. (2005) com modificações sugeridas por Krizsan et al. (2010). As amostras foram compostas por animal a cada quatro amostragens (6h00, 15h00, 0h00, 9h00, e 18h00,

3h00, 12h00 e 21h00 horas) de aproximadamente 300 ml e 200 mL de digesta omasal e ileal respectivamente, resultando em 1,2 L de amostra composta de digesta omasal e 800 mL de digesta ileal. As amostras compostas, foram filtradas através de filtro de nylon 100 µm com 44% de área de superfície de poro (Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Switzerland) e o material sólido remanescente sobre o filtro foi lavado com 800 mL de solução salina (0,9% NaCl). O filtrado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min a 5°C para isolamento de bactérias associadas à fase líquida (BAL). Em seguida, o sobrenadante de cada amostra composta foi transferido para tubos e re-centrifugado a 11.250 x g por 30 min a 5°C, sendo o sobrenadante resultante descartado. O pellet remanescente foi re-suspenso em 20 mL de tampão McDougall (McDougall, 1948) e re-centrifugado a 16.250 x g por 20 min a 5°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado em bandejas metálicas com tampa a -40°C para posterior obtenção de BAL.

Para o isolamento de bactérias associadas às partículas (BAP), o material sólido retido no filtro de 100 µm durante a coleta e os pellets formados a partir da primeira etapa da centrifugação para isolamento de BAL foram transferidos para recipientes de 1L, aos quais foram adicionados 700 mL de solução salina (0,90% NaCl) contendo 0,1% (vol./vol.) de Tween 80. O conteúdo foi homogeneizado e mantido durante uma noite a 4°C. No dia seguinte, o conteúdo foi filtrado através do filtro de nylon 100 µm e o filtrado foi submetido aos mesmos procedimentos de centrifugação descritos para o isolamento de BAL. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi armazenado em bandejas metálicas com tampa a -40°C. Os pellets resultantes do isolamento de BAL e BAP foram armazenados a -80°C, foram liofilizados (Freezemobile 24, Virtis, Gardiner, NY) e, em seguida, macerados com um pilão e um almofariz plásticos e armazenados em recipientes plásticos com tampa a -20°C para posteriores análises químicas de MS, matéria orgânica (MO), PB, BP e <sup>15</sup>N.

### 2.3. Análises químicas

As amostras de alimentos, sobras, fezes e amostras liofilizadas das fases de digesta omasal e ileal, foram analisadas seguindo os procedimentos descritos por Detmann et al. (2012) para quantificação da MS (INCT-CA G-003/1); PB (INCT-CA N-001/1); cinzas (INCT-CA M-001/1) e FDN (INCT-CA F-002/1) corrigida para cinzas (INCT-CA M-002/1) e proteína (INCT-CA N-004/1). As amostras de alimentos, sobras e amostras liofilizadas das fases de digesta, processadas em peneira de 2mm, foram avaliadas quanto ao teor de FDN<sub>i</sub> pelo método INCT-CA F-009/1, utilizando-se sacos F57 (Ankom<sup>®</sup>) em procedimento de incubação in situ por 288 horas.

A quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) foi realizada de acordo com Detmann e Valadares Filho (2010) em que  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%MM]$  em que: FDN<sub>cp</sub> = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína.

As amostras das digestas e do indicador Co-EDTA, foram avaliadas quanto a sua concentração de cobalto em espectrofotômetro de absorção atômica (Spctr AA-800; Varian spectrometer, Harbor City, CA). A solução mineral foi preparada segundo método INCT-CA M-004/1 descritos por Detmann et al. (2012).

As análises de BP foram realizadas nas fases isoladas das bactérias e nas digestas omasal e ileal, de acordo com Ushida et al. (1985) com modificações de Zinn and Owens (1986). Para as análises de <sup>15</sup>N, as amostras de BAL, BAP, digesta omasal e ileal foram analisadas de acordo com Machado et al. (2013). O excesso de átomos de <sup>15</sup>N foi mensurado utilizando um espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta S; Finnigan MAT, Bremen, Germany). Amostras contendo aproximadamente 100 µg de N foram pesadas e colocadas em cápsulas de 5 a 8mm para as futuras leituras. A taxa dos

isótopos estáveis do mesmo elemento químico ( $^{15}\text{N}$ : $^{14}\text{N}$ ) foi avaliada em termos de  $\Delta$  per mil, de acordo com padrão internacional específico.

#### 2.4. Análise Estatística

A composição bacteriana foi comparada em esquema de parcelas subdivididas por intermédio do PROC MIXED do SAS (versão 9.1) utilizando-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + Qi + Nj + Bk + BN_{jk} + A(i)l + P(i)m + E_{ijklm} + \varepsilon_{ijlm}$$

em que  $Y_{ijklm}$  = variável dependente,  $\mu$  = media geral,  $Qi$  = efeito aleatório do quadrado latino;  $Nj$  = efeito fixo dietético de PB  $j$ ,  $B_k$  = efeito da bactéria isolada (BAL e BAP)  $k$ ,  $BN_{jk}$  = efeito fixo da interação entre o nível dietético de PB  $j$  e a bactéria isolada  $k$ ,  $A_{(i)l}$  = efeito aleatório do animal  $l$  aninhado ao quadrado latino  $i$ ,  $P_{(i)m}$  = efeito aleatório do período  $m$  aninhado ao quadrado latino  $i$ ,  $E_{ijklm}$  = efeito residual aleatório entre e a bactéria isolada dentro das unidades experimentais;  $\varepsilon_{ijlm}$  = erro aleatório assumindo-se como normal e independentemente distribuído (NID)  $(0; \sigma^2_\varepsilon)$ .

As variáveis relativas à síntese e eficiência microbiana foram comparadas em esquema de parcelas subdivididas por intermédio do PROC MIXED do SAS (versão 9.1) utilizando-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + Gi + Nj + Ik + NI_{jk} + IG_{ki} + NG_{ji} + ING_{ijk} + A(i)l + P(i)m + E_{ijkl} + \varepsilon_{ijlm}$$

em que  $Y_{ijklm}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $Gi$  = efeito aleatório do grupo genético confundido com o quadrado latino;  $Nj$  = efeito fixo do nível de PB da dieta  $j$ ,  $M_k$  = efeito fixo do indicador microbiano ( $^{15}\text{N}$  e BP)  $k$ ,  $NI_{jk}$  = efeito fixo da interação entre nível de PB  $j$  e o indicador microbiano  $k$ ,  $IG_{ki}$  = efeito fixo da interação entre o indicador microbiano  $k$  e o grupo genético  $i$ ,  $NG_{ji}$  = efeito fixo da interação entre nível de PB  $j$  e o grupo genético  $i$ ,  $iA_{(i)l}$  = efeito aleatório do animal  $l$  aninhado ao grupo

genético  $i$ ,  $P_{(i)l}$  = efeito aleatório do período  $m$  aninhado ao grupo genético  $i$ ,  $E_{ijklm}$  = efeito residual aleatório entre e o indicador microbiano realizada dentro das unidades experimentais;  $\varepsilon_{ijkl}$  = erro aleatório assumindo-se como normal e independentemente distribuído (NID)  $(0; \sigma^2_\varepsilon)$ .

Em caso de efeitos significativos para os níveis dietéticos de proteína bruta, os seguintes contrastes ortogonais foram estudados: C1: consumo restrito vs. consumo livre, C2: efeito linear dos níveis dietéticos de proteína bruta 10, 12 e 14% e C3: efeito quadrático dos níveis proteicos 10, 12 e 14%. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

### **3.0. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Composição química das bactérias e relação $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$**

A composição química e o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas bactérias (BAL e BAP) estão apresentadas na Tabela 2. Não houve interação significativa ( $P > 0.05$ ) entre bactérias isoladas nas duas fases e níveis de PB na dieta para o N (% da MS), N (% da MO) e a relação  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ .

Tabela 2. Efeito dos níveis de proteína sobre a composição e relação  $^{15}\text{N}:$  $^{14}\text{N}$  nas bactérias isoladas

Item <sup>1</sup>	Bactéria		Nível de PB <sup>2</sup>				EPM	Efeito principal <sup>3</sup>			Contraste <sup>4</sup>		
	BAL	BAP	CR	10%	12%	14%		B	N	B x N	CR x CV	L	Q
Amostragem no omaso													
N; % da MS	6,35	5,90	6,22	5,89	6,11	6,28	0,11	<0,01	<0,01	0,45	0,16	<0,01	0,82
N; % da MO	7,51	7,17	7,48	7,06	7,29	7,51	0,12	<0,01	<0,01	0,20	0,06	<0,01	0,97
$^{15}\text{N}:$ $^{14}\text{N}$ ; $\Delta$ por mil	462,69	454,41	613,97	474,16	436,81	309,26	28,71	0,12	<0,01	0,72	<0,01	<0,01	0,08
Amostragem no íleo													
N; % da MS	5,00	4,76	4,90	4,84	4,81	4,98	0,08	<0,01	0,47	0,95	-	-	-
N; % da MO	6,35	6,36	6,34	6,25	6,30	6,52	0,13	0,87	0,35	0,99	-	-	-

<sup>1</sup>BAL = bactéria associada à fase líquida; BAP = bactéria associada à fase sólida. <sup>2</sup>CR = consumo restrito. <sup>3</sup>B = bactéria; N = nível de proteína bruta na dieta; <sup>4</sup>L= efeito linear; Q = efeito quadrático.

As bactérias associadas à fase líquida (BAL) apresentaram maiores ( $P < 0,05$ ) teores de N (% da MS) em relação à BAP, independentemente do local de amostragem (omaso ou íleo). Porém, a literatura têm demonstrado inconsistência sobre as diferenças na composição entre BAL e BAP. Reynal et al. (2005) observaram que as concentrações dos aminoácidos individuais metionina e triptofano foram 24% e 11% maiores na BAL em relação à BAP. No entanto, Machado et al. (2013), trabalhando com contaminação microbiana em resíduos de forrageiras tropicais incubados no rúmen, não observaram diferenças na composição de BAL e BAP.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos níveis protéicos sobre o teor de N (% da MS) nas bactérias isoladas no omaso. O teor de N aumentou de 5,89% para 6,28% entre os níveis de 10% e 14% de PB. Colmenero e Broderick (2006) também observaram efeito linear positivo no conteúdo de N das bactérias isoladas no rúmen em resposta aos níveis crescentes proteicos. Ao contrário, Prates (2015) não observou efeito dos níveis dietéticos proteicos sobre os teores de N (% da MS) das bactérias isoladas e encontrou os valores de 6,85; 7,36; 7,18 e 7,60% para os níveis de 9; 11; 13 e 15% de PB nas dietas de animais Nelore.

O N (% da MO) foi maior ( $P < 0,05$ ) para a BAL em relação à BAP amostradas no omaso. O N (%MO) aumentou de 7,06 para 7,51% entre os níveis de 10 e 14% de PB. Rotta et al. (2014) também observaram diferenças no N (% MO) entre BAL e BAP amostradas no omaso, sendo este teor maior na BAL (8,2%) em relação à BAP (7,8%). Os teores de N (% da MO) foram similares ( $P > 0,05$ ) entre as bactérias isoladas na digesta ileal, demonstrando que as diferenças no conteúdo de N das bactérias foram removidas quando a MS foi descontada do conteúdo de cinzas.

A relação  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre BAL e BAP isoladas na digesta omasal. A similaridade no enriquecimento de BAL e BAP, também foi encontrada em outros estudos com bovinos (Krizsan et al., 2010; Rotta et al., 2014). De forma divergente, diferenças no enriquecimento entre as bactérias isoladas tem sido reportadas (Carro e Miller, 2002; Reynal et al., 2005) e geralmente atribuídas às diferenças na habilidade dos dois grupos de bactérias em utilizar a amônia livre como fonte de N, implicando na necessidade de avaliar a contribuição da BAL e BAP no fluxo microbiano separadamente, fato que não foi encontrado nessa pesquisa.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos níveis dietéticos de PB sobre a relação  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  das bactérias. Nos animais em consumo restrito o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  foi 51% maior ( $P < 0,05$ ) em relação aos animais no consumo voluntário. O enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas bactérias foi menor com o nível de 14% de PB em relação aos níveis de 10% e 12% de PB, que não diferiram entre si. O menor enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  nas bactérias em dietas com maiores concentrações de proteína pode ser justificado pela diluição do  $^{15}\text{N-NH}_3$  com o provável aumento de  $\text{NH}_3$  formado à partir da maior degradação proteica em resposta ao aumento do nível de PB da dieta (Colmenero e Broderick, 2006).

### 3.2. Síntese e eficiência de proteína microbiana

Não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre o grupo genético, nível dietético de PB e indicador microbiano (Tabela 3). A síntese de PB microbiana foi maior ( $P < 0,05$ ) para animais cruzados em relação aos Nelore. O maior consumo de MS e PB ( $P < 0,05$ ) e também uma tendência ( $P = 0,07$ ) para maior consumo de NDT dos animais cruzados em relação aos animais zebuínos observado neste experimento (dados descritos no capítulo 1), provavelmente proporcionaram maior disponibilidade de substratos degradados no rúmen para a otimização da síntese microbiana.

Tabela 3. Efeito dos grupos genéticos, níveis dietéticos de PB e indicadores microbianos sobre a síntese (g x dia<sup>-1</sup>) e eficiência de proteína microbiana (g x Kg<sup>-1</sup>)

Item <sup>1</sup>	Grupo genético		Nível de PB <sup>2</sup>				Indicador mic. <sup>3</sup>			Contrastes <sup>4</sup>			
	Nelore	Cruzado	CR	10%	12%	14%	BP	<sup>15</sup> N	EPM	CR CV	x	L	Q
PB mic	471,72	532,58	338,34	487,38	572,26	610,62	497,99	506,32	21,28	<0,01	<0,01	0,45	
PB mic/MODR	281,89	241,15	252,12	225,76	293,31	274,89	256,90	266,14	3,70	-	-	-	
PB mic/MOVDR	172,38	156,13	166,51	145,96	175,36	169,30	160,69	167,82	1,45	-	-	-	
PBmic/PB total	77,68	77,86	78,67	79,90	75,44	77,05	76,79	78,74	3,18	-	-	-	

P-valor <sup>5</sup>							
	GG	N	IM	GG x N	N x IM	GG xIM	GG x Nx IM
PB mic	0,02	<0,01	0,72	0,80	0,93	0,98	0,41
PB mic/MODR	0,10	0,08	0,34	0,18	0,53	0,34	0,18
PB mic/MOVDR	0,04	0,06	0,26	0,20	0,57	0,36	0,15
PBmic/PB total	0,95	0,81	0,56	0,28	0,66	0,48	0,21

<sup>1</sup>PBmic = proteína bruta microbiana; PBmic/MODR = proteína bruta microbiana/ matéria orgânica degradável no rúmen; PBmic/MOVDR = proteína bruta microbiana/ matéria orgânica verdadeiramente degradável no rúmen; PBmic/PB total = proteína bruta microbiana/ proteína bruta total. <sup>2</sup>CR = consumo restrito. <sup>3</sup>BP = bases purinas. <sup>4</sup>CV = consumo voluntário; L = efeito linear; Q = efeito quadrático. <sup>5</sup>GG = grupo genético; N = nível dietético de PB; IM = indicador microbiano.

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do grupo genético sobre as eficiências expressas em PB microbiana /matéria orgânica degradada no rúmen (MODR), porém a eficiência considerada em relação à matéria orgânica verdadeiramente degradada no rúmen (MOVDR) foi maior ( $P < 0,05$ ) para os zebuínos puros.

Os animais em consumo restrito apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) síntese de proteína microbiana em relação ao consumo voluntário, que pode ser relacionado ao limitado aporte de substratos disponíveis no rúmen para a síntese microbiana. No consumo restrito a produção microbiana média foi de 338,3 g/ dia enquanto que a média no consumo voluntário foi de 556,75 g/dia.

Houve efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) para a síntese de proteína microbiana em resposta aos níveis crescentes de PB. A disponibilidade de N no rúmen pode limitar a síntese de proteína microbiana (Galyean e Tedeschi, 2014), portanto o aumento da síntese de proteína microbiana pode estar relacionado ao maior aporte de proteína degradável nas dietas com maiores concentrações proteicas nas dietas.

Não foi observado efeito significativo ( $P > 0,05$ ) dos níveis de PB sobre as eficiências de proteína expressas em PBmic/MODR; PBmic/MOVDR e na relação PB microbiana/PBtotal. Geralmente não há efeito de dietas sobre a eficiência microbiana, pois o aumento na síntese se associa com o aumento no consumo de energia.

### 3.3. Indicadores microbianos e digestibilidade intestinal da proteína

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os indicadores microbianos para a síntese e a eficiência microbiana. A similaridade entre os indicadores microbianos, indica que o  $^{15}\text{N}$  e as BP são adequados para estimar a síntese e eficiência de proteína microbiana. Devido ao alto custo da técnica de  $^{15}\text{N}$  e a necessidade de utilização de equipamentos

sofisticados, a utilização de BP como alternativa ao uso de  $^{15}\text{N}$ , parece ser promissora pela sua maior facilidade e menores custos.

Estudos comparando diferentes indicadores ainda são inconsistentes. Reynal et al. (2005) concluíram que o  $^{15}\text{N}$  forneceu estimativas mais acuradas e precisas do fluxo de N não amoniacal em relação às BP. Rotta et al. (2014) sugeriram a utilização de  $^{15}\text{N}$  para estimar a síntese microbiana e a eficiência microbiana quando a amostragem for realizada no omaso, porém observou que quando a amostragem é realizada no abomaso, as BP podem ser utilizadas para substituir o  $^{15}\text{N}$ . Os diferentes resultados reportados na literatura, demonstram que estudos comparando as aplicação de diferentes técnicas para estimar a síntese e eficiência proteica ainda são necessários. A falta de padronização dos métodos utilizados nos diferentes estudos dificultam as comparações entre os indicadores (Reynal et al., 2005).

O uso de  $^{15}\text{N}$  é bem estabelecido, e devido a sua distribuição uniforme nas células microbianas, o enriquecimento do  $^{15}\text{N}$  pode não ser fortemente afetado pela lise durante o processo de isolamento das bactérias em relação à técnica de BP (Valadares Filho et al., 2010). Como as BP são quase que exclusivamente localizadas no citoplasma das bactérias, o processo de lise pode resultar em redução da relação N purina:N microbiano e conseqüentemente na superestimação do fluxo de N microbiano (Carro e Miller, 2002). Neste estudo, não foi demonstrada diferença entre os métodos e as estimativas da síntese de proteína microbiana utilizando as BP foram muito próximas em relação ao  $^{15}\text{N}$  (498,0 e 506,3 g/dia), indicando que o processo de isolamento pode não ter afetado significativamente as perdas de purinas.

Ressalta-se que para calcular as exigências de PNDR no sistema de PM estabelecido no em condições tropicais, considera-se que a PB microbiana possui uma digestibilidade intestinal de 80%, sendo estes fatores descritos pelo sistema americano

NRC (2000), o que justifica uma avaliação desses valores em condições de dietas e animais criados no Brasil.

Nas Figuras 1 e 2 estão demonstradas as estimativas das digestibilidades verdadeiras intestinais da PB microbiana. A estimativa da digestibilidade da PB microbiana obtida com as BP foi de 87,4% e com  $^{15}\text{N}$  de 76,2%. Portanto, no presente estudo os valores obtidos foram próximos ao valor de 80% sugerido pelo NRC e pelo BR Corte.

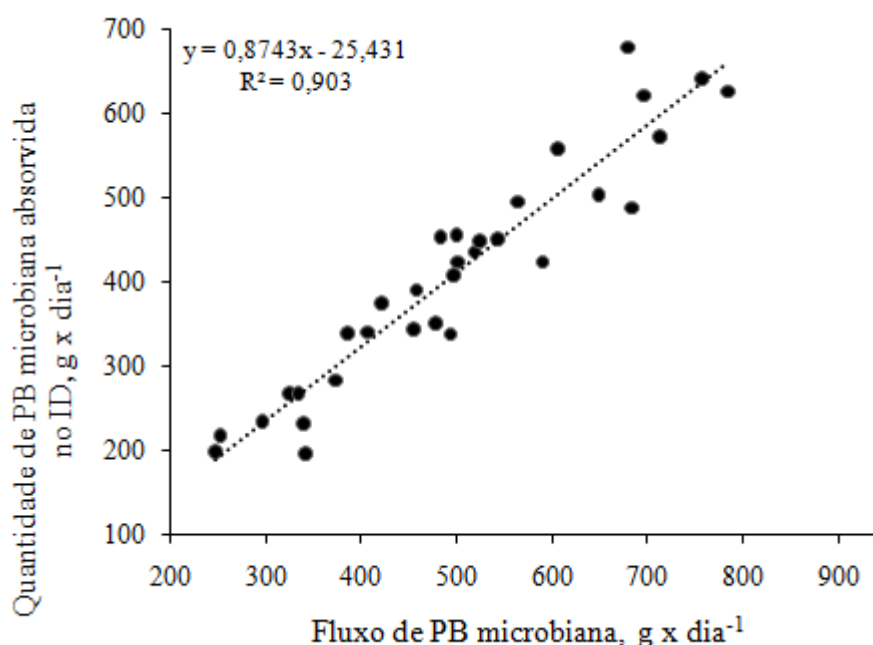


Figura 1. Relação entre a quantidade de proteína bruta (PB) microbiana absorvida no intestino delgado (ID) e o fluxo de PB microbiana obtida com as bases purinas.

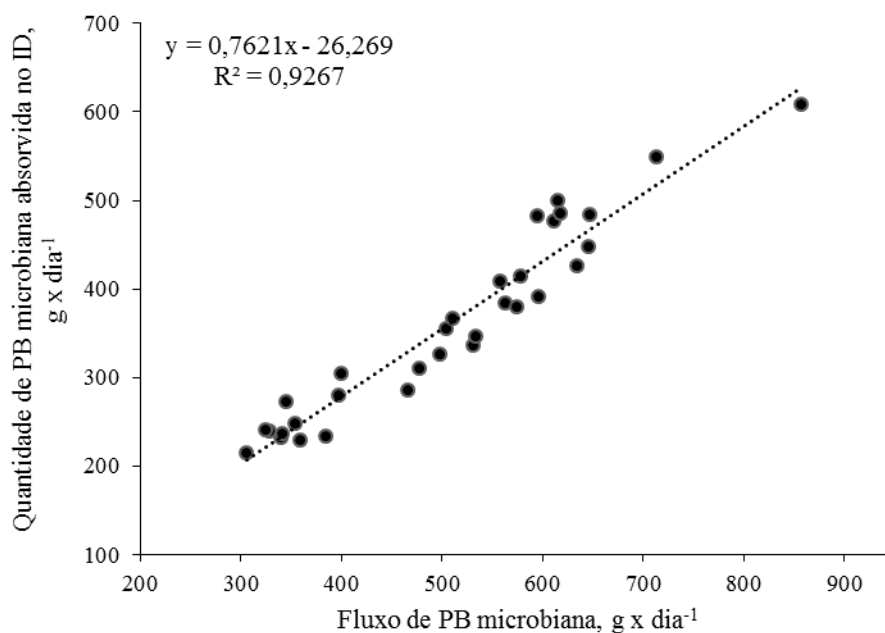


Figura 2. Relação entre a quantidade de proteína bruta (PB) microbiana absorvida no intestino delgado (ID) e o fluxo de PB microbiana obtida com o <sup>15</sup>N.

Nesse estudo, a digestibilidade verdadeira intestinal estimada da PB total foi de 75,4% (Figura 3).

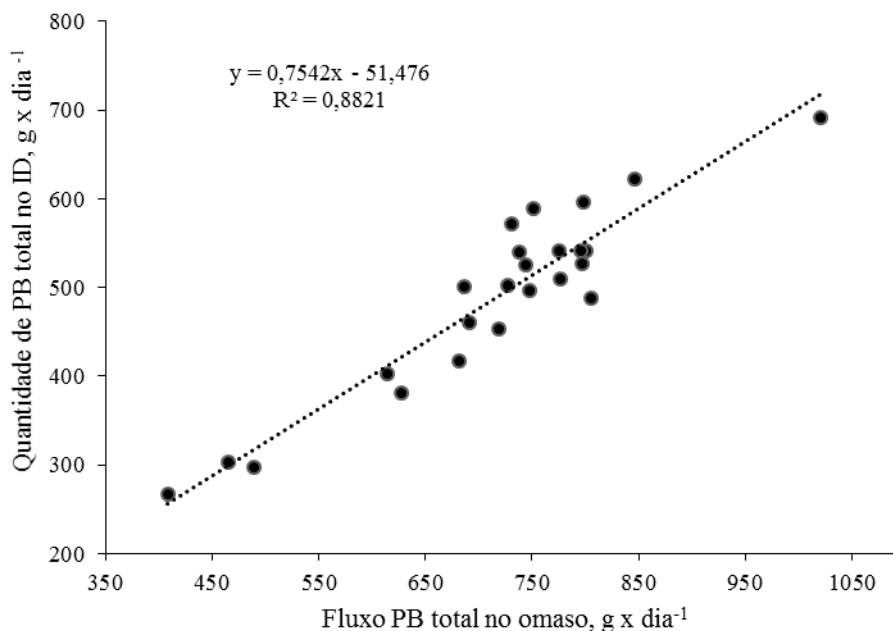


Figura 3. Relação entre a quantidade de proteína bruta (PB) total absorvida no intestino delgado (ID) e o fluxo de PB total no omaso.

Apesar de ter sido verificada proximidade nos valores neste estudo com os reportados pelo NRC e pelo BR Corte; a falta de consistência nos resultados demonstrados na literatura utilizando diferentes indicadores microbianos, demonstram a necessidade de novos estudos para a quantificação da síntese proteica como forma para ajustar os sistemas de PM.

#### **4.0. Conclusão**

Considerando a similaridade nas estimativas de síntese microbiana utilizando os diferentes indicadores e o alto custo da técnica  $^{15}\text{N}$ , as bases purinas podem ser utilizadas como indicador microbiano alternativo ao  $^{15}\text{N}$ . As digestibilidades da PB microbiana estimadas com BP (87,4%) e  $^{15}\text{N}$  (76,2%) em condições tropicais, são próximas ao valor reportado pelo NRC (2000) e adotados pelo BR Corte (2010).

## Referências Bibliográficas

- Amaral, P. M., S. C. Valadares Filho, E. Detmann, S. A. Santos, L. F. Prados, L. D. S. Mariz, L. C. Alves, A. C. B. Menezes, F. A. C. Villadiego, M. A. S. Novaes, and F. A. S. Silva. 2014. Effect of phase-feeding crude protein on performance and carcass characteristics of crossbred beef bulls: an application to reduce nitrogen compounds in beef cattle diets. *Tropical Animal Health Production* 46: 419-426.
- Broderick, G. A., and N. R. Merchen. 1992. Markers for Quantifying Microbial Protein Synthesis in the Rumen<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 75: 2618-2632.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1996. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *Journal Animal Science* 74: 1375-1381.
- Carro, M. D., and E. L. Miller. 2002. Comparison of microbial markers (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Animal Science Glasgow* 75: 315-322.
- Colmenero, J. O., and G. Broderick. 2006. Effect of dietary crude protein concentration on ruminal nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89: 1694-1703.
- Costa e Silva, L. F. 2011. Exigências nutricionais, validação de equações para a estimação da composição do corpo vazio e uso da creatinina para estimar a proporção de tecido muscular em bovinos nelore. Dissertation. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Detmann, E., and S. C. Valadares Filho. 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62: 980-984.
- Detmann, E., M. A. Souza, S. C. Valadares Filho, T. T. Berchielli, L. S. Cabral, M. M. Ladeira, M. A. Souza, A. C. Queiroz, E. O. S. Saliba, D. S. Pina, and J. A. G. Azevedo. 2012. Métodos para análise de alimentos. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Suprema, Visconde do Rio Branco-MG.
- Firkins, J. L., S. M. Lewis, L. Montgomery, L. L. Berger, N. R. Merchen, and G. C. J. Fahey. 1987. Effects of feed intake and dietary urea concentration on ruminal

- dilution rate and efficiency of bacterial growth in steers. *Journal Dairy Science* 70:2312–2321.
- Fonseca, A. C., S. M. Fredin, L. F. Ferraretto, C. M. Parsons, P. L. Utterback, and R. D. Shaver. 2014. Short communication: Intestinal digestibility of amino acids in fluid- and particle-associated rumen bacteria determined using a precision-fed cecectomized rooster bioassay. *Journal of Dairy Science* 97: 3855-3859.
- France, J., and R. C. Siddons. 1986. Determination of digesta flow by continuous market infusion. *Journal of Theoretical Biology* 121: 105-119.
- Galyean, M. L., and L. O. Tedeschi. 2014. Predicting microbial protein synthesis in beef cattle: Relationship to intakes of total digestible nutrients and crude protein<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 92.
- Huhtanen, P., P. G. Brotz, and L. D. Satter. 1997. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *Journal of Animal Science* 75.
- Krizsan, S. J., S. Ahvenjärvi, H. Volden, and G. A. Broderick. 2010. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 93: 1138-1147.
- Leão, M. 2002. Metodologias de coletas de digestas omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana. Master Dissertation. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Leão, M., and J. Coelho da Silva. 1980. Técnicas de fistulação de abomaso em bezerros. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia. p 37.
- Machado, P., S. C. Valadares Filho, E. Detmann, S. A. Santos, R. F. D. Valadares, C. Ducatti, P. P. Rotta, L. F. Costa e Silva. 2013. Development of equations to estimate microbial contamination in ruminal incubation residues of forage produced under tropical conditions using N as a label. *Journal of Animal Science* 91: 3836-3846.
- Mariz, L. D. S., S. C. Valadares Filho, E. Detmann, L. G. R. Pereira, M. I. Marcondes, S. A. Santos, F. A. C. Villadiego, D. Zanetti, L. F. Prados, and A. N. Nunes. 2013. Intake and ruminal digestion determined using omasal and reticular digesta samples in cattle fed diets containing sugar cane in natura or ensiled sugar cane compared with maize silage. *Livestock Science* 155:71-76

- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 43:99 – 109.
- NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Pazdiora, R. et al. 2014. Frequências do fornecimento do alimento no desempenho de vacas e novilhas em confinamento. *Archivos de zootecnia* 63: 3-12.
- Prates, L. L. 2015. Utilização da  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ -ureia infundida intravenosamente em bovinos Nelore. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Reynal, S. M., G. A. Broderick, and C. Bearzi. 2005. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88: 4065-4082.
- Rotta, P. P., S. C. Valadares Filho, L. F. Costa e Silva, E. Detmann, F. A. C. Villadiego, T. E. Engle, R. F. D. Valadares, B.C. Silva, M. V. C. Pacheco, and D. Zanetti. 2014. Comparison of purine bases and  $^{15}\text{N}$  for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu cross breed bulls. *Livestock Science* 167: 144-153.
- Ushida, K., B. LASSALAS, and J.-P. Jouany. 1985. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. *Reproduction Nutrition Développement* 25: 1037-1046.
- Valadares Filho, S. C., M. I. Marcondes, M. L. Chizzotti, and P. V. R. Paulino. 2010. Nutrient requirements of zebu beef cattle - BR-CORTE. Suprema Gráfica e Editora, Viçosa-MG.
- Zanetti, D. 2014. Exigências nutricionais, frequência de alimentação e níveis de cálcio e fósforo para bovinos Holandês x Zebu em confinamento. Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
- Zinn, R., and F. Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science* 66: 157-166.