

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LAYLLES COSTA ARAÚJO

**NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE O METABOLISMO DE
NITROGÊNIO**

Marechal Cândido Rondon-PR

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LAYLLES COSTA ARAÚJO

**NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE O METABOLISMO DE
NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito parcial do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Orientador: Drº. Ériton Egídio Lisboa Valente

Marechal Cândido Rondon-PR

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LAYLLES COSTA ARAÚJO

NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE O METABOLISMO DE
NITROGÊNIO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito parcial do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Zootecnia para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Marechal Cândido Rondon, ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ériton Egídio Lisboa Valente
Orientador – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.^a Dr.^a Carla Heloísa Avelino Cabral
Membro da banca – Universidade Federal do Mato Grosso

Prof.^aDr.^a Silvana Teixeira Carvalho
Membro da banca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Dr.^a Mirna Adriane Syperreck
Membro da banca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

*Dedico este trabalho as pessoas que considero essenciais na minha vida, minha felicidade, as pessoas que me dão forças para tentar fazer todo dia um dia melhor. Dedico às pessoas que mais amo nesse mundo, amo simplesmente por existirem, amo, pois fazem parte de mim, pois estão do meu lado, mesmo em alguns momentos estando longe, me aconselham, me direcionam, me incentivam, torcem por mim em todos os momentos, vibram comigo nas vitórias e continuam me incentivando nas derrotas. Dedico às pessoas que me levantam antes mesmo da queda, que me acalmam mesmo que só com palavras. As pessoas que estão comigo, onde eu estiver, mesmo que só em pensamento. Essas pessoas são minha mãe **Raimunda Nonata Mendes Costa**, meu pai **José Ribamar Pereira Araújo** e minha irmã **Gabryella**.*

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por esse tempo de desafios, de conquistas, de aprendizado, de renúncias, de fé e de esperas, pois Sua vontade é perfeita e agradável.

Aos meus **pais**, por serem razões da minha vida, por serem esteio em minhas exaustões e impulso em minhas incertezas.

À minha irmã, **Gabryella Costa Araújo**, pessoa de grande importância, pela disponibilidade e esforço de sempre em fazer com que tudo fosse da melhor forma possível. Pela sua atenção, amor, direcionamento e constante incentivo em minha vida, muitas vezes único e essencial.

Aos meus sobrinhos, **Marya Clara, Luigi e Maria Luiza**, alegria e amores da minha vida.

Aos meus amigos da faculdade para vida toda, **Ana Ruth Estrela, Davi Elias, Israel Pires, Kleves Almeida e Vanja Sousa**, por todos os momentos que vivemos aqui, sejam estes bons ou ruins, por serem o meu braço direito e esquerdo nos momentos de dificuldade. Enfim, por termos formado a “república” mais louca e divertida da cidade.

À **Universidade Estadual do Oeste do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**, pela oportunidade de realização do curso.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eriton Egídio Lisboa Valente**, pela contribuição na minha formação, ajudando-me sempre com paciência e experiência em todas as fases deste trabalho, principalmente sendo exemplo constante de dedicação e responsabilidade. Agradeço a oportunidade de trabalharmos juntos.

À **Prof.^a Dr.^a Silvana Teixeira Carvalho**, pessoa ímpar nessa fase da minha vida. Agradeço pela amizade, disposição em sempre me ajudar, “puxões de orelha” e principalmente acolhida, serei sempre grata!

Ao **Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho**, pelo consentimento para utilização de seu setor e facilidades colocadas à disposição, permitindo a realização deste trabalho.

A todo o grupo **Neapec**: Valdir, Guilherme, Cristian, Mariane, Brenda, Stefani, Eduardo, Daniele, Mariana, Matheus, Marcelo, Sarah e Thomas, pela valiosa ajuda e comprometimento do experimento e das análises laboratoriais, pelas brincadeiras, brigas pela amizade, enfim tenho orgulho de todos, sem vocês nada seria possível.

Aos meus queridos **funcionários do Núcleo de Estações Experimentais e da Fazenda Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa**, pelo enorme auxílio, por nunca se negarem a me ajudar.

Ao Sr. **Paulo Henrique Morsch**, secretário do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela atenção e ajuda em todos os momentos.

A todos os meus amigos conquistados em Marechal Cândido Rondon, por terem compartilhado comigo tantos momentos agradáveis. Em especial **Dani Tesche, Emanuelle Cristine e Lucas Wachholz**, pela acolhida.

Mesmo que passe o tempo e as distâncias se tornem insuperáveis, nunca esquecerei daqueles que me ensinaram, auxiliaram, incentivaram e acreditaram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos....

LISTA DE TABELAS

1: Estudo da amônia respiratória sobre o metabolismo de nitrogênio em bovinos.

Tabela 1. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais em g/kg de MS.....30

Tabela 2. Excreções de amônia respiratória (A.R mg/MIN.), concentração de amônia sérica (A.S mg/dL), nitrogênio ureico sérico (NUS; mg/dL) de novilhas da raça Holandês com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.....33

LISTA DE TABELAS

Artigo 2: Níveis dietéticos de proteína bruta sobre parâmetros nutricionais de novilhas holandesas.

- Tabela 1. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais em g/kg de MS.....43
- Tabela 2. Médias de consumo de matéria seca e demais nutrientes em Kg/dia; g/Kg de novilhas da raça Holandes alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta..... 48
- Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (Kg/dia de MS) e NDT de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta49
- Tabela 4. Balanço de compostos nitrogenados, concentrações de M-ureico na urina e excreção de nitrogênio na urina e fezes de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.....50
- Tabela 5. Comportamento do pH ruminal nos diferentes horários de coletas e concentração de nitrogênio ureico sérico (NUS mg/dl) de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta..... .51

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1: Estudo da amônia respiratória sobre o metabolismo de nitrogênio em bovinos.

Figura 1.	Excreções de nitrogênio na urina de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.....	35
-----------	---	----

Artigo 2: Níveis dietéticos de proteína bruta sobre parâmetros nutricionais de novilhas
Holandesas.

Figura 1.	Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) em mg/dL no líquido ruminal em relação ao tempo após a alimentação de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.....	53
-----------	--	----

Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá socorro? O meu socorro virá do Senhor, criador do céu e da terra. Ele não permitirá que teus pés resvalém; não dormirá aquele que te guarda. Não, não há de dormir, nem adormecer o guarda de Israel. O Senhor é teu guarda, o Senhor é teu abrigo, sempre ao teu lado. De dia, o sol não te fará mal; nem a lua durante a noite. O Senhor te resguardará de todo o mal; ele velará sobre tua alma. O Senhor guardará os teus passos, agora e para todo o sempre.

(Salmo 120)

RESUMO

Realizaram-se dois experimentos na Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos Pessoa pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, durante o período de agosto de 2015 a junho de 2016. No experimento I, objetivou-se avaliar a relação entre a excreção de amônia respiratória (A.R) e o teor de proteína bruta da dieta. Foram utilizadas quatro novilhas da raça Holandês, com peso corporal médio de 252,8 ±9,8 Kg ao início do experimento. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 4x4. Os animais foram alimentados com dietas com relação volumoso: concentrado de 45:55 compondo os tratamentos de 9%, 12%, 15% e 18% de proteína bruta na dieta, avaliando-se a excreção de amônia respiratória (A.R), concentração de amônia sérica (A.S), nitrogênio ureico sérico (NUS), e excreções de nitrogênio na urina (N). A concentração de A.R não foi influenciada ($P>0,05$) pelas dietas e também não houve efeito dos horários de coletas. A concentração inicial (C_i) e a concentração final (C_f) da amônia foram similares 48,30 ppb e 48,60 ppb respectivamente. Isso indica que a excreção de amônia via respiração foi quase nula. A concentração de A.S e NUS tiveram aumento linear ($P<0,05$), a excreção de nitrogênio total apresentou efeito linear ($P<0,05$). O experimento 2 foi conduzido para avaliar a influência de níveis de proteína bruta sobre os parâmetros nutricionais. Os animais, o delineamento experimental, os tratamentos e a dieta foram semelhantes ao experimento 1. Foi obtida redução no consumo de matéria seca, matéria orgânica e carboidratos não fibrosos ($P<0,05$) e aumento no consumo de proteína bruta ($P<0,05$). A digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica proteína bruta, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais, aumentaram com níveis de proteína bruta na dieta ($P<0,05$). Excreções de nitrogênio ureico na urina, excreções de nitrogênio na urina, balanço de nitrogênio e nitrogênio ureico sérico tiveram aumento linear ($P<0,05$). O pH não foi influenciado ($P>0,05$), no entanto as concentrações de nitrogênio no fluido ruminal aumentaram linearmente ($P<0,05$). Portanto, não ocorre excreção de amônia respiratória com o aumento dos níveis de proteína bruta na dieta, assim como não interfere na digestibilidade e no pH ruminal, mas reduz o consumo de matéria seca e matéria orgânica, e aumenta a excreção de nitrogênio urinário.

Palavras-chave: digestibilidade, nitrogênio ureico, *status* proteico

ABSTRACT

Two experiments were carried out at the Experimental Station, Prof. Dr. Antônio Carlos Pessoa belonging to the Western Paraná State University UNIOESTE, from August 2015 to June 2016. In the experiment I, the objective was to evaluate the relationship between the excretion of respiratory ammonia (RA) and the crude protein content of the diet. Four Holstein heifers were used, with an average body weight of 252.8 ± 9.8 kg at the beginning of the experiment. The experimental design used was the latin square 4×4 . The animals were fed diets with a bulky ratio: concentrate of 45:55, comprising the treatments of 9%, 12%, 15% and 18% crude protein in the diet, evaluating the excretion of respiratory ammonia (RA), concentration of Ammonia (AS), serum urea nitrogen (NUS), and urine nitrogen (N) excretions. The concentration of RA was not influenced ($P > 0.05$) by the diets and there was no effect of collection times. The initial concentration (C_i) and the final concentration (C_f) of ammonia were similar to 48.30 ppb and 48.60 ppb, respectively. This indicates that ammonia excretion through respiration was almost null. The concentration of AS and NUS had a linear increase ($P < 0.05$), the excretion of total nitrogen had a linear effect ($P < 0.05$). Experiment 2 was conducted to evaluate the influence of crude protein levels on nutritional parameters. The animals, experimental design, treatments and diets were similar to experiment 1. Reduction in dry matter intake, organic matter and non-fibrous carbohydrates ($P < 0.05$) and increase in crude protein intake ($P < 0.05$) were obtained. The digestibility of dry matter, crude protein, non-fibrous carbohydrates and total digestible nutrients increased with crude protein levels in the diet ($P < 0.05$). Excretions of urea nitrogen in the urine, nitrogen excretions in the urine, nitrogen balance and serum urea nitrogen had a linear increase ($P < 0.05$). The pH was not influenced ($P > 0.05$), however, the concentrations of nitrogen in the ruminal fluid increased linearly ($P < 0.05$). Therefore, there is no excretion of respiratory ammonia with increasing levels of crude protein in the diet, as well as does not interfere with digestibility and ruminal pH, but reduces dry matter intake and organic matter, and increases the excretion of urinary nitrogen.

Keywords: digestibility, protein *status*, urea nitroge

Sumário

1-INTRODUÇÃO.....	14
2-REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Importância da proteína na alimentação animal.....	16
2.2 Metabolismo proteico.....	17
2.3 Amônia respiratória.....	20
REFERÊNCIAS	23
3. ESTUDO DA AMÔNIA RESPIRATÓRIA SOBRE O METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM BOVINOS.....	26
3.1 Introdução	28
3.2 Material e Métodos.....	29
3.3 Resultados e Discussão	32
3.4 Conclusão.....	36
REFERÊNCIAS	37
4. NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE NOVILHAS HOLANDESAS.....	39
4.1 Introdução	41
4.2 Material e Métodos.....	42
4.3 Resultados e Discussão	46
4.4 Conclusão.....	54
REFERÊNCIAS	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

1-INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro alcançou 215,2 milhões de cabeças no ano de 2015 e ocupa a posição de maior rebanho comercial do mundo (ANUALPEC 2015), no entanto os sistemas de produção predominantes no Brasil ainda buscam estimar exigências de bovinos, pois as rações para ruminantes, em sua maioria, ainda são balanceadas a partir de dados obtidos em países com ambiente, alimentos e animais diferentes dos encontrados nas condições brasileiras (PAULINO et al., 2004).

A estimativa da exigência proteica com base em dados obtidos em condições experimentais ainda tem levado a desvios consideráveis entre as respostas preditas e observadas. Desta forma, ocorre ineficiência do uso da proteína e aumento da excreção de nitrogênio o que leva a prejuízos econômicos e ambientais. Apenas 5 a 30% do N da dieta dos animais são retidos, sendo o restante excretado para o ambiente (KOHN et al., 2005).

A ureia é o principal produto final excretado na urina proveniente do metabolismo de nitrogênio em ruminantes. A quantidade de ureia excretada depende da quantidade ingerida de nitrogênio digestível (VANCONCELOS et al., 2007), porém na prática sua mensuração é extremamente difícil.

O estudo de métodos que possam ser usados como indicador do *status* proteico do animal podem auxiliar a balancear e identificar problemas em programas nutricionais. A concentração de nitrogênio ureico sérico (NUS) é um método conhecido (KOHN et al., 2005), mas apresenta a desvantagem do alto custo para as análises laboratoriais, não sendo adequada a adoção desta variável em todos os sistemas de alimentação.

A avaliação da amônia respiratória em humanos como um indicador da quantidade circulante de nitrogênio tem apresentado a grande vantagem de ser um método não invasivo com obtenção de resultados de forma rápida. A sua excreção está associada ao metabolismo da ureia e o seu nível oscila em função da dieta e atividade física.

Essas técnicas analíticas são extremamente sensíveis, pois os compostos são voláteis à temperatura ambiente, sendo que mais de 5000 compostos podem ser identificados de forma reprodutível no ar expirado, porém os mesmos podem ter uma variação de indivíduo para indivíduo. Estas análises estão se tornando cada vez mais estabelecidas como um meio de avaliação metabólica, função bioquímica e fisiológica, onde exploram uma variedade de princípios físico-químicos complexos, mas que estão tornando-se mais utilizados (AJIBOLA et al., 2013).

Na literatura, não há estudos sobre a excreção de amônia respiratória em ruminantes submetidos a dietas proteicas. Deste modo, surge a necessidade de estratégias de novos parâmetros para avaliação do *status* proteico de ruminantes, que possam ser obtidos para elaboração de dietas de precisão, que atendam o balanço entre demandas e ofertas proteicas dos animais, não causando prejuízos à produtividade e à rentabilidade dos sistemas de produção, além de fornecer subsídios para ajustes eficazes.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a relação entre a excreção de amônia respiratória e a concentração de proteína bruta da dieta bem como o efeito do nível de proteína bruta sobre parâmetros nutricionais de novilhas Holandesas.

2-REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da proteína na alimentação animal

Proteínas são macromoléculas presentes nas células, que desempenham diversas funções como componentes estruturais, funções enzimáticas, hormonais, recepção de estímulos e armazenamento de informações genéticas. Estas são compostas de unidades formadoras, os aminoácidos (AA), unidos por ligações peptídicas, que são chamadas de proteínas simples. Também ocorrem no organismo as chamadas proteínas complexas, ou seja, que contêm além dos AA, outros compostos como grupo heme (heme proteínas), lipídeos (lipoproteínas) e açúcares (glicoproteínas) (NRC, 2001).

A proteína bruta contida nos alimentos dos ruminantes é composta por uma fração degradável no rúmen (PDR) e uma fração não degradável no rúmen (PNDR). A degradação da proteína no rúmen ocorre por meio de enzimas (proteases, peptidases e deaminases) que são excretadas pelos microrganismos ruminais. Estes microrganismos, por sua vez, degradam a fração PDR da proteína bruta (PB) fornecendo peptídeos, aminoácidos (AA) livres e amônia para o crescimento dos microrganismos, além de promover síntese de proteína microbiana no rúmen (SANTOS et al., 2011).

A PNDR é a segunda mais importante fonte de AA (aminoácidos) para os ruminantes. Desta maneira, a PDR favorece os microrganismos do rúmen e a PNDR diz respeito ao benefício do próprio animal (PEREIRA, 2005). A qualidade da proteína absorvida por ruminantes está relacionada com a disponibilidade de aminoácidos que chegam ao duodeno e não dos aminoácidos ingeridos (DE BOER et al., 1987). Os principais compostos nitrogenados que chegam ao intestino delgado de ruminantes compreendem proteínas da dieta que não sofreram degradação ruminal, proteína microbiana, proteína endógena e nitrogênio amoniacal (BOHNERT et al., 1998). Diante de tal fato, para o alcance de alto desempenho produtivo dos ruminantes é necessário que parte da proteína da dieta esteja na forma de PNDR, sendo esta necessária como fonte adicional de aminoácidos, suprimindo a necessidade de alguns aminoácidos essenciais na proteína microbiana produzida no rúmen (RIBEIRO et al., 2014).

Pereira et al. (2005) destacam a importância dos teores ótimos de proteína degradada no rúmen (PDR) e não degradada no rúmen (PNDR) em relação ao consumo de proteína total, antes de se alterarem os teores de PB na dieta, pois segundo a recomendação do NRC (2001), quantidades adequadas de PDR são necessárias para ótima eficiência de síntese microbiana, com mínima quantidade de proteína dietética.

A proteína verdadeira é o nutriente de maior custo das dietas, sendo que sua inclusão de forma desequilibrada resulta em custos consideráveis de produção (CAVALCANTE et al., 2005). Além disso, tanto a deficiência como o excesso de proteína na dieta podem trazer riscos à produção. A deficiência causa redução do consumo, levando ao não atendimento dos requerimentos dos microrganismos ruminais, e o excesso, pela toxidez, onde ocorre a liberação de amônia, que aumenta o teor de ureia, via urina, constituindo em desperdício de proteína (CAVALCANTE et al., 2005).

Aliado aos custos de produção, o excesso de proteína na dieta causa preocupações ambientais, uma vez que o aumento de excreções de ureia na urina, quando convertida a amônia, resulta em contaminação ambiental. Além disso, o animal deverá gastar energia para excretar o excesso de nitrogênio para o ambiente (MARCONDES et al., 2010)

Considera-se que 70 % da amônia e 30% do N₂O encontrados no meio ambiente são provenientes da pecuária (VAN AARDENNE et al., 2001). Desta forma, há uma preocupação da população mundial sobre os prejuízos ambientais, principalmente os sistemas de produção com alta tecnologia, para que adotem medidas que visem a redução dos impactos ambientais. Desta maneira, o correto balanceamento de dietas garante o atendimento correto das exigências proteicas dos animais evitando que excessos de ureia sejam descartados para o ambiente (TODD et al., 2006).

2.2 Metabolismo proteico

A peculiaridade dos ruminantes de possuir o estômago multi-compartimentado e colonizado por microorganismos permite o aproveitamento de alimentos com alto teor de fibra e conseqüentemente de baixa qualidade, além de compostos nitrogenados não proteicos, transformando-os em energia e nutrientes de qualidade como a proteína microbiana (DEWHURST et al., 2000).

Segundo Silva et al. (2005), os ruminantes não têm a capacidade de produzir enzimas necessárias para o processo de degradação, entretanto permite o desenvolvimento de uma população microbiana, para o alimento sofrer degradação, síntese e após esse processo a digestão no abomaso e intestino delgado.

O ambiente ruminal é composto por um grande número de diferentes espécies microbianas onde formam um consórcio aderindo-se às partículas dos alimentos, atuando simbioticamente, fermentando e degradando nutrientes, incluindo proteínas (BACH, et al., 2005). Uma vez que o número de diferentes ligações numa única proteína é grande, a ação sinérgica de diferentes proteases é necessária para a degradação da proteína completa (WALLACE et al., 1997).

A taxa e a extensão com que ocorre a degradação da proteína dependerá da atividade proteolítica da microflora ruminal e dos tipos de proteínas (Susceptibilidade e acessibilidade das ligações peptídicas). Os peptídeos resultantes e AA do rúmen das atividades proteolíticas extracelulares são transportados dentro de células microbianas. Os peptídeos podem ser ainda mais degradados por peptidases em AA, e este último pode ser incorporado na proteína microbiana ou mais, deaminados a CO₂ e amônia (BACH, et al., 2005).

A proteína microbiana que chega ao intestino delgado depende da disponibilidade de nutrientes e da eficiência de utilização dos mesmos por bactérias ruminais. Desse modo, o metabolismo de nitrogênio (N) no rúmen depende da disponibilidade de proteína degradável no rúmen e proteína não degradável do rúmen (PDR e PNDR), proporcionando fontes de nitrogênio para as bactérias e síntese de proteína microbiana (BACH et al., 2005).

Estima-se que as exigências de manutenção em ruminantes, de 60 a 85%, são fornecidas pela síntese de proteína microbiana (TIMMERMANS JUNIOR et al., 2000). Contudo, estratégias voltadas para a máxima eficiência da fermentação ruminal podem aumentar o consumo de matéria seca (MS) assim como permitir o uso eficiente da PDR.

A degradação da PDR é dependente de três processos: proteólise, peptidólise e deaminação. A proteólise é a quebra de proteína por enzimas que resulta em aminoácidos e peptídeos; peptidólise quebra dos peptídeos e deaminação é o processo pelo qual o aminoácido libera o grupo amino na forma de amônia e este se transforma em um cetoácido correspondente. As enzimas responsáveis por catalisar esta reação são as deaminases ou desidrogenases, que possuem como coenzimas o NADP (SANTOS, 2006).

Logo após a degradação, são originados peptídeos, aminoácidos e amônia, que são utilizados para síntese de proteína microbiana. De acordo com Cavalcante et al. (2006), a maior parte da proteína que chega à digestão abomasal e intestinal é proveniente da fermentação ruminal, sendo importante a maximização da qualidade e quantidade dessa fermentação.

Aproximadamente 80% da proteína bruta proveniente da degradação ruminal que chega ao duodeno é proteína verdadeira e os outros 20% são ácidos nucleicos (SANTOS,

2006). Alguns autores (BACH et al., 2005; LAPIERRE et al., 2001) relatam que as bactérias representam cerca de 90% da proteína microbiana verdadeira e é a maior fonte de proteína para o ruminante. Dessa forma, quanto mais proteína microbiana for formada aumentará a disponibilidade de aminoácidos e conseqüentemente serão absorvidos no intestino, aumentando a disponibilidade de substratos para síntese de proteína no leite e na carne.

Segundo Sniffen et al. (1987), o crescimento microbiano pode ser afetado pela disponibilidade dos fatores que compõem as exigências nutricionais dos microrganismos do rúmen, como carboidratos, amônia, peptídeos, aminoácidos, enxofre e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada. Assumindo-se que estes fatores não estejam limitando o crescimento microbiano, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno se correlaciona positivamente à quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen. Entretanto, o excesso de matéria orgânica fermentável pode gerar queda acentuada no pH ruminal e resultar em queda na síntese proteica (NRC, 2001).

Cavalcante et al. (2006) destacam que os dois substratos que mais limitam a síntese de proteína microbiana no rúmen são carboidratos e proteína. A proteína está relacionada à velocidade e intensidade de degradação da proteína dietética no rúmen, e os carboidratos pela eficiência de utilização dos compostos nitrogenados, pelo fato de ser responsável pelo aporte de energia para os microrganismos.

Segundo Valadares Filho (1995), os aminoácidos (AA) são responsáveis pelo atendimento das exigências de proteínas, estes são absorvidos no intestino delgado, caracterizando a exigência metabolizável, provenientes da fração microbiana da proteína não degradada no rúmen e da proteína endógena.

Após a absorção, os AA são utilizados pelos tecidos do animal, principalmente para síntese de proteínas. Porção considerável dos AA absorvidos é utilizada pelo fígado para síntese de glicose (gluconeogênese). Os AA podem também ser convertidos em lipídeos e outros compostos de grande importância, como grupo heme, purinas, pirimidinas, hormônios e neurotransmissores. Os AA não utilizados nesses processos são deaminados, originando amônia e esqueletos carbônicos. Os esqueletos carbônicos podem ser oxidados a CO₂ e água, com geração de energia. De modo geral, o catabolismo de AA, seja para síntese de glicose (gluconeogênese) no fígado, ou oxidação a CO₂ e H₂O, tem como via comum o ciclo de Krebs (SANTOS, 2006).

A presença de amônia no rúmen, que pode ser proveniente da presença de nitrogênio não proteico (NNP) nos alimentos e da ureia dietética reciclada da saliva e da parede ruminal também pode ser fonte de N para síntese microbiana (LAPIERRE et al., 2001). Entretanto, a

falta de nitrogênio para as bactérias reduz a digestibilidade dos alimentos. Em contrapartida, o excesso no rúmen causa toxicidade e influencia negativamente o desempenho, além de ser desperdício de proteína bruta, sendo excretado em ureia, principal forma pela qual o N é eliminado do organismo dos mamíferos (PEREIRA et al., 2007).

Lapierre et al. (2001) relatam que a concentração de ureia plasmática está diretamente relacionada à ingestão de N e à relação proteína: energia da dieta. Desta maneira, Pereira (2007) confirma que a quantidade de ureia excretada pelos rins depende de fatores como: concentração plasmática de ureia, taxa de filtração glomerular e reabsorção tubular de ureia, e o principal regulador da excreção da ureia pela urina é a concentração plasmática.

A exigência em proteína metabolizável de um bovino é suprida pela PNDR, desta maneira para que a resposta seja maximizada é importante que a fonte de PNDR seja de alta qualidade, ou seja, para que o perfil de aminoácidos essenciais (AAE) da PM seja adequado (SANTOS, 2006).

Neste contexto, a eficiência da suplementação de PNDR depende do adequado balanceamento de PDR na ração, não interferindo na síntese microbiana e utilizando fontes que melhorem o perfil de AAE da proteína que chega ao intestino (SANTOS, 2006).

2.3 Amônia respiratória

Os sistemas de produção têm buscado maneiras alternativas que visem melhorar o sistema de alimentação, objetivando alcançar exigências cada vez mais precisas de bovinos (TEDESCHI et al., 2005). Desta maneira, a estimação dessas exigências proteicas a maioria das vezes é adquirida a partir de dados experimentais, o que leva a desvios bem significativos da resposta esperada. Diante disso, pode ocorrer ineficiência do uso da proteína, ocasionando perdas elevadas de nitrogênio e, como consequência, prejuízos econômicos e ambientais.

A produção pecuária tem como principal objetivo converter energia e proteína dietética em proteína animal de alta qualidade para alimentação humana. Segundo Kohn et al. (2005), apenas 5 a 30% do nitrogênio (N) da dieta são retidos, o que significa que o restante é excretado para o ambiente. Diante disso, o correto balanceamento da dieta determina a eficiência de uso da proteína dietética pelo animal e o impacto ambiental das excretas.

A ureia é o produto final excretado na urina proveniente do metabolismo de N em ruminantes (ARCHIBEQUE et al., 2001). Segundo Vasconcelos et al. (2007), a quantidade de ureia excretada é positivamente correlacionada com a quantidade ingerida de N digestível, contudo as mensurações em condições comerciais são extremamente difíceis.

A estimação da taxa de excreção de N por animais pode ser usada para minimizar a poluição, bem como reduzir o uso de excesso de proteína na dieta. Para minimizar esses problemas que ocorrem pela falta de balanceamento adequado das dietas, tem sido utilizado como alternativa diferentes indicadores metabólicos, destacando-se os teores de nitrogênio ureico sérico (NUS), que dependem do metabolismo de energia e proteína intra-ruminal, e em animais hígidos, são bons indicadores do balanço entre esses componentes da dieta (EICHER et al., 1999).

O NUS, além de ser adequado para monitorar a nutrição, também é adequado para prevenir transtornos de origem metabólica. Estes parâmetros bioquímicos são importantes para adequar dietas, visando ganhos no sistema de produção (em caso de deficiência de proteína) e das situações envolvendo prejuízos econômicos provenientes da inclusão de nitrogênio acima das quantidades exigidas (VERAS, 2006).

A concentração de NUS está correlacionada com a taxa de excreção de N em ruminantes (KOHN et al., 2005). Contudo, a obtenção da concentração de NUS é um método invasivo, que necessita de equipamentos laboratoriais para análise, dificultando a adoção desta variável em sistemas de alimentação. Diante de tal fato, novos parâmetros para avaliação do *status* proteico de ruminantes, que possam ser obtidos de forma rápida e precisa, vêm sendo demandados para elaboração de dietas de precisão.

O desenvolvimento de estratégias para balancear adequadamente dietas tem se tornado importante para aumentar a eficiência de utilização de nitrogênio pelo animal. Essas estratégias devem ser aplicadas em condições práticas, sem causar prejuízos à produtividade e rentabilidade. Uma dessas estratégias consiste no desenvolvimento de novos sensores e aparelhos eletrônicos o que têm criado uma perspectiva positiva para a obtenção e aplicação de novas estimativas do *status* nutricional animal, que não eram possíveis há poucas décadas (VASCONCELOS et al., 2007).

A eliminação de amônia respiratória por humanos tem sido estudada durante muito tempo, com o objetivo de associar os valores obtidos com patologias (CLOSE et al., 1980; LEUNG & FOO, 1992). As principais patologias associadas a níveis elevados de amônia respiratória estão associadas ao metabolismo da ureia (NARASIMHAN et al., 2001).

Os níveis de amônia respiratória não estão somente associados a patologias, pois alteram-se em função de atividades físicas e mudança na dieta (CLOSE et al., 1980; SMITH et al., 1999). Esta última característica torna a amônia respiratória um indicador promissor para avaliação do metabolismo de N. Smith et al. (1999), em um trabalho com humanos, encontraram aumento de 3 vezes na concentração de amônia respiratória 5 horas após a

alimentação com farinha proteico-energética em comparação com valores obtidos em condição de jejum.

Os estudos realizados com humanos mostram alta correlação entre nitrogênio ureico sérico (NUS) e a concentração de amônia respiratória (NARASIMHAN et al., 2001; NERI et al., 2012). A estimativa da amônia respiratória como parâmetro da quantidade circulante de nitrogênio tem a vantagem de ser um método não invasivo com obtenção de resultados de forma rápida e permite o desenvolvimento de equipamentos e sensores aplicados à pecuária (TIMMER et al., 2005).

Durante esses últimos anos, a evolução nos métodos de amônia gasosa apresentou crescimentos significativos, o que tem como vantagem mensurações mais rápidas, precisas e sensíveis. A formação de ureia é um processo demandador de energia, tendo o gasto líquido de 1 ATP por mol de ureia formado. Desta maneira, o balanço proteico da dieta afeta tanto a eficiência proteica quanto a energética. A redução da eficiência de retenção de N é devido à elevação da excreção, ocorrendo queda da quantidade de energia disponível para retenção e a eficiência de utilização da energia também é reduzida (BRODY, 1993).

Quando há restrição no suprimento de carboidratos fermentáveis relativo ao N disponível, há limitação no crescimento e a atividade microbiana ocorrendo uso ineficiente de aminoácidos devido à desaminação e utilização da sua cadeia carbônica para obtenção de energia e aumento das perdas de N do animal na urina (ILLIUS & JESSOP, 1996).

Em contrapartida, disponibilidades excessivas de fontes energéticas e com baixo teor proteico podem causar utilização de energia por parte dos microrganismos, sem produção de células concomitante, num processo conhecido como “Energy Spilling”, ou dissipação de energia por meio de ciclos fúteis de íons, através da membrana microbiana, na tentativa de se consumir o excesso de energia (RUSSELL, 1998). Deste modo, também ocorre queda na eficiência da utilização da energia da dieta.

REFERÊNCIAS

- AJIBOLA, O.A.; SMITH, P.; FERNS, G.AA. Effects of dietary nutrients on volatile breath metabolites. **Journal of Nutritional Science**, v.2, n.34, p.1-15, 2013
- ANUALPEC 2015. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2015, 298 p.
- BACH, A; CASALMIGLIA, S; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v.88, n.1, p. 9-21, 2005.
- BOHNERT, D.W.; LARSON, B.T.; BAUER, M.L. et al. Nutritional evaluation of poultry by-product meal as a protein source for ruminants: effects on performance and nutrient flow and disappearance in steers. **Journal of Animal Science**, v.76, n.9, p.2474-2484, 1998.
- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. San Diego: Academic Press. 658 p, 1993.
- CAVALCANTE, B.A.M; PEREIRA, G.O; VALADARES FILHO, C.S, et al. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: consumo, digestibilidade total e desempenho produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia** Viçosa, MG, v.34, n.3, p.711-719, 2005.
- CAVALCANTE, M.A.B.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Níveis de proteína bruta para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n.1, p.203-210, 2006.
- CLOSE, L.G. CATLIN, F.I. COHN, A.M. Acute and chronic effects of ammonia burns on the respiratory tract. **Arch Otolaryngology Head & Neck Surgery.**, n.106, p.151-158, 1980.
- DE BOER, G.; MURPH, J.J.; KENNELLY, J.J. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.5, p.977-982, 1997.
- DEWHURST, R.J.; DAVIES.D.R; MERRY, R.J. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.85, n.1/2, p.1-21, 2000.
- EICHER, R.; BOUCHARD, E.; BIGRAS-POULIN, M. Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentration in Quebec dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.39, n.1, p.53-63, 1999.
- ILLIUS, A. W.; JESSOP, N. S. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, p. 3052-3062, 1996.
- KOHN, R. A. DINNEEN, M. M., RUSSEK-COHEN E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**, v.83, p.879-889, 2005.
- LAPIERRE, H.; LOBLEY, G.E. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. **Journal of Animal Science**, Champignon, v.84, p. 223-226, 2001.

- LEUNG, C.M. &FOO, C.L. Mass ammonia inhalation burns—experience in the management of 12 patients. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v.21, p.624-629, 1992.
- MARCONDES, M. I. et al. Exigências Nutricionais de Proteína para Bovinos de Corte. In: VALADARES FILHO. et al. 2ª Ed. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados BR- Corte**, v. 2ª Ed, p.113 -134, 2010.
- NARASIMHAN, L.R., GOODMAN, W., KUMAR, C., PATEL, N. Correlation of breath ammonia with blood urea nitrogen and creatine during hemodialysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.4617-4621, 2001.
- NERI, G.; LACQUANITI, A.; RIZZO, G.; et al. Real-time monitoring of breath ammonia during haemodialysis: use of ion mobility spectrometry (IMS) and cavity ring-down spectroscopy (CRDS) techniques. **Nephrol Dial Transplant**, v.27, p.2945-2952, 2012.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient Requirements of Dairy Cattle** 7th Ed. Washinton, D.C NATIONAL ACADEMY PRESS, 242, 2001, 381p.
- PAULINO,P.V.R.; COSTA,M.A.L.; VALADARES,S.C. et al. Exigências nutricionais de zebuínos: proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.759-769, 2004.
- PEREIRA, M.L.A.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.1029-1039, 2005.
- PEREIRA, P.K.; VÉRAS, C.S.A; FERREIRA,A.M;et al.;Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinosalimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Science Animal Science**, Maringá v,29, n.4, p.433-440,2007.
- RIBEIRO, R.O.; MACEDO JUNIOR, L.G; SILVA, P.S. Aspectos nutricionais da utilização da proteín pelos ruminantes: A reiew. **Vet. Not.** Uberlândia, v.20, n.2, p.1-14,.2014
- RUSSELL, J.B. Strategies that ruminal bacteria use handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.1955-1963, 1998.
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteína In: BERCHIELLI, T.T.; PERES, A.V.; OLIVEIRA, S.G(Ed). **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP .p.255-284, 2006
- SANTOS, F.A. P., F. L.; MACEDO, AND L. J. CHAGAS. Aplicação do conceito de proteína ideal para bovinos leiteiros. In: M. I. Marcondes et al. (eds.) **III Simpósio nacional de bovinocultura leiteira e i simpósio internacional de bovinocultura leiteira - SIMLEITE**. p 301 - 334. Suprema Gráfica e Editora LTDA, Viçosa – MG 2011.
- SILVA, F.F. et al. Aspectos do metabolismo de nitrogênio.In: Itavo, L.C.V.; ITAVO C.C.B.F (Ed), **Nutrição de Ruminantes**: aspectos relacionados á digestibilidade e ao aproveitamento de nutrientes. Campo Grande: UCDB, p.171-184, 2005,

- SMITH, D. SPANEL, P., DAVIES, S. Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study. **Journal of Applied Physiology**, v.1, n.5, p.1584-1588, 1999.
- SNIFFEN, C.J.; ROBINSON, P.H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, Champignon, v.70, p.425-441, 1987.
- TEDESCHI, L. O., D. G.; FOX, R. D.; SAINZ, L. G. et al. Using mathematical models in ruminant nutrition. **Scientia Agricola**, v.62, p.76-91, 2005.
- TIMMER, B., OLTHUIS, W., BERG, A. V.D. Ammonia sensors and their applications - a review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.107, p.666-677, 2005.
- TIMMERMANS JUNIOR, S.J. et al. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science**, Chapignon, v.83, n.6, p.1286-1299, 2000
- TODD, R. W.; COLE, N. A.; CLARK, R. N. Reducing crude protein in beef cattle diet reduces ammonia emissions from artificial feedyard surfaces. **Journal of Environmental Quality**, v.35, n.2, p.404-411, 2006.
- VALADARES FILHO, SC. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta em bovinos. IN: simpósio Internacinal sobre exigências nutricionais de Ruminantes, 1. 1995, Viçosa, MG. **Anais...** UFV. p.355-388, 1995.
- VAN AARDENNE, J. A.; DENTENER, F. J.; KLIJN GOLDEWIJK, C. G. M.; et al. A 1^o-1^o resolution dataset of historical anthropogenic trace gas emissions for the period 1890-1990. **Global Biogeochemical Cycles** 15:909-920.
- VASCONCELOS, J.T.; TEDESCHI, O.L.; FOX, G.D; et al. Review: Feeding Nitrogen and Phosphorus in Beef Cattle Feedlot Production to Mitigate Environmental Impacts. **The Professional Animal Scientist** v.23, p.8 -17, 2007.
- VERAS, L.M.R.; **Consumo , digestibilidade total e parcial, produção microbiana e exigência de proteína para manutenção de bovinos nelore.** 2006. 130p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- WALLACE, R. J., R. ONODERA, and M. A. COTTA. 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 283-328 in **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman & Hall, London, UK.

3. ESTUDO DA AMÔNIA RESPIRATÓRIA SOBRE O METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM BOVINOS

Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar a relação da excreção de amônia respiratória e concentração de proteína bruta na dieta. Foram utilizadas quatro novilhas da raça Holandês distribuídas em um delineamento experimental quadrado latino 4x4, as quais foram alimentadas com dietas contendo 9%, 12%, 15% e 18% de proteína bruta. A dieta foi composta de 55% concentrado e 45% de volumoso, a qual foi fornecida em duas refeições, às 8 h e 16 h. As variáveis avaliadas foram excreção de amônia respiratória (A.R), concentração de amônia sérica (A.S), nitrogênio ureico sérico (NUS) e excreção de nitrogênio na urina (N). A avaliação da concentração A.R. foi às 6 h, 12 h, 18 h e 00 h, sendo mensurada com uso de uma máscara respirométrica. Após a mensuração de A.R. foram coletadas amostras de sangue através da punção da veia jugular para as análises de NUS e A.S. A concentração de A.R. não foi influenciada pelas dietas e não houve efeito dos horários de coletas. A concentração inicial (Ci) e a concentração final (Cf) da amônia foram similares: 48,30 ppb e 48,60 ppb respectivamente. A concentração de A.S, NUS e a excreção de nitrogênio total apresentaram comportamento linear. Desta maneira, concluiu-se que a excreção de amônia respiratória não pode ser utilizada como indicador do *status* proteico em bovinos.

Palavras-chave: nitrogênio ureico, proteína, ruminantes

3. STUDY OF RESPIRATORY AMMONIA ON NITROGEN METABOLISM IN CATTLE

Abstract: The objective of this study was to evaluate the relationship between respiratory ammonia excretion and crude protein concentration in the diet. Four Holstein heifers were distributed in a 4x4 latin square experimental design, and were fed diets containing 9%, 12%, 15% and 18% crude protein. The diet was composed of 55% concentrated, and 45% of bulky which was provided in two meals at 8 h and 16 h. The variables evaluated were excretion of respiratory ammonia (A.R), serum ammonia concentration (A.S), serum urea nitrogen (NUS) and urine nitrogen excretion (N). The evaluation of the respiratory ammonia concentration was at 6 h, 12 h, 18 h and 00 h, being measured using a respirometric mask. After the measurement of respiratory ammonia blood samples were collected through the jugular vein puncture for analysis of NUS and A.S. The concentration of A.R. was not influenced by the diets and there was no effect of collection times. The initial concentration (Ci) and the final concentration (Cf) of the ammonia were similar to 48.30 ppb and 48.60 ppb respectively. The concentration of A.S, NUS and excretion of total nitrogen presented a linear behavior. Thus, it was concluded that the excretion of respiratory ammonia cannot be used as an indicator of the protein status in cattle.

Keywords: protein, ruminants, urea nitrogen

3.1 Introdução

As buscas dos atuais sistemas de alimentação para avaliar exigências de bovinos são significativas (TEDESCHI et al., 2005), mas a avaliação de exigências proteicas em condições experimentais leva a diferenças consideráveis entre respostas preditas e obtidas.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas estratégias para balancear adequadamente dietas que possam aumentar a eficiência de utilização de N pelo animal, com aumento da fração retida e redução da perda para o ambiente (KOHN et al., 2005). No entanto, estas estratégias para manejo nutricional não devem causar prejuízos à produtividade e rentabilidade (Vasconcelos et al., 2007) e devem possibilitar o uso em condições práticas.

Neste contexto, a Análise da respiração está se tornando cada vez mais estabelecida como um meio de avaliação metabólica, bioquímica e fisiológica, e apesar dos métodos disponíveis para estas análises explorarem uma variedade de princípios físico-químicos, as metodologias estão sendo alteradas (AJIBOLA et al., 2013).

As técnicas analíticas de compostos da respiração são extremamente sensíveis, podendo ser identificados mais de 5.000 compostos no ar expirado, entretanto esses compostos variam de indivíduo para indivíduo.

A excreção da amônia respiratória tem sido estudada em humanos, principalmente com o objetivo de correlacionar os valores obtidos com patologias. Além disso, como indicador da quantidade circulante de nitrogênio apresenta perspectivas de ser um método não-invasivo.

A fisiologia da digestão e metabolismo proteico em ruminantes e humanos são diferentes, pois uma característica peculiar dos ruminantes é a relação simbiótica com os microrganismos no sistema digestivo. Sendo assim, a dieta pode ter efeitos complexos sobre a geração de compostos na respiração, estes efeitos podem ser devido a um impacto direto sobre o metabolismo (AJIBOLA et al., 2013).

A hipótese desse estudo é que a amônia respiratória apresenta relação com a excreção de nitrogênio (N) por ruminantes e pode ser usada como indicador do *status* proteico. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a excreção de amônia respiratória em bovinos submetidos a dietas com diferentes teores de proteína bruta.

3.2 Material e Métodos

Os protocolos experimentais desenvolvidos nesta pesquisa atenderam plenamente aos princípios éticos da experimentação animal, e foram enviados para apreciação do conselho de ética para o uso de animais em Experimentação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, sob o numero de aprovação 29/15.

O experimento foi realizado no período de 30 de agosto a 31 de maio de 2016 na Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, no Laboratório de Nutrição Animal e no Laboratório de Análise de Sangue da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR.

Foram utilizadas 4 novilhas da raça Holandesa com peso corporal médio de $252,8 \pm 9,8$ kg ao início do experimento. Os animais foram distribuídos no delineamento experimental em quadrado latino 4x4, com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, sendo 14 dias para adaptação à dieta e seis dias para a coleta de dados, totalizando 80 dias. Os tratamentos testados foram níveis 9%, 12%, 15% e 18% de proteína bruta na dieta.

Os animais permaneceram em instalação coberta com piso de concreto revestido de borracha cocho e bebedouros. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 8h e às 16h, com fornecimento da mesma proporção da dieta. A alimentação foi oferecida na forma de ração total, composta por 45% de feno Tifton, 55% de concentrado contendo milho moído, farelo de soja, suplemento mineral e bicarbonato (Tabela 1). Do 15º ao 19º dia, foram realizadas as coletas de urina, amônia respiratória e sangue.

A coleta total de urina foi realizada utilizando-se funis coletores conectados a mangueira de polietileno, pela qual a urina foi conduzida até um recipiente de plástico com tampa contendo 200 mL de solução H₂SO₄ a 20%. Ao término de 24 horas de cada dia de coleta, a urina foi pesada, homogeneizada, amostrada na quantidade de 50 mL e posteriormente acondicionada a -20° C para determinação de nitrogênio.

A produção diária de amônia respiratória foi coletada às 6h, 12h, 18h e 00h. com o uso de máscara facial adaptada, conectada ao container (500L) por 2 tubos flexíveis que permitia que o ar da inspiração e expiração passasse por vias distintas.

A produção diária de amônia respiratória foi estimada pela técnica da respirometria em circuito fechado (*container*). A quantidade de amônia excretada foi calculada pela seguinte fórmula: $AE = [(V_{\text{container}} \times C_{\text{amônia final}}) - (V_{\text{container}} \times C_{\text{amônia inicial}})] \div T$, em que AE é a quantidade de amônia respiratória excretada (L/minuto); $V_{\text{container}}$ é o volume do container (L);

$C_{\text{amônia final}}$ é a concentração de amônia no tempo final (%); $C_{\text{amônia inicial}}$ é a concentração de amônia no início das mensurações (%); e T é o tempo da mensuração (minutos). O tempo de cada mensuração em circuito fechado foi 2 minutos.

Tabela 1. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais em g/kg de matéria seca.

Ingredientes	Níveis de proteína bruta na dieta			
	9%	12%	15%	18%
Feno de Tifton 85	450,00	450,00	450,00	450,00
Milho	537,90	464,70	400,40	327,20
Farelo de Soja	-	73,10	137,50	210,60
Bicarbonato	5,50	5,50	5,50	5,50
Mistura Mineral ²	6,60	6,60	6,60	6,60
Composição bromatológica				
MS ³	875,81	876,10	876,54	953,73
PB ⁴	90,90	121,37	148,23	178,69
FDNcp ⁵	433,66	416,54	407,27	403,29
EE ⁶	24,74	22,71	20,93	18,90
MM ⁷	41,04	45,13	48,73	52,82
MO ⁸	945,73	941,67	938,28	934,22
CT ⁹	826,28	794,49	766,64	734,86
CNF ¹⁰	385,31	380,15	359,37	331,56
NDT estimado ¹¹	68,79	68,53	68,41	68,20

²Composição química (quantidades/kg do produto): Ca - 215 g, P - 65 g, Co - 45 mg, Mg - 12 g, Mn - 425 mg, Zn - 1.900 mg, Se - 35 mg, I - 65 mg, S - 10 g, F - 650 mg, Fe - 1.700 mg, Cu - 800 mg, Na - 75g (produto comercial); ³MS: Matéria Seca; ⁴PB: Proteína bruta; ⁵FDNcp:Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína ⁶EE: Extrato Etéreo; ⁶PB: Proteína Bruta; ⁷FDN: Fibra Insolúvel em Detergente Neutro; ⁸FDN: Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; ⁷MM: Matéria Natural ; ⁸MO: Matéria orgânica; ⁹CT: Carboidratos Totais; ¹⁰CNF: Carboidratos Não Fibrosos; ¹¹NDT: Nutrientes Digestíveis Totais. NDT (%) = 86,0834 - 0,3862 FDN(Tibo et al. 2000).

A amostragem do ar expirado foi realizada com bolsas coletoras fabricadas em PVC (descarpack) com capacidade de 2L. As bolsas eram conectadas a uma bomba de amostragem fixada no circuito, transferindo o ar para a bolsa o qual correspondia à concentração inicial (Ci). Logo após a amostragem da concentração inicial, os tubos flexíveis eram fixados a máscara facial e, após dois minutos, os mesmos eram retirados e vedados para coletar o ar da respiração do animal, correspondente à concentração final (Cf). Esse processo foi repetido três vezes consecutivas, totalizando seis amostras por animal, divididas em concentrações

iniciais e finais. As amostras do ar foram armazenadas para a mensuração da concentração de amônia respiratória. Posteriormente, uma alíquota de 240 ml das amostras do ar, retirada por seringas das bolsas foram forçadas a passar pelo filtro de celulose impregnado com solução ácida utilizando-se um equipamento que permitia o fluxo de 120 ml/min. e posteriormente transferidos para tubos de ensaio (12mL) com 5ml de água destilada para passagem da amônia para a fase líquida e posterior análise (KARAKAS & TUNCEL, 1997).

Previamente, os filtros de celulose foram submetidos a um processo de lavagem em água deionizada, ficando imersos por dois dias. A água foi trocada pelo menos quatro vezes ao dia, a fim de eliminar possíveis interferentes e contaminantes. Em seguida, os filtros ficaram submersos em solução de ácido oxálico (5% m/v) + glicerol (2% v/v) por 4 h. Após impregnação, os filtros úmidos foram secos e armazenados em geladeira até o momento da amostragem (FELIX e CARDOSO, 2004).

A amônia na fase líquida foi quantificada retirando-se uma alíquota de 0,5 mL de amostra e misturada com 1,0 mL de solução de salicilato de sódio (16%), nitroprussiato de sódio (0,01%), 1,0 mL da solução de hipoclorito de sódio (1,4%) e hidróxido de sódio (2,5%). Após 30 minutos de reação, em banho Maria a 37°C, as absorbâncias dessas reações foram lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 640 nm. Para construção da curva padrão, foram utilizadas soluções obtidas através de misturas de ar purificado com as concentrações de amônia de 1, 2, 3, 4 e 5 ppm.

Após cada avaliação da concentração de amônia respiratória realizou-se a coleta de sangue via punção da veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio sem gel separador. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos para separação do soro, que foi armazenado a -20°C para posteriores análises de ureia e amônia. Para a determinação de ureia no soro, utilizou-se o método diacetil modificado em Kits comerciais (Gold Analisa®) e a determinação de amônia sérica utilizando solução de salicilato de sódio (16%), nitroprussiato de sódio (0,01%), 1,0 ml da solução de hipoclorito de sódio (1,4%) e hidróxido de sódio (2,5%). Após 30 minutos de reação, em banho Maria a 37°C, as absorbâncias dessas reações foram lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 640 nm.

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando proc mixed do SAS (Statistical Analysis System, versão university edition 2016). Contrastes ortogonais polinomiais foram usados para avaliar as respostas (linear e quadrática) ao aumento dos níveis de PB na dieta. Para as variáveis amônia respiratória (A.R); amônia sérica (A.S) e nitrogênio ureico sérico (NUS) procedeu-se em função dos tempos de amostragem. Adotou-se nível de

significância de 5%. Quando significativo, as regressões foram realizadas utilizando os níveis proteicos dietéticos observados de 8,8; 12,3; 15,1; 18,8%. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + E_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = Observação relativa à i-ésimo animal, ao j-ésimo período e ao k-ésimo tratamento.

μ = Média geral;

A_i = Efeito correspondente ao i-ésimo animal; $i = 1, 2, 3, e 4$;

P_j = Efeito correspondente ao j-ésimo período; $j = 1, 2, 3, e 4$;

T_k = Efeito correspondente ao k-ésimo tratamento; $k = 8,8; 12,3; 15,1; 18,8$

E_{ijk} = Erro aleatório associado a i-ésimo animal, j-ésimo período e k-ésimo tratamento

3.3 Resultados e Discussão

A excreção de amônia respiratória não foi influenciada ($P > 0,05$) pelas dietas e horários de coletas (Tabela 2).

A concentração atmosférica (C_i) e concentração final (C_f) da amônia foram similares: 48,30 e 48,60 ppb, respectivamente. Esses valores indicaram que a excreção de amônia via respiração foi quase nula, evidenciando que a concentração de amônia no rúmen não influenciou na excreção de amônia respiratória, sugerindo que provavelmente ocorreu uma alta eficiência no ciclo da ureia.

A excreção de amônia respiratória por humanos tem sido estudada durante muito tempo com o objetivo de associar os valores obtidos com patologias (CLOSE et al., 1980; LEUNG & FOO, 1992). As principais patologias associadas a níveis elevados de amônia respiratória estão associadas ao metabolismo da ureia (NARASIMHAN et al., 2001). Entretanto existem diferenças entre o metabolismo de humanos e ruminantes.

Diferenças na fisiologia da digestão e metabolismo em ruminantes em comparação com os seres humanos refletem em diferentes resultados, pois uma característica da fisiologia de ruminantes é a relação simbiótica com os microrganismos no sistema digestivo. Esta

excreção de amônia na respiração também está sujeita a variações diurnas e noturnas e após a alimentação, que são um pouco diferentes para cada indivíduo (NERI et al., 2012).

Tabela 2. Excreções de amônia respiratória (A.R mg/MIN.), concentração de amônia sérica (A.S mg/dL) e nitrogênio ureico sérico (NUS; mg/dL) de novilhas da raça Holandês com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.

Variáveis	Níveis de proteína bruta na dieta				EP ¹			
	9%	12%	15%	18%		Trat.	Temp.	Trat.xTemp
A.R	-0,03	0,04	0,20	0,00	0,08	0,255	0,638	0,870
A.S	0,21	0,22	0,22	0,24	0,01	<0,001 ²	0,799	0,972
NUS	7,4	10,3	14,1	18,4	1,27	<0,001 ³	<0,001 ⁴	0,330

EP¹: Erro Padrão; 2= $Y = 0,19 + 0,003x$ ($R^2 = 0,05$); 3= $y = -3,97 + 1,22x$ ($R^2 = 0,62$); Ci=48,30 ppb; Cf=48,60 ppb

Avaliando a excreção de amônia respiratória em humanos 5 horas após a alimentação com farinha proteico-energética, Smith et al., (1999) observaram aumento de 3 vezes na excreção de amônia respiratória em condição de jejum. Spacek et al. (2015), avaliando aumento da amônia em resposta à alta proteína, estimaram um aumento na excreção da amônia respiratória. A diferença nos resultados do presente estudo pode ser atribuída a diferenças fisiológicas, pois em ruminantes, quando a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados para a síntese microbiana, o excesso de amônia produzida no rúmen atravessa a parede ruminal e pode ser perdida via urina na forma de ureia.

Além disso, os resultados do presente estudo, quando comparados com trabalhos realizados em humanos, atribuem-se ao fato de que os animais não ficaram totalmente em jejum durante a noite e o seu metabolismo não mudou para essas condições. Estudos com ruminantes têm sido desenvolvidos usando análises da respiração para detecção de doenças que possam causar prejuízos ao desenvolvimento animal e principalmente prejuízos econômicos (PELED et al., 2012; ELLIS et al., 2014; CHO et al., 2015; BAYN et al., 2013). Outras pesquisas com ruminantes já foram desenvolvidas avaliando a excreção de outros gases provenientes da respiração que podem ser influenciados após a ingestão de alimentos (FISHER et al., 2015; FISHER et al., 2015b), contudo não há informação na literatura sobre excreção de amônia respiratória em ruminantes consumindo dietas com níveis de proteína bruta.

A concentração de amônia sérica (A.S) apresentou efeito em relação aos níveis de proteína bruta na dieta ($P < 0,05$).

A eficiência da utilização da amônia pelos microrganismos para síntese de proteína microbiana depende, entre outros fatores, principalmente da disponibilidade de energia no rúmen, evidenciando que a maior parte da amônia não utilizada para síntese de proteína microbiana foi absorvida através da parede ruminal por difusão e transportada para o fígado pela veia porta.

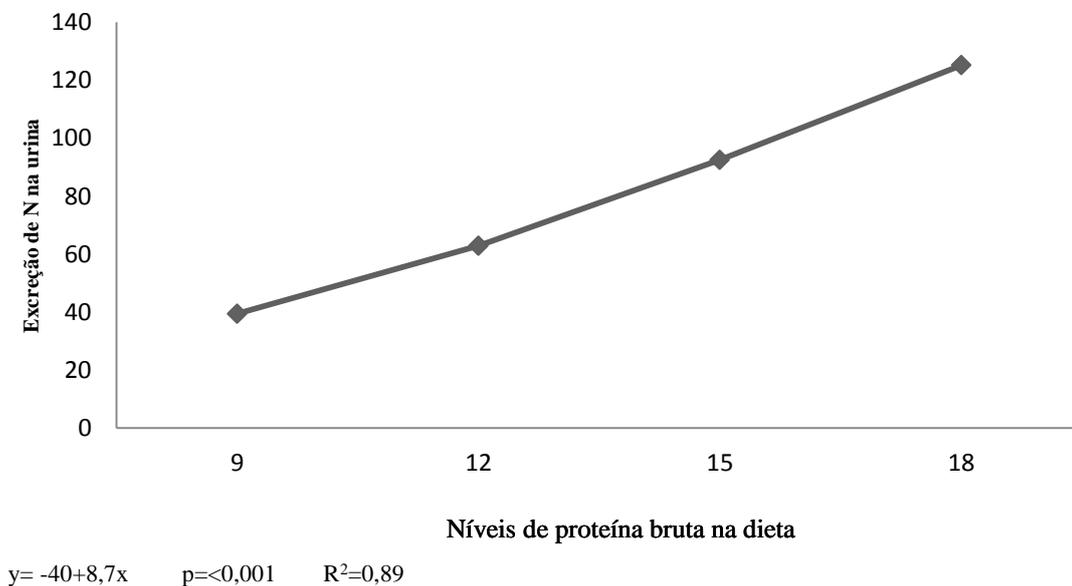
Os resultados também nos mostram que os níveis de amônia no sangue estavam em condições normais, pois a concentração de amônia no sangue acima de 2 mg/dL é tóxica para os ruminantes, evidenciando que no presente estudo os níveis de amônia no sangue se mantiveram bem abaixo deste valor, indicando que os níveis de proteína bruta na dieta não prejudicaram o crescimento microbiano.

A hipótese levantada por Ogimoto et al. (2015) afirma que as concentrações de amônia no sangue estão relacionadas com as concentrações provenientes de amônia na respiração, e que esta última se origina predominantemente da ureia no sangue. Porém, existem estudos que se contrapõem a essa hipótese, pois os gases provenientes da respiração também podem ser originados na cavidade oral, vias aéreas ou por bactérias no intestino (LOURENÇO & TURNER, 2014).

Entretanto, no presente estudo, a concentração de amônia sérica não teve influência na excreção de amônia respiratória, atribuindo o efeito a ingestão das dietas proteicas que influenciou na concentração de amônia sanguínea, pois a amônia produzida no rúmen foi absorvida na circulação portal e removida pelo fígado, entretanto não foi suficiente para ser excretada via respiração. Em contrapartida, alta concentração de amônia no sangue e na respiração e baixos níveis no ar ambiente podem indicar o sangue como a fonte principal de amônia na respiração. Por outro lado, concentrações elevadas no ar ambiente e baixos níveis de excreção pela respiração e no sangue indicam algum tipo de contaminação exógena (MOCHALSK et al., 2013). Além disso, os níveis sanguíneos obtidos confirmam que o efeito da concentração de amônia sérica foi de origem dietética.

A concentração de nitrogênio ureico sérico (NUS) foi influenciada ($P < 0,05$) pelas dietas e horários de coletas (Tabela 2), que apresentou relação linear com a ingestão de nitrogênio (N). O teor de NUS tem sido utilizado para obtenção de informações sobre o perfil da nutrição proteica de ruminantes, envolvendo suas respostas metabólicas a determinadas dietas (CHIZZOTI et al., 2006).

A concentração de nitrogênio encontrado na urina está relacionada positivamente à concentração de nitrogênio no soro e com a ingestão de N, constituindo-se em um parâmetro de observação da eficiência de utilização do N ruminal. As concentrações de NUS no presente estudo tiveram correlação positiva com a excreção de nitrogênio na urina (ENU) (Figura 1), pois este apresentou efeito linear positivo com o aumento dos níveis de proteína bruta na dieta, entretanto o mesmo não teve correlação com a excreção de amônia respiratória. Esse resultado diferiu de Narashiman et al. (2001), que encontraram correlação positiva da concentração de NUS com a excreção de amônia respiratória em humanos submetidos a tratamento de hemodiálise.



Figural: Excreção de nitrogênio na urina de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.

Essa diferença pode ser explicada, pois os ruminantes beneficiam-se de reciclagem de N para o intestino a partir do sangue e, assim, podem sobreviver com baixas quantidades de proteína. A reciclagem de N começa quando a amônia é absorvida pela parede do rúmen, e é imediatamente transportada pela circulação entero-hepática veia porta para o fígado, onde é intensamente metabolizada, dessa maneira esse processo apoia a fermentação e síntese de proteína microbiana, enquanto o N reciclado ao intestino delgado suporta processos de fermentação que fornecem energia mas não fornecem proteína para o animal. Desta forma, a

ureia no sangue seria vantajosa, tornando os níveis de reciclagem de N para o intestino os maiores possíveis, podendo-se ainda afirmar que o nível de nitrogênio ureico sérico serve como regulador da ureia reciclada, e não a quantidade de ureia presente no rúmen.

Em contrapartida, os humanos não possuem esse mecanismo de reciclagem, desta forma têm a necessidade de excretar N, pois em altas concentrações são tóxicos. Diante disso, as formas de excreção nos humanos constituem-se por meio da urina e via respiração, e os ruminantes, por sua vez, reciclam parte do nitrogênio e excretam outra parte, principalmente via urina, sendo a excreção via respiração quase nula, o que os torna mais eficientes.

Diante disso, cabe ressaltar que os valores sugeridos de NUS por Cherney e Elrod (1995) para ruminantes, quando excedem 19-20 mg/dL, estão gerando desperdício de proteína, e em humanos saudáveis os valores de NUS sugeridos são de até 24 mg/dL, o que confirma que os ruminantes são mais eficientes, conseguindo sobreviver com taxas mais baixas de proteína, o que demonstra os resultados do estudo, pois conseguem aproveitar a proteína da dieta, não afetando a excreção de amônia via respiração.

3.4 Conclusão

Não ocorre relação entre a excreção de amônia respiratória e as dietas proteicas, não sendo proposto como um bom indicador do *status* proteico em ruminantes.

REFERÊNCIAS

- AJIBOLA, O.A.; SMITH, P.; FERNS, G.AA. Effects of dietary nutrients on volatile breath metabolites. **Journal of Nutritional Science**. v.2, p.1-15, 2013.
- BAYN, A.; NOL, P.; TISCH, U.; et al. Detection of volatile organic compounds in brucella abortus seropositive bison. **Analytical Chemistry**. v.85, p. 11146-11152, 2013.
- BUTLER, W. R.; CHERNEY, D. J. R.; ELROD, C. C. Milk urea nitrogen (MUN) analysis: field trial results on conception rates and dietary inputs. In: CORNELLPROCEEDINGS CONFERENCE, 1, 1995, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p. 89-95, 1995.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**. v.8, p.130-137, 1962.
- CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.
- CHO, Y .S; JUNG, S.C.; OH, S.; Diagnosis of bovine tuberculosis using a metal oxide-based electronic nose. **Letters in Applied Microbiology**, v.60, p.513-516, 2015.
- CLOSE, L.G. CATLIN, F.I. COHN, A.M. Acute and chronic effects of ammonia burns on the respiratory tract. **Arch. Otolaryngol.**, n.106, p.151–158, 1980.
- ELLIS, C. K.;STAHL, R. S.; NOL,P.; et al. A pilot study exploring the use of breath analysis to differentiate healthy cattle from cattle experimentally infected with myco bacterium bovis. **PLoS One**, v.9, p.1-12, 2014.
- FELIX, E.P. E CARDOSO, A. A. Amônia (NH₃) atmosférica: fontes, transformação, sorvedouros e métodos de análise. **Quimica Nova**, v.27, p.123-130, 2004.
- FISHER.S; BERGMANN, A.; STEFFENS, M.; et al. Impact of food intake on in vivo VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model. **Journal of Breath Research**. v. 9, p.1-12, 2015
- FISCHER, S.; TREFZ, P.; BERGMANN, A.; et al. Physiological variability in volatile organic compounds (vocs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model. **Journal of Breath Research**. v.9, p.1-18, 2015b
- KARAKAS, D.; TUNCEL, S.G. Optimization and field application of a filter pack system for the simultaneous sampling of atmospheric HNO₃, NH₃ and SO₂. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 1657-1666, 1997.

- KOHN, R. A.; DINNEEN, M. M.; RUSSEK-COHEN E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**, v.83, p.879–889, 2005.
- LEUNG, C.M. &FOO, C.L. Mass ammonia inhalation burns—experience in the management of 12 patients. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v.21, p.624-629, 1992.
- LOURENCO, C.; TURNER, C. Breath Analysis in Disease Diagnosis: **Methodological Considerations and Applications. Metabolites**. v.4, p.465–98, 2014
- MOCHALSKI, P.; KING, J.; KLIEBER, M.; et al. Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers. **Analyst**, v.138, p.2134-2145, 2013.
- NARASIMHAN, L.R., GOODMAN, W., KUMAR, C.; et al. Correlation of breath ammonia with blood urea nitrogen and creatine during hemodialysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.4617–4621, 2001.
- NERI, G.; LACQUANITI, A.; RIZZO, G.; et al. Real-time monitoring of breath ammonia during hemodialysis: use of ion mobility spectrometry (IMS) and cavity ring-down spectroscopy (CRDS) techniques. **Nephron Dial Transplant**, v.27, p.2945–2952, 2012.
- OGIMOTO, Y.; SELYANCHYN, R.; TAKAHARA, N.; et al. Detection of Ammonia in Human Breath Using Quartz Crystal Microbalance Sensors with Functionalized Mesoporous SiO₂ Nanoparticle Films. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.215, p.428–436, 2015.
- PELED, N.; IONESCU, R.; NOL. P.; et al. Detection of volatile organic compounds in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* **Sensors and Actuators B: Chemical**.v.171, p.588-594, 2012.
- SMITH, D. SPANEL, P., DAVIES, S. Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study. **Journal of Applied Physiology**. v.5, p.1584-1588, 1999.
- SPACEK, L; MUDALEL, M.L.; LEWICKI, R.; et al. Breath ammonia and ethanol increase in response to a high protein challenge. **Biomarkers**. v.20, n.2, p.149-156, 2015.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; SAINZ, R.D.; et al. Using mathematical models in ruminant nutrition. **Scientia Agricola**, v.62, p.76-91, 2005.
- TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços f1 Simental x Nelore. 1. Consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.3, p.910-920, 2000.
- VASCONCELOS, J.T; TEDESCHI, O.L; FOX, G.D.; et al. Review: Feeding Nitrogen and Phosphorus in Beef Cattle Feedlot Production to Mitigate Environmental Impacts. **The Professional Animal Scientist** v.23, p.8-17, 2007.

4. NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE NOVILHAS HOLANDESAS

Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar o nível dietético de proteína bruta sobre parâmetros nutricionais de novilhas Holandesas. Foram utilizadas quatro novilhas da raça Holandesa distribuídas em um quadrado latino 4x4, as quais foram alimentadas com dietas contendo níveis (9%, 12%,15% e 18%) de proteína bruta na dieta. A dieta foi composta de 55% concentrado e 45% de volumoso, as quais foram fornecidas em duas refeições, às 8:00 horas e 16:00 horas. Os parâmetros avaliados foram o consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, concentrações de nitrogênio sanguíneo e urinário, balanço de compostos nitrogenados e parâmetros de fermentação ruminal em novilhas Holandesas. Foi obtida redução no consumo de matéria seca, matéria orgânica e carboidratos não fibrosos e aumento no consumo de proteína bruta. A digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais aumentaram com níveis de proteína bruta na dieta. Excreções de nitrogênio ureico na urina, excreções de nitrogênio na urina, balanço de nitrogênio e nitrogênio ureico sérico tiveram aumento linear. O pH não foi influenciado, no entanto as concentrações de nitrogênio no fluido ruminal aumentaram linearmente. Neste contexto, o aumento do nível de proteína na dieta de novilhas Holandesas diminuiu o consumo de matéria seca e matéria orgânica, no entanto sem alterar a digestibilidade dos nutrientes, sem afetar o pH e a concentração de amônia ruminal. A excreção de nitrogênio urinário aumentou com o incremento proteico das dietas. Desse modo, recomenda-se até 15% de proteína bruta na alimentação de novilhas leiteiras, pelo fato de que até este nível de proteína bruta proporciona aumento na digestibilidade dos nutrientes e redução na excreção.

Palavras-chave: consumo, digestibilidade, proteína, ruminantes

4. DIETARY LEVELS OF CRUDE PROTEIN ON NUTRITIONAL PARAMETERS OF HOLSTEIN HEIFERS

Abstract: The objective of this study was to evaluate the dietary level of crude protein on nutritional parameters of Holstein heifers. Four Holstein heifers were distributed in a 4x4 latin square, and were fed diets containing levels (9%, 12%, 15% and 18%) of crude protein. The diet was composed of 55% concentrated and 45% of bulky and was provided in two meals, at 8:00 am and 4:00 p.m. The parameters evaluated were: intake, apparent digestibility of nutrients, blood and urinary nitrogen concentrations, nitrogen balance and ruminal fermentation parameters in Holstein heifers. Reduction in the dry matter intake, organic matter and non-fibrous carbohydrates and increase in crude protein intake was obtained. The digestibility of dry matter, crude protein, nonfiber carbohydrates and total digestible nutrients increased with crude protein levels in the diet. Excretions of urea nitrogen in the urine, nitrogen excretions in the urine, nitrogen balance and serum urea nitrogen had a linear increase. The pH was not influenced, however, the concentrations of nitrogen in the ruminal fluid increased linearly. In this context, the increase of protein level in the diet of Holstein heifers decreased the dry matter intake and organic matter, however without altering the digestibility of the nutrients, and not affecting the pH and the ruminal ammonia concentration. The excretion of urinary nitrogen increased with the protein increase of the diets. Thus, up to 15% of crude protein in dairy heifers is recommended, since this crude protein level increased nutrient digestibility and reduced excretion.

Keywords: consumption, digestibility, protein, ruminants

4.1 Introdução

O objetivo básico da produção pecuária é converter energia e proteína dietética em proteína animal de alta qualidade para alimentação humana. Contudo, apenas 5 a 30% do nitrogênio (N) da dieta dos animais é retido, sendo o restante excretado para o ambiente (KOHN et al., 2005). Assim, o balanceamento da dieta determina a eficiência de uso da proteína dietética pelo animal e o impacto ambiental provocado pelas excretas.

A baixa concentração de nitrogênio solúvel no rúmen afeta diretamente o crescimento microbiano e, conseqüentemente, promove uma diminuição da digestão da fibra e limitação do consumo. Isso é verificado quando se fornecem dietas com teores proteicos crescentes a animais jovens, havendo geralmente melhora no desempenho (TEODORO et al., 2013).

A baixa degradabilidade ruminal da proteína, segundo Dutra et al. (2004), leva à queda na concentração de amônia, diminuição da eficiência no crescimento microbiano, redução na taxa de degradação e aumento da permanência da digesta no rúmen, com conseqüente diminuição no consumo, da mesma forma que a elevação no nível de amônia ruminal promove aumento na degradabilidade da matéria orgânica.

Apesar disso, a proteína verdadeira é o nutriente mais oneroso nas dietas de ruminantes, sendo que sua inclusão de forma desequilibrada resulta em elevação nos custos de produção (CAVALCANTE et al., 2005), além de causar prejuízos ambientais. Quando a proteína está em excesso ao exigido pelos microrganismos ruminais, a mesma é degradada a amônia, absorvida no epitélio ruminal, metabolizada a ureia no fígado e perdida na urina (BACH et al., 2005).

A proporção de ureia urinária aumenta à medida que a concentração de proteína bruta na dieta aumenta, o que eleva as perdas de N como amônia (NH_3) e óxido nitroso (N_2O). Após a excreção de ureia, a mesma se transforma rapidamente em amônio (NH_4) e posteriormente é perdida como NH_3 . O NH_4 pode também nitrificar e desnitrificar, formando nitrato (NO_3) e N_2O , o gás de efeito estufa mais potente emitido pelos sistemas agrícolas (POWELL et al., 2014).

Estima-se que as perdas de NH_3 de criações leiteiras em confinamento variam de 20 a 55% (HRISTOV et al., 2011; ROTZ et al., 2014). Desta forma, há uma grande pressão da sociedade sobre os sistemas de produção animal, principalmente os mais intensificados, para que adotem estratégias que visem reduzir o seu impacto ambiental (MARCONDES et al., 2010).

Além disso, dietas com excesso de proteína elevam as concentrações endógenas de ureia no sangue, acarretando redução na disponibilidade de energia e aumento da síntese hepática de ureia, podendo prejudicar o desempenho animal.

A hipótese desse estudo é que os níveis de proteína bruta alteram os parâmetros nutricionais de novilhas Holandesas. Objetivou-se com esta pesquisa verificar a influência de níveis de proteína bruta sobre parâmetros nutricionais.

4.2 Material e Métodos

Os protocolos experimentais desenvolvidos nesta pesquisa atenderam plenamente aos princípios éticos da experimentação animal, e foram enviados para apreciação do conselho de ética para o uso de animais em Experimentação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, sob o numero de aprovação 29/15.

O experimento foi realizado no período de 30 de agosto de 2015 à 31 de Maio de 2016, na Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, no Laboratório de Nutrição Animal e no Laboratório de parâmetros sanguíneos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR.

Foram utilizadas quatro novilhas da raça Holandês, com peso corporal médio de 252,8 ± 9,8 kg. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental em quadrado latino 4x4, com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, sendo 14 dias para adaptação à dieta e seis dias para a coleta de dados, totalizando 80 dias. Os tratamentos foram 9%, 12%, 15% e 18% de proteína bruta na dieta. Os animais foram pesados sem jejum no início de cada período experimental com o objetivo de ajustar o fornecimento de matéria-seca.

Os animais permaneceram em baias individuais cobertas, com piso de concreto revestido de borracha, comedouros e bebedouros individuais. Os animais foram alimentados às 8 h e à tarde às 16 h, nas proporções de 50% em cada turno. A alimentação foi oferecida na forma de ração total e a relação volumoso: concentrado foi de 45:55. O volumoso foi composto por feno de tifton e o concentrado continha milho moído, farelo de soja, suplemento mineral e bicarbonato (Tabela 1).

O alimento ofertado foi ajustado diariamente com base na quantidade de sobras do dia anterior, permitindo-se 10% de sobras para garantir o consumo voluntário. A ingestão de matéria seca foi determinada pela diferença entre o fornecido e as sobras.

Do 15º ao 19º de cada período experimental foram coletadas amostras de feno, concentrados e sobras, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas a -20 °C para posteriores análises. Neste mesmo período, também foram coletadas fezes, urina e sangue.

Para determinação da digestibilidade, foi realizada a coleta total de fezes. As mesmas foram recolhidas diariamente do piso, com auxílio de uma pá, e ao término de 24 horas foram pesadas, homogeneizadas e amostradas na quantidade de 300g/animal/dia e armazenadas em freezer a -20 °C.

Tabela 1. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais em g/kg de matéria seca

Ingredientes	Níveis de proteína bruta na dieta			
	9%	12%	15%	18%
Feno de tifton 85	450,00	450,00	450,00	450,00
Milho	537,90	464,70	400,40	327,20
Farelo de Soja	-	73,10	137,50	210,60
Bicarbonato	5,50	5,50	5,50	5,50
Mistura Mineral ²	6,60	6,60	6,60	6,60
Composição bromatológica				
MS ³	875,81	876,10	876,54	953,73
PB ⁴	90,90	121,37	148,23	178,69
FDNcp ⁵	433,66	416,54	407,27	403,29
EE ⁶	24,74	22,71	20,93	18,90
MM ⁷	41,04	45,13	48,73	52,82
MO ⁸	945,73	941,67	938,28	934,22
CT ⁹	826,28	794,49	766,64	734,86
CNF ¹⁰	385,31	380,15	359,37	331,56
NDT estimado ¹¹	68,79	68,53	68,41	68,20

²Composição química (quantidades/kg do produto): Ca - 215 g, P - 65 g, Co - 45 mg, Mg - 12 g, Mn - 425 mg, Zn - 1.900 mg, Se - 35 mg, I - 65 mg, S - 10 g, F - 650 mg, Fe -1.700 mg, Cu - 800 mg, Na - 75g (produto comercial);³MS: Matéria Seca; ⁴PB: Proteína bruta; ⁵FDNcp: Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína ⁶EE: Extrato Etéreo; ⁷MM: Matéria Mineral; ⁸MO: Matéria orgânica; ⁹CT: Carboidratos Totais; ¹⁰CNF: Carboidratos Não Fibrosos; ¹¹NDT: Nutrientes Digestíveis Totais. NDT (%) = 86,0834 - 0,3862 FDN (Tibo et al. 2000).

A coleta total de urina foi realizada utilizando-se funis coletores conectados a mangueira de polietileno, pela qual a urina foi conduzida até um recipiente de plástico com tampa contendo 200 mL de H₂SO₄ a 20%. Ao término do período de 24 horas de cada dia de

coleta, a urina foi pesada, homogeneizada e amostrada na quantidade de 50 mL, e transferidas para frascos plásticos e armazenadas em freezer a -20 °C para posteriormente ser determinada a concentração de ureia.

Para a verificação do nitrogênio ureico sérico (NUS) foi realizada a coleta de sangue via punção da veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio sem gel separador. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos para separação do soro, o qual foi transferido para eppendorfs e posteriormente armazenadas a -20 °C. A determinação de ureia na urina e no soro sanguíneo foi de acordo com o método diacetil modificado Kits comerciais (GoldAnalisa®).

Após o período de coleta, as amostras de alimentos, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada de ar 55 °C por 72 horas e moídas em moinho tipo Willey com peneiras com crivo de um milímetro. Realizou-se então um *pool* composto das amostras de cada alimento, sobras e fezes, resultando em uma única amostra por animal/tratamento/período. Após, as mesmas foram analisadas quanto aos teores de MS, MM, PB, EE de acordo com AOAC (1990) e a determinação da fibra em detergente neutro (FDN) segundo Van Soest et al. (1991) corrigida para compostos nitrogenados e matéria mineral. Os teores de matéria orgânica foram calculados pela diferença entre o teor de MM e o total de MS. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados segundo Detmann & Valadares Filho (2010):

$$\text{CNF} = 100 - [\% \text{PB} + \% \text{FDNcp} + \% \text{EE} + \% \text{MM}]$$

Os teores de NDT foram calculados segundo equação propostas pelo NRC (2001):

$$\text{NDT} = \text{PBd} + 2,25 \times \text{EEd} + \text{FDNcp} + \text{CNFd}$$

Para determinar o pH e a concentração de amônia (NH₃) no líquido ruminal, foram coletadas amostras do fluído ruminal (aproximadamente 150 mL) no 20º dia de cada período experimental, via esofágica utilizando uma bomba a vácuo, nos tempos 0; 2; 4; 6 e 8 horas. O tempo zero correspondeu à amostra colhida imediatamente antes do fornecimento da alimentação da manhã (8h), e o tempo 8, imediatamente antes do segundo fornecimento (16h).

O pH foi aferido imediatamente após a coleta com pHmetro digital e outra alíquota de 50 mL do fluído ruminal foi acidificada com 1 mL de ácido sulfúrico H₂SO₄ (1:1); foram

aconditionadas em frasco de polietileno e armazenadas para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

A determinação do N-NH₃ foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Chaney & Marbarch (1962). As amostras de fluido ruminal foram descongeladas e centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 minutos.

O balanço dos compostos nitrogenados foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido e o total excretado nas fezes e na urina.

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando o proc mixed do SAS (Statistical Analysis System, versão university edition 2016). Contrastes ortogonais polinomiais foram usados para avaliar as respostas (linear e quadrática) ao aumento dos níveis de PB na dieta. Para as variáveis pH, NUS e nitrogênio amoniacal procedeu-se em função dos tempos de amostragem. Adotou-se o nível de significância de 5%. Quando significativas, as regressões foram realizadas utilizando os níveis proteicos dietéticos observados de 8,8; 12,3; 15,1; 18,8%. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + E_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = Observação relativa à i-ésimoanimal, aoj-ésimo período e ao k-ésimo tratamento.

μ = Média geral;

A_i = Efeito correspondente ao i-ésimoanimal; $i = 1, 2, 3, e 4$;

P_j = Efeito correspondente ao j-ésimoperíodo; $j = 1, 2, 3, e 4$;

T_k = Efeito correspondente ao k-ésimo tratamento; $k = 8,8; 12,3; 15,1; 18,8$

E_{ijk} = Erro aleatório associado associado a i-ésimo animal, j-ésimo período e k-ésimo tratamento

4.3 Resultados e Discussão

O consumo de EE, FDN, MOD e CNDT não foram influenciados pelos níveis de proteína bruta (PB) das dietas ($P > 0,05$ Tabela 2).

O aumento dos níveis de proteína bruta na dieta promoveu efeito linear decrescente ($P < 0,05$) no consumo de MS. Existe uma relação entre a concentração energética da dieta e o consumo de matéria seca (CMS), em dietas menos digestíveis, ou seja, com baixa energia (alta fibra). O CMS é controlado por fatores físicos, conhecido como enchimento ruminal e impedimento físico da passagem da dieta, enquanto que para dietas com alta digestibilidade, e com alta energia (baixa fibra), o CMS é controlado por fatores neuro-hormonais ou metabólicos (NRC, 1987).

O decréscimo do CMS no presente estudo não pode ser atribuído aos fatores de enchimento físico relacionados à fibra e nem pela deficiência de proteína, entretanto podemos sugerir que este resultado pode ser atribuído à regulação psicogênica que envolve o comportamento animal em respostas a fatores inibitórios ou estimuladores no alimento, ou no manejo alimentar, que não estão relacionados ao valor energético do alimento, nem ao efeito do enchimento. Dessa forma, pode ter ocorrido uma seleção pelos animais pelas partes mais digestíveis da dieta, sendo que dentre os fatores de maior impacto na modulação psicogênica da ingestão de alimentos o principal é palatabilidade (MERTENS, 1994).

Estudo realizado por Teodoro et al. (2013), utilizando uma única relação volumoso: concentrado e níveis crescentes de PB (11%; 13%; 15% e 17%), não encontrou diferenças no consumo de matéria seca. Segundo os autores, este fato pode ter ocorrido devido à quantidade de fibra, já que esta variável tem influência sobre o consumo. Segundo Shahzad et al. (2011), além das características físicas e químicas da ração, o consumo também é influenciado pela concentração de energia da dieta.

A disponibilidade de carboidratos no rúmen é muito importante e tem grande efeito sobre a utilização dos compostos nitrogenados, pois as bactérias ruminais podem incorporar os aminoácidos e fermentá-los como fonte de energia (PEREIRA et al. 2005). Além disso, o consumo de MS é uma variável inconstante que pode ser afetada por diversos fatores, podendo estar relacionados ao animal, ao alimento, à forma de alimentação, ao ambiente que interagem e podem ser determinantes (DONG et al., 2016; MOTA et al., 2013; QUEIROZ et al., 2012).

O CPB apresentou efeito linear crescente ($P < 0,05$), sendo que este fato pode ser justificado pelo aumento da sua proporção na composição química da dieta, não tendo relação

com o CMS. O efeito das dietas proteicas sobre o CPB também foi semelhante ao relatado por Paiva et al. (2013).

O consumo de CNF apresentou efeito linear decrescente ($P < 0,005$). Pode ser atribuído à redução do teor de milho quando se adicionou o farelo de soja para elevação dos teores de proteína bruta. Dessa forma, os resultados nos sugerem que a diminuição dos carboidratos em relação à proteína no rúmen contribui para a síntese de proteína microbiana e consequentemente melhora da utilização dos nutrientes.

Houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) nos coeficientes de digestibilidade aparente da MS, MO, CNF, NDT (Tabela 3).

A ingestão de compostos nitrogenados é importante para atender os requerimentos microbianos, sobretudo daqueles agentes que digerem a fibra, resultando em aumento do consumo e do desaparecimento do alimento (TEIXEIRA et al., 2010). Este fato ajuda a explicar o resultado positivo da digestibilidade da MS, pois apesar do volumoso utilizado (Feno Tifton 85) ser de baixa qualidade, o mesmo não interferiu na digestibilidade da MS, pois o tempo de retenção das partículas no rúmen foi o suficiente para o aumento da digestibilidade, confirmando que houve uma adequada fermentação ruminal.

O aumento na digestibilidade da PB pode ser explicado, pois houve um maior suprimento de nitrogênio ruminal, o qual foi essencial para o atendimento das exigências dos microrganismos e em contrapartida atendeu às exigências metabólicas dos animais, pois ocorreu uma diminuição progressiva da proporção de nitrogênio endógeno nos compostos nitrogenados fecais, aumentando o consumo, a taxa de passagem e consequentemente o aproveitamento dos nutrientes (BRODERICK, 2003; CAVALCANTE et al., 2005).

Outro possível efeito associado ao maior CDPB está relacionado ao aumento da proteína degradável no rúmen, acarretando maior liberação de amônia ruminal com consequente absorção, gerando um coeficiente de digestibilidade ruminal positivo e menor excreção de PB nas fezes, gerando um CDPB maior (VAN SOEST, 1994).

Tabela 2. Médias do consumo de matéria seca e demais nutrientes em kg/dia; g/kg, de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.

Variáveis	Níveis de proteína bruta na dieta				EP ¹	Contraste	
	9%	12%	15%	18%		L	Q
Kg/dia							
CMS ²	7,58	7,19	6,97	6,93	0,33	0,046 ²	0,416
CMO ³	7,21	6,83	6,57	6,49	0,33	0,028 ³	0,455
CPB ⁴	0,67	0,88	1,05	1,30	0,04	<0,001 ⁴	0,550
CEE ⁵	0,12	0,12	0,12	0,11	0,01	0,397	0,710
CFDN ⁶	3,11	2,90	2,89	2,91	0,13	0,297	0,383
CCNF ⁷	3,29	2,73	2,48	2,43	0,20	0,004 ⁵	0,109
CMOD ⁸	4,74	4,73	4,78	4,97	0,25	0,378	0,586
CNDT ⁹	4,65	4,49	4,75	4,98	0,29	0,257	0,408
g/kg							
CMS ¹¹	23,5	21,7	22,0	22,2	1,8	0,197	0,126
CPB ¹²	2,1	2,8	3,3	4,2	0,26	<0,001 ⁶	0,415
CFDN ¹³	9,7	9,1	9,2	9,2	0,66	0,395	0,444
CMO ¹⁴	22,4	21,4	20,7	20,8	1,55	0,081	0,409
CCNF ¹⁵	10,2	8,2	7,8	7,6	0,72	0,024 ⁷	0,155
CMOD ¹⁶	16,1	16,2	15,7	15,8	1,22	0,366	0,904
CNDT ¹⁷	14,6	14,7	14,9	15,5	1,04	0,275	0,652
g/kg							
PB:MOD ¹⁸	145,5	191,1	225,9	276,4	6,5	<0,001 ⁸	0,633

EP¹: Erro Padrão; CMS²=Consumo de Matéria seca; CMO³= Consumo Matéria orgânica; CPB⁴ = Consumo Proteína bruta; CEE⁵= Consumo Extrato etéreo; CFDN⁶=Consumo de fibra Insolúvel em Detergente Neutro; CCNF⁷= Consumo de Carboidrato não fibroso; CMOD⁸= Consumo de Matéria Orgânica Digestível; CNDT⁹= Consumo de nutrientes digestíveis totais; PB:MOD¹⁸= Relação proteína bruta e matéria orgânica digestível= $8=y= 30,4+13,04x$ ($R^2=0,95$). 2= $Y= 8,08-0,066x$ ($R^2=0,15$); 3= $y=7,77-0,073x$ ($R^2=0,19$); 4= $y= 0,10+0,06x$ ($R^2=0,91$); 5= $y=3,91-0,08x$ ($R^2=0,91$); 6= $Y= 0,20+0,209x$ ($R^2=0,73$); 7= $y=11,82-0,245x$ ($R^2=0,32$).

A digestibilidade dos CNF aumentou linearmente ($P<0,05$). Este fato pode ser explicado, pois a quantidade de farelo de soja aumentou com os níveis de proteína bruta na dieta e este é rico em pectina, um tipo de CNF da soja que tem característica de ser altamente degradável no rúmen, o que promove um padrão de fermentação mais adequado. Este fato foi

comprovado por Queiroz et al. (2010), com estudos sobre alimentos proteicos (Farelo de soja).

O NDT teve aumento linear ($P < 0,05$), o que pode ser atribuído ao aumento da digestibilidade da PB, pois segundo Veras et al. (2007) a elevação da PB na dieta causa aumentos significativos na digestibilidade de todos os nutrientes, inclusive nas fibras.

Tabela 3. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes (kg/dia de MS) e NDT de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína na dieta.

Variáveis	Níveis de proteína bruta na dieta				EP ¹	Contraste	
	9%	12%	15%	18%		L	Q
DMS ²	0,618	0,655	0,693	0,700	0,012	<0,001 ²	0,120
DMO ³	0,637	0,670	0,711	0,727	0,011	<0,001 ³	0,297
DPB ⁴	0,434	0,583	0,676	0,732	0,036	<0,001 ⁴	0,135
DFDNcp ⁵	0,713	0,668	0,707	0,679	0,021	0,422	0,608
DEE ⁶	0,512	0,505	0,491	0,440	0,054	0,342	0,686
DCNF ⁷	0,601	0,690	0,747	0,799	0,037	<0,001 ⁵	0,624
NDT (g/kg)	614,4	624,7	679,4	728,3	31,3	<0,001 ⁶	0,435

EP¹: Erro Padrão; DMS²: Digestibilidade da Matéria Seca; DMO³: Digestibilidade da Matéria Orgânica; DPB⁴: Digestibilidade da Proteína Bruta; DFDNcp⁵: Digestibilidade da Fibra Insolúvel em Detergente Neutro corrigida para compostos nitrogenados e matéria mineral; DEE⁶: Digestibilidade do Extrato Etéreo; DCNF⁷: Digestibilidade dos Carboidratos Não Fibrosos 2= $Y = 0,552 + 0,008x$ ($R^2 = 0,67$); 3= $y = 0,562 - 0,009x$ ($R^2 = 0,69$); 4= $y = 0,194 + 0,03x$ ($R^2 = 0,72$); 5= $y = 0,445 + 0,193x$ ($R^2 = 0,54$); 6= $Y = 495,8 + 12,1x$ ($R^2 = 0,39$).

A digestibilidade da fibra não foi afetada pelos níveis de proteína bruta na dieta ($P > 0,005$). Essa ausência de efeito pode ser justificada, pois neste caso sugere-se que ocorreu uma adequada síntese de proteína microbiana, o que pode explicar a melhoria do aproveitamento dessa fração fibrosa, proveniente da eficiência da fermentação pelos altos níveis de proteína na dieta. Alguns autores (CHANTIRATIKUL et al., 2009; CHUMPAWADEE et al., 2009) afirmam que o efeito do nível de proteína sobre a digestibilidade dos nutrientes é inconstante e varia, pois depende da idade, raça e composição da dieta basal em relação ao volumoso. Entretanto, no presente estudo, essas variáveis eram semelhantes, não podendo se atribuir os efeitos da digestibilidade dos nutrientes a esses parâmetros.

A concentração de nitrogênio ureico na urina (NUU), excreção de N na urina e o balanço de N aumentaram linearmente com o aumento do teor de PB na dieta (Kg/dia; g/kg PC Tabela 4). Entretanto, o N fecal não foi afetado pelo teor proteico das dietas.

Tabela 4. Balanço de compostos nitrogenados, concentrações de N-ureico na urina e excreção de nitrogênio na urina e fezes de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta.

Variáveis	Níveis de proteína bruta na dieta				EP ¹	Contraste	
	9%	12%	15%	18%		L	Q
g/dia							
NUU ²	28,9	52,7	84,3	126,2	11,8	<0,001 ¹	0,283
ENU ³	39,4	62,9	92,5	125,2	6,00	<0,001 ²	0,153
ENF ⁴	60,9	58,7	54,4	54,9	4,80	0,057	0,531
BN ⁵	6,5	19,6	21,7	28,0	8,00	0,022 ³	0,511
g/kg PC							
NUU ⁶	0,095	0,175	0,272	0,419	0,027	<0,001 ⁴	0,211
ENU ⁷	0,131	0,209	0,307	0,420	0,016	<0,001 ⁵	0,156
ENF ⁸	0,202	0,199	0,185	0,195	0,027	0,366	0,468
BN ⁹	0,025	0,066	0,071	0,104	0,03	0,027 ⁶	0,831
g/g							
EUN ¹⁰	0,056	0,133	0,127	0,134	0,059	0,236	0,424

¹EP: =Erro Padrão; NUU²= Nitrogênio Ureico na Urina; ENU³= Excreção de Nitrogênio na urina; ENF⁴= Excreção de Nitrogênio nas fezes; BN⁵= Balanço de nitrogênio; EUN⁹= Eficiência de Utilização de Nitrogênio= NRg/NCg ; 1= $\hat{Y}=-62,5+9,9x$ ($R^2=0,75$); 2= $Y=-40,0+8,7x$ ($R^2=0,89$); 3= $Y=-9,04+2,04x$ ($R^2=0,22$); 4 = $Y=-0,20+0,03x$ ($R^2=0,85$); 5= $\hat{Y}=-0,13+0,029x$ ($R^2=0,93$); 6= $\hat{Y}=-0,035+0,007x$ ($R^2=0,19$)

Van Soest (1994) afirma que a excreção de nitrogênio ureico na urina é maior quando a concentração de proteína bruta na dieta e a ingestão de nitrogênio pelo animal aumentam. Esta afirmação está consoante com os resultados obtidos neste trabalho, pois o consumo de PB também apresentou efeito linear com o aumento dos níveis de PB na dieta.

A excreção de nitrogênio apresentou aumento linear ($P<0,05$; Tabela 4). Este fato está relacionado com a maior excreção de nitrogênio ureico na urina; dessa forma, o excesso de proteína em dietas pode ocasionar um desperdício de proteína, causando prejuízos econômicos, ambientais e, além disso, maior gasto energético do animal, pois é necessário para cada mol de ureia produzido dois moles de ATP para eliminar este excesso de nitrogênio

do organismo, o que evidencia a importância do atendimento exato das exigências de proteína.

Os efeitos observados na excreção de N resultaram em aumento no balanço de nitrogênio, significando aumento do nitrogênio retido e absorvido, fato que pode ser explicado pelo aumento linear do consumo de proteína bruta, decorrente do aumento dos níveis de proteína bruta na dieta, sugerindo que houve retenção de proteína no organismo animal, proporcionando condições para que não ocorresse perda de peso dos animais experimentais. Pereira et al. (2007) também observaram aumento linear nos dados de balanço de compostos nitrogenados em bovinos com o acréscimo PB dietética, devido à maior ingestão de N na dieta.

Os valores de NUS apresentaram aumento linear ($P < 0,05$; Tabela 5). Segundo Chizzotti et al. (2006), os teores de nitrogênio ureico sérico têm sido utilizados para obtenção de informações sobre o *status* da nutrição proteica de ruminantes, relacionando suas respostas metabólicas a determinadas dietas. Assim, a concentração sérica de ureia está correlacionada à utilização de proteína bruta da dieta e maiores concentrações podem definir a ineficiência na utilização da proteína e maiores perdas de energia. Dessa forma, o seguinte resultado afirma o maior consumo de proteína bruta e conseqüentemente de nitrogênio, inferindo de maneira direta nas concentrações de NUS.

Tabela 5. Comportamento do pH ruminal nos diferentes horários de coletas e concentração de nitrogênio ureico sérico (NUS mg/dL) de novilhas da raça Holandês alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta.

Variáveis	Níveis de proteína bruta na dieta				EP ¹	Trat.	Temp.	Trat.xTemp
	9%	12%	15%	18%				
NUS ²	7,4	10,3	14,1	18,4	1,27	<0,001 ³	<0,001 ⁴	0,330
pH	6,8	6,8	6,8	6,8	0,06	0,932	0,286	0,833

¹EP: Erro Padrão; NUS²= Nitrogênio ureico sérico; $y_3 = -3,97 + 1,22x$ ($R^2 = 0,62$)

Os resultados mostram a relação consistente entre a concentração de NUS e a taxa de excreção urinária, e os coeficientes que poderiam ser utilizados para estimar a excreção de nitrogênio a partir de medições de sangue. Konh et al. (2005) encontraram esta relação da excreção urinária com taxas de NUS em diferentes espécies e afirmam que os ruminantes beneficiam-se da reciclagem de N para o intestino a partir do sangue, e assim conseguem sobreviver com baixas taxas de proteína na dieta.

A reciclagem de N começa quando a amônia é absorvida pela parede do rúmen e é imediatamente transportada pela circulação entero-hepática veia porta para o fígado, onde é intensamente metabolizada, dessa maneira esse processo apoia a fermentação e síntese de proteína microbiana, enquanto o N reciclado ao intestino delgado suporta processos de fermentação que fornecem energia, mas não fornecem proteína para o animal. Desta forma, a ureia no sangue seria vantajosa, tornando maiores os níveis de reciclagem de N para o intestino os maiores possíveis, podendo-se ainda afirmar que o nível de nitrogênio ureico sérico serve como regulador da ureia reciclada, e não a quantidade de ureia presente no rúmen.

Desta maneira, Harris (1995) sugere que quando a concentração de NUS for menor do que 12mg/dL, pode indicar uma escassez de proteína dietética, sendo que no presente estudo foram obtidos valores inferiores a este de referência nos níveis dietéticos de 7% e 12% de PB na dieta. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente por Dong et al. (2016) e Gabler Heinrichs (2003), sendo que os autores relataram em seus estudos taxas elevadas de NUS para novilhas Holandesas submetidas a dietas com alta proteína.

O pH não foi influenciado ($P > 0,05$) pelas dietas (Tabela 5). Em termos fisiológicos, o pH ruminal pode variar de 5,5 a 7,4, o que pode alterar com o tipo de alimento ingerido, da forma que é fornecido e do tempo de coleta do fluido ruminal após a última refeição, informação esta que ajuda a detectar alterações que possam ocorrer no ambiente ruminal.

De acordo com Valadares Filho e Pina (2011), pH com valores abaixo de 6,0 inibem as bactérias fermentadoras de celulose e diminuem significativamente a eficiência de síntese de proteína bruta microbiana. Este fato ocorre, pois os microrganismos fibrolíticos apresentam sensibilidade a ambientes ácidos, desta forma o pH ótimo para atividade das celulasas é de 6,8 podendo variar 0,5 unidades sem causar grandes prejuízos. Desta maneira, o resultado que foi observado no presente estudo evidencia que não houve prejuízo à fermentação ruminal, e tampouco à digestão da fração fibrosa, e ainda corroboram os valores propostos como adequados por Queiroz et al. (2012) e Cavalcante et al. (2006), entre 6,68 e 7,05.

Ocorreu interação entre tratamentos x tempos sobre a concentração de $N-NH_3$ (Figura 1).

A amônia presente no rúmen tem origem da degradação da proteína verdadeira da ração, do nitrogênio não proteico da ração (NNP), do N reciclado para o rúmen na forma de ureia e da degradação das células microbianas mortas no rúmen, sendo assim o pico de amônia no rúmen após a alimentação depende de fontes de N presentes na ração.

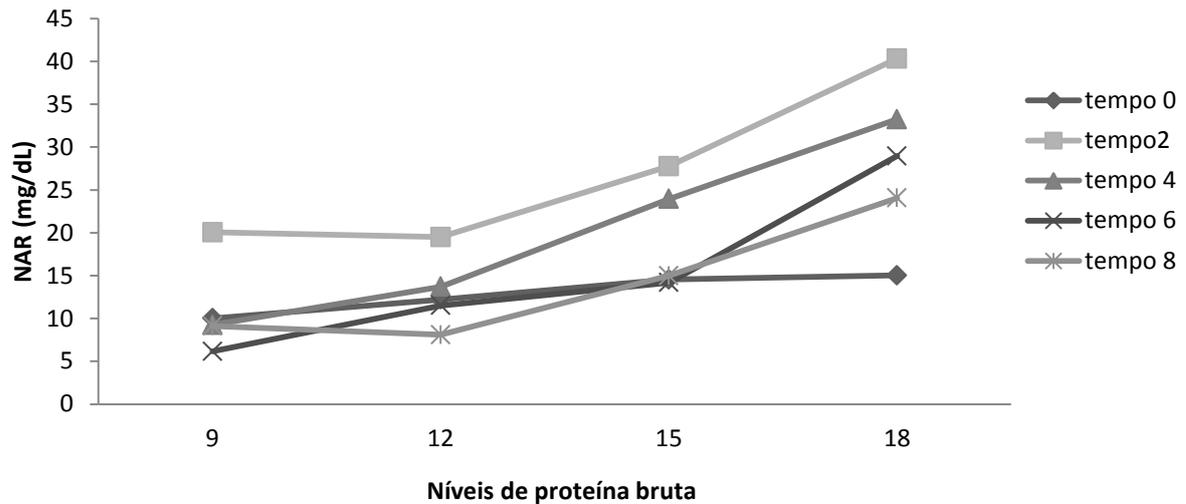


Figura 1. Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em mg/dL no líquido ruminal em relação aos níveis de proteína bruta na dieta, em função dos tempos após a alimentação de novilhas da raça Holandês.

No presente estudo, pode-se observar que o equilíbrio entre a proteína degradável no rúmen e carboidratos contribuíram para utilização de N-NH₃ para síntese de proteína microbiana, ilustrando a importância do equilíbrio proteico e energético das dietas.

O pico de amônia ocorre entre 2 a 3 horas para fontes de proteína verdadeira, fato observado no presente estudo, onde as concentrações foram maiores entre as 2 e 4 horas após a alimentação nos maiores níveis de proteína bruta na dieta, 15 e 18% respectivamente. Valores acima de 5 mg/dL são recomendados por Satter & Slyter (1974). No presente estudo, em todos os horários e em todos os tratamentos, os valores ficaram acima do recomendado, o que demonstra que não ocorreu limitação da síntese microbiana. Cavalcante et al. (2006) encontraram concentrações de nitrogênio amoniacal horas após a alimentação, entretanto estimaram os valores máximos de 17,43 mg/dL de N-NH₃ 3,62 horas após a alimentação.

A concentração de N-NH₃ no rúmen é consequência do equilíbrio entre a sua produção, absorção e utilização pelos microrganismos. O N-NH₃ é utilizado pelas bactérias ruminais como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana, porém a fermentação ruminal da proteína frequentemente produz mais N-NH₃ ruminal que os microrganismos podem utilizar. Neste experimento, provavelmente não ocorreu desperdício de amônia ruminal, pois as médias encontradas de acordo com as literaturas estão adequadas para o crescimento microbiano eficiente.

A concentração de N- NH_3 foi diretamente afetada pela concentração de NUS (Tabela 5) e não pelo consumo de N total. O equilíbrio entre a proteína degradável no rúmen e carboidratos fermentáveis contribuem para utilização de N- NH_3 para síntese de proteína microbiana, destacando a importância de taxas de proteína bruta para as relações de energia na dieta.

4.4 Conclusão

Recomenda-se para novilhas Holandesas o nível de 15% de proteína, pelo fato de que não altera a digestibilidade dos nutrientes, não afeta o pH nem a concentração de amônia ruminal, bem como não causa excreção excessiva de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**.16.ed. Arlington: AOAC International, 1025p; 1990.
- BACH, A; CASALMIGLIA, S; STERN, M.D. Nitrogen metabolism im the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n.1, p. E9-E21, 2005.
- BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p. 1370-1381, 2003.
- CAVALCANTE, B.A.M.; PEREIRA, G.O.; VALADARES FILHO, C.S.; et al. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: consumo, digestibilidade total e desempenho produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia** Viçosa, MG, v.34, n.3, p.711-719, 2005.
- CAVALCANTE, M.A.B.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; et al. Níveis de proteína bruta para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana .**Revista Brasileira de Zootecnia** ,Viçosa ,MG, v. 35, n.1,p.203-210,2006
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-137, 1962.
- CHANTIRATIKUL, A., CHUMPAWADEE, S., KANCHANAMAYOON, W.; et al. Effect of dietary protein on nutrient digestibility and nitrogen metabolism in Thai-Indigenous heifers, **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, p.297-300, 2009.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1813-1821, 2006.
- CHUMPAWADEE, S., CHANTIRATIKUL, A., RATTANPHUN, V.; et al. Effect of dietary protein levels on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth rate in Thai-Indigenous yearling heifers. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, p.1131-1136; 2009.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.980-984, 2010.
- DONG, L.F.; ZHANG, W.B.; ZHANG, N.F.; et al. Feeding different dietary protein to energy ratios to Holstein heifers: effects on growth performance, blood metabolites and rumen fermentation parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, p.1-8, 2016.
- DUTRA, A.R.; QUEIROZ, A.C.; THIÉBAUT, J.T.L.; et al. Efeitos dos níveis de proteína sobre a concentração do nitrogênio amoniacal e pHr uminal em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.714-722, 2004.

- GABLER, M. T.; HEINRICHS, A. J. Effects of increasing dietary protein on nutrient utilization in heifers. **Journal of Dairy Science** v.86, p.2170–2177, 2003.
- HARRIS, B. JR. MUN and BUN values can be valuable management tools. **Feedstuffs**, v.42, 1995.
- HRISTOV, A.N.; HANIGAN, M.; COLE, A.; et al. Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. **Canadian Journal of Animal Science** v. 91 p.1-35, 2011.
- KOHN, R.A. DINNEEN, M.M., RUSSEK-COHEN E. in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**, v.83 p.879–889, 2005.
- MARCONDES, M. I. et al. Exigências Nutricionais de Proteína para Bovinos de Corte. In: VALADARES FILHO. et al. 2^a Ed. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados BR- Corte**. p.113 – 134, 2010.
- MOTA, D.A.; BERCHIELLI, T.T.; CANESIN, R.C.; et al. Nutrient intake, productive performance and body measurements of dairy heifers fed with different sources of protein. **Acta Scientiarum**. v.35 p.273-279, 2013
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle** 7th Ed. Washinton,D.C NATIONAL ACADEMYPRESS , v.242, p.381, 2001
- PEREIRA, M.L.A.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.1029-1039, 2005
- PEREIRA, K. P.; VÉRAS, A.S.C.; FERREIRA, M.A.; et al. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.29, n.4, p.433-440, 2007.
- POWELL, J.M.; ROTZ, C.A.; WATTIAUX, M.A. Potential use of milk urea nitrogen to abate atmospheric nitrogen emissions from Wisconsin dairy farms. **Jornal of Environmental Quality**. v.43, n.4, p-1169-1175,2014
- QUEIROZ, M.A.; SUSIN, I.; PIRES, A.V.; et al.; Características físico-químicas de fontes proteicas e suas interações sobre a degradação ruminal e a taxa de passagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 7, p. 1587-1594, 2010.
- QUEIROZ, M.F.S; BERCHIELLI, T.T.; SIGNORETTI, R.D. et al. Metabolism and ruminal parameters of Holstein x Gir heifers fed sugarcane and increasing levels of crud protein. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v,41, n.9, p. 2101-2019, 2012.
- ROTZ, C.A.; MONTES, F.; HAFNER, S. D.; et al. Ammonia emission model for whole farm evaluation of dairy production systems. **Journal of Environmental Quality**. v.43, n.4, p.1143-1158, 2014.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rúmen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.32, n.1, p.199-208, 1974.

- SHAHZAD, M.A., NASIR, A., TAUQIR, F.A.; et al. Effects of feeding different dietary protein and energy levels on the performance of 12-15 month old buffalo calves, **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.685-694; 2011.
- TEIXEIRA, R.M.A.; LANA, R.P.; FERNANDES, L.O.; et al.; Desempenho produtivo de vacas da raça Gir leiteira em confinamento alimentadas com níveis de concentrado e proteína bruta nas dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia** Viçosa, MG, v.39, n.11, p.711-719, 2010.
- TEODORO, A.L.; OLIVEIRA, M.V.M; VARGAS JUNIOR, F.M. et al. Níveis de proteína na dieta de novilhas da raça pantaneira: Desempenho e digestibilidade aparente. **Archivos de Zootecnia**, p.369-378, 2013.
- TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços f1 Simental x Nelore. 1. Consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.3, p.910-920, 2000.
- VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D. S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. 2ed. **Nutrição de Ruminantes**. FAPESP:Jaboticabal, SP, p.161-189, 2011.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- VÉRAS, R.M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; et al. Balanço de compostos nitrogenados e estimativa das exigências de proteína de manutenção de bovinos Nelore de três condições sexuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p. 1212-1217, 2007

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eliminação de amônia respiratória tem sido estudada por muito tempo em humanos, principalmente com o objetivo de relacionar valores obtidos com patologias.

Estes estudos comprovaram que a eliminação da amônia respiratória pode ser alterada em função da dieta, contudo neste trabalho não foi observado tal fato em ruminantes alimentados com níveis crescentes de proteína bruta na dieta.

Desta forma, eliminação de amônia respiratória não é proposta para uso como indicador do *status* proteico em ruminantes. Mais estudos precisam ser realizados visando o desenvolvimento de estratégias para balancear adequadamente dietas.

A utilização de níveis de proteína bruta em dietas não causou alteração nos consumos e digestibilidade dos nutrientes, contudo devem-se balancear as dietas de forma adequada, pois o desbalanceamento causa desperdício de proteína bem como influencia no desempenho do animal.