

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

**DIEISSON GREGORY GRUNEVALD**

**AMÔNIA RESPIRATÓRIA NA AVALIAÇÃO DO *STATUS* NUTRICIONAL  
PROTEICO EM BOVINOS**

**Marechal Cândido Rondon – PR**

**2021**

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

**DIEISSON GREGORY GRUNEVALD**

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - na Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ériton Egídio Lisboa Valente  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maximiliane Alavarse Zambom

**Marechal Cândido Rondon – PR**

**2021**

## DIEISSON GREGORY GRUNEVALD

### **Amônia respiratória na avaliação do *status* nutricional proteico em bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Doutor em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Ruminantes/Forragicultura”, APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:



Orientador / Presidente – Prof. Dr. Ériton Egidio Lisboa Valente  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

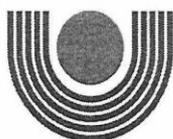
Membro – Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Dr. Sidnei Antônio Lopes  
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)

Membro – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Heloisa Avelino Cabral  
Universidade Federal de Rondonópolis (UFR)

Membro – Prof. Dr. Luís Fernando Glasenapp de Menezes  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Dois Vizinhos

Marechal Cândido Rondon, 17 de junho de 2021.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. ÉRITON EGIDIO LISBOA VALENTE**, declaro como **ORIENTADOR** que presidi os trabalhos de defesa à **distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Dieisson Gregory Grunevald**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientador**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que o candidato foi considerado **APROVADO** na banca realizada em 17/06/2021, com o trabalho intitulado **“Amônia respiratória na avaliação do status nutricional proteico em bovinos”**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

O candidato foi aprovado por decisão unânime da banca.

**Prof. Dr. ÉRITON EGIDIO LISBOA VALENTE** - ORIENTADOR/PRESIDENTE

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / Campus de Mal. Cândido Rondon



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Dieisson Gregory Grunevald**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Interno**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 17/06/2021, com o trabalho intitulado **“Amônia respiratória na avaliação do *status* nutricional proteico em bovinos”**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

O doutorando deverá realizar as correções sugeridas pelos membros da banca, as quais foram discutidas durante a defesa da tese.

*Newton Tavares Escocard de Oliveira.*

**Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Dr. Sidnei Antônio Lopes**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Dieisson Gregory Grunevald**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

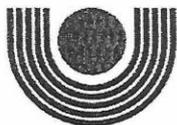
Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 17/06/2021, com o trabalho intitulado **"Amônia respiratória na avaliação do status nutricional proteico em bovinos"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Pequenas correções para a versão final

**Dr. Sidnei Antônio Lopes**

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Heloisa Avelino Cabral**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Dieisson Gregory Grunevald**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 17/06/2021, com o trabalho intitulado **“Amônia respiratória na avaliação do *status* nutricional proteico em bovinos”**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Heloisa Avelino Cabral**  
Universidade Federal de Rondonópolis (UFR)



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

#### DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Luís Fernando Glasenapp de Menezes**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Dieisson Gregory Grunevald**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 17/06/2021, com o trabalho intitulado **"Amônia respiratória na avaliação do status nutricional proteico em bovinos"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

**Prof. Dr. Luís Fernando Glasenapp de Menezes**

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – *Campus Dois Vizinhos*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre se fazer presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Gilberto Grunevald e Marinês de Oliveira Grunevald, meu irmão Felipe Grunevald e à minha noiva Jaqueline Laura Müller, pela compreensão e companheirismo que tiveram durante todos os momentos ausentes e difíceis que compartilhei com vocês. Também por todo amor, carinho e incentivo que sempre me proporcionaram. Agradeço também aos meus sogros, Bruno e Lúcia Müller por todo apoio e incentivo.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela disponibilidade de realização deste trabalho e por ser fonte de conhecimento e difusora de pesquisa.

Aos Professores, Dr. Ériton Egídio Lisboa Valente e Dr<sup>a</sup> Maximiliane Alavarse Zambom pela orientação, paciência, ensinamentos, parceria profissional e, principalmente, por ter acreditado em mim.

Aos professores da banca: Dr<sup>a</sup> Carla Heloísa Avelino Cabral, Dr. Fernando Glasenapp de Menezes, Dr. Sidnei Antônio Lopes, Dr. Newton Escocard pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho, pela autorização para utilização do setor no qual é responsável, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Paulo Henrique Morsch, secretário do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UNIOESTE, pela dedicação, disponibilidade e respeito sempre.

A Fundação Araucária/SETI, por meio de bolsa concedida (20/2015) tornando possível a realização do trabalho.

A todos os integrantes do NEAPEC pela amizade e por todo apoio na realização do doutorado e do experimento.

A todos os funcionários e amigos do Núcleo de Estações Experimentais Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa.

A todos aqueles que de alguma forma cooperaram para que pudesse chegar a mais esta conquista em minha vida.

**Muito obrigado!**

## **EPÍGRAFE**

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”  
Dalai Lama

## RESUMO GERAL

GRUNEVALD, D. G. Doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Junho 2021. **AMÔNIA RESPIRATÓRIA NA AVALIAÇÃO DO STATUS NUTRICIONAL PROTEICO EM BOVINOS.** Orientador Dr. Ériton Egídio Lisboa Valente.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o uso da amônia respiratória como bioindicador de nutrição proteica em bovinos e avaliar o ajuste de modelos de predição da excreção de nitrogênio urinário (NU), com amônia respiratória (AE), nitrogênio ureico sérico (NUS) e nitrogênio amoniacal no rúmen (NAR). Os tratamentos avaliados foram dietas com 10%, 13% e 16% de proteína bruta (PB) na matéria seca. Foram utilizados seis novilhos não castrados da raça Holandês, com idade média de 9 meses e massa corporal média inicial de 279,91 kg, em delineamento duplo quadrado latino 3x3. As dietas foram fornecidas às 7h e às 19h. Os horários de avaliação foram às 0h, 6h, 12h e 18h. Foi avaliada a relação do teor dietético de PB sobre o fluxo de amônia respiratória e a concentração de amônia ar expirado e rúmen. Adicionalmente, analisou-se o método de NH<sub>3</sub> respiratória em comparação com NUS e NAR. Para a escolha do modelo mais adequado, os modelos foram testados por meio de regressão linear múltipla, observando o nível de significância de 5% e com base no coeficiente de determinação. Os modelos múltiplos testados envolveram o consumo de matéria seca, teor proteico da dieta, consumo de proteína, AE, NUS e NAR. Foi observado aumento linear ( $P < 0,05$ ) no consumo e digestibilidade aparente de PB, bem como excreção de nitrogênio na urina (ENU) e nas fezes e efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) de fluxo, concentração de NH<sub>3</sub>, NUS e NAR com o aumento da proteína da dieta ( $P < 0,05$ ). A NH<sub>3</sub> expirada e NUS apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os horários de amostragem, em que as maiores médias ocorreram às 12h. Também houve correlação positiva ( $r > 0,5$ ) de fluxo, concentração de amônia, NUS e NAR com consumo de PB, níveis de PB da dieta e ENU. A maior correlação encontrada ocorreu entre NAR e ENU ( $r = 0,85$ ). O modelo de regressão linear da excreção de nitrogênio na urina em função do teor de proteína na dieta ( $P < 0,05$ ) apresentou coeficiente de determinação de 37,9. O melhor modelo com a AE foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína dietética e o consumo de proteína bruta ( $R^2 = 42,5$ ) com fator de inflação de variância (FIV) menor que 2,01. O melhor modelo com o NUS foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína na dieta ( $R^2 = 31,8$ ; FIV = 1,49). O melhor modelo com o NAR foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína na dieta e consumo de matéria seca ( $R^2 = 67,8$ ; FIV < 1,6). Concluiu-se que o AE apresenta menor ajuste em regressão múltipla que o NAR, e maior ajuste que modelos com NUS e somente com teor proteico da dieta. Concluiu-se que a excreção de amônia respiratória pode ser utilizada como

bioindicador de nutrição proteica e que AE pode ser utilizada para predição da excreção urinária de nitrogênio em bovinos.

**Palavras - Chave:** Excreção, metabolismo, modelo, nitrogênio, proteína bruta, ruminantes

## GENERAL ABSTRACT

GRUNEVALD, D. G. Doctorate in Animal Science. Western Paraná State University. June 2021. **BREATH AMMONIA IN THE ASSESSMENT OF PROTEIN NUTRITIONAL STATUS IN CATTLE**. PhD advisor Ériton Egídio Lisboa Valente.

This work was carried out with the objective of assessing the use of breath ammonia as a bioindicator of protein nutrition in cattle and to assess the adjustment of predictive models of urinary nitrogen (UN) excretion with breath ammonia (BA), serum urea nitrogen (SUN), and rumen ammonia nitrogen (RAN). The assessed treatments were diets with 10%, 13%, and 16% of crude protein (CP) in the dry matter. Six non-castrated Holstein calves were used, with a mean age of 9 months and a mean initial body mass of 279.91 kg, in a 3x3 double Latin square design. Diets were provided at 7:00 am and 7:00 pm. The assessment was carried out at 12:00 am, 06:00 am, 12:00 pm, and 06:00 pm. The relationship of dietary CP content on breath ammonia flow, and ammonia concentration in expired air and rumen was assessed. Additionally, breath NH<sub>3</sub> method was analyzed in comparison with SUN and RAN. To choose the most appropriate model, the models were tested by means of multiple linear regression, observing a significance level of 5% and based on the coefficient of determination. The multiple models tested involved dry matter intake, dietary protein content, protein intake, BA, SUN, and RAN. A linear increase ( $P < 0.05$ ) was observed in the intake and apparent digestibility of CP, as well as nitrogen excretion in urine (NEU) and feces, and positive linear effect ( $P < 0.05$ ) of flow, NH<sub>3</sub> concentration, SUN, and RAN with increased dietary protein ( $P < 0.05$ ). Expired NH<sub>3</sub> and SUN showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the sampling times, in which the highest averages occurred at 12:00 pm. There was also a positive correlation ( $r > 0, 5$ ) of flow, ammonia concentration, SUN and RAN with CP intake, dietary CP levels, and NEU. The highest correlation found was between RAN and NEU ( $r = 0.85$ ). The linear regression model of nitrogen excretion in urine due to protein content in the diet ( $P < 0.05$ ) showed a determination coefficient of 37.9. The best model with BA was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content and crude protein intake ( $R^2 = 42.5$ ) with a variance inflation factor (VIF) lower than 2.01. The best model with SUN was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content ( $R^2 = 31.8$ ;  $VIF = 1.49$ ). The best model with the RAN was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content and dry matter intake ( $R^2 = 67.8$ ;  $VIF < 1.6$ ). It is concluded that BA presents a lower adjustment in multiple regression than RAN, and greater adjustment than models with SUN and only with dietary protein content. What's more, breath ammonia excretion can be used as a bioindicator of protein nutrition and BA can be used to predict urinary nitrogen excretion in cattle.

**Keywords:** Excretion, metabolism, model, nitrogen, crude protein, ruminants.

## LISTA DE FIGURAS

### **Artigo 1: A AMÔNIA RESPIRATÓRIA PODE SER UTILIZADA COMO BIOINDICADOR DE NUTRIÇÃO PROTEICA?**

Figura 1: NH<sub>3</sub> expirado (ppb), Nitrogênio ureico sérico (NUS), Nitrogênio amoniacal do rúmen e pH ruminal em função dos horários de amostragem. .... 44

Figura 2: Correlação de Pearson entre fluxo de amônia (NH<sub>3</sub>, uM/min), NH<sub>3</sub> expirado (ppb), NH<sub>3</sub> ruminal (ppb), Nitrogênio Ureico Sérico (NUS, mg/dl) Nitrogênio Amoniacal do Rúmen (NAR, mg/dl) e o Consumo de Proteína Bruta (kg/d), Excreção de Nitrogênio na urina (ENU, g/dia), proteína bruta (PB, g/kg)..... 45

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1: A AMÔNIA RESPIRATÓRIA PODE SER UTILIZADA COMO BIOINDICADOR DE NUTRIÇÃO PROTEÍCA?**

Tabela 1: Composição percentual da dieta experimental .....37

Tabela 2: Médias dos tratamentos, erro padrão da média e contrastes para consumo, digestibilidade e excreção de nitrogênio. ....41

Tabela 3: Média dos tratamentos, erro padrão da média, interações e contrastes para amônia, NUS, NAR e pH. ....43

### **Artigo 2: MODELAGEM DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITROGÊNIO UTILIZANDO PARÂMETROS TRADICIONAIS E AMÔNIA EXPIRADA EM BOVINOS**

Tabela 1: Composição percentual da dieta experimental .....54

Tabela 2: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de proteína bruta da dieta, consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca.....56

Tabela 3: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de amônia expirada, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca .....57

Tabela 4: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de nitrogênio amoniacal no rúmen, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca.....58

Tabela 5: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de nitrogênio ureico no sangue, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca .....59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Rúmen – Visão Geral.....	20
2.2 Degradação ruminal da proteína .....	20
2.3 Fatores que afetam a degradação de proteína no rúmen .....	22
2.4 Proteína não degradada no rúmen (PNDR) .....	23
2.5 Excesso ou falta de proteína na dieta .....	23
2.6 Bioindicadores do status de nutrição proteica .....	24
2.7 Amônia respiratória .....	26
2.8 Referências bibliográficas.....	27
3 A AMÔNIA RESPIRATÓRIA PODE SER UTILIZADA COMO BIOINDICADOR DE NUTRIÇÃO PROTEICA? .....	33
3.1 Introdução .....	35
3.2 Materiais e Métodos.....	36
3.2.1 Tratamentos e manejo.....	36
3.2.2 Coleta de dados.....	37
3.2.3 Análises laboratoriais .....	39
3.2.4 Análise Estatística .....	40
3.3 Resultados e discussão .....	40
3.4 Conclusão.....	46
3.5 Referências bibliográficas: .....	47
4 MODELAGEM DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITROGÊNIO UTILIZANDO PARÂMETROS TRADICIONAIS E AMÔNIA EXPIRADA EM BOVINOS.....	50
4.1 Introdução .....	52
4.2 Materiais e métodos .....	53
4.2.1 Tratamentos e manejo.....	53
4.2.2 Coleta de dados.....	54
4.2.3 Análises laboratoriais .....	55
4.2.4 Análise estatística .....	56
4.3 Resultados e discussão.....	56
4.4 Conclusão.....	60
4.5 Referências Bibliográficas .....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimento no mundo aumenta constantemente em consequência do aumento da população mundial e desta forma há um forte apelo para a melhoria da eficiência no sistema produtivo. Neste sentido, a proteína é um componente extremamente importante, por ser um dos principais nutrientes que compõe a dieta dos animais de produção, estando envolvida em diversas atividades metabólicas, influenciando diretamente no ganho de peso, produção de leite e fertilidade, entre outros parâmetros (DIAS et al., 2010).

Fontes proteicas têm alta demanda tanto em confinamentos, onde o concentrado é a base da dieta e também em bovinos em condições extensivas e semiextensivas, onde a oferta de proteína via forragem é baixa no período da seca e há a necessidade de suplementação (MANELA, LOURENÇO, LEME, 2002).

Com relação a custos, a proteína representa o nutriente de maior custo em rações/suplementações (ALVES et al., 2010), tendo seu preço e disponibilidade atrelada a variações nos rendimentos dos grãos (FORTELEZA, et al., 2009).

Outro fator de extrema importância quando se fala em proteína bruta atrelada a produção animal, se diz respeito ao meio ambiente, pois quando há excesso de proteína bruta na dieta ocorre elevada excreção de compostos nitrogenados devido à conversão de amônia excedente em ureia (ALVES, 2012), tornando-se assim um poluente, além de acarretar um desvio energético (VAN SOEST, 1994).

Diante disso, as dietas devem ser balanceadas de modo a atender as exigências dos animais, sem perdas ou excesso. Assim sendo, atualmente existem análises que nos permitem avaliar o *status* proteico na dieta, como por exemplo, nitrogênio ureico sérico (NUS) e nitrogênio amoniacal no rúmen (NAR; SILVA et al., 2019). Contudo estes testes podem ser considerados invasivos e estressantes aos animais.

Estudos recentes indicam que uma parte da amônia circulante no sangue pode se difundir e chegar até os alvéolos pulmonares e desta forma ser eliminada através das trocas gasosas do animal com o ambiente (NERI et al., 2012). Sendo assim, amônia respiratória surge com um potencial método de indicador da nutrição proteica, de maneira não invasiva (VALENTE et.al., 2018).

No entanto, observou-se ausência de estudos avaliando esta metodologia, bem como poucos estudos com uso de modelos matemáticos para prever a relação entre excreção de nitrogênio na urina, amônia expirada e as demais metodologias.

Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o potencial da amônia respiratória como indicador da nutrição proteica e também avaliar o ajuste de modelos para predição da excreção de nitrogênio urinário utilizando a amônia expirada, NAR, NUS, consumo de matéria seca, consumo de proteína bruta e proteína bruta na dieta.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Rúmen – Visão Geral**

Os bovinos possuem três pré-estômagos ou câmaras fermentativas (rúmen, retículo e omaso), que antecedem o abomaso, (considerado como estômago e principal sítio digestivo), conferindo aos ruminantes, melhor aproveitamento de nutrientes, principalmente de carboidratos fibrosos (VAN SOEST, 1994), a exemplo da celulose e hemicelulose.

Uma das principais características do rúmen são papilas cônicas, formadas por tecido conjuntivo, coberto por epitélio, cuja função é absorver os produtos da fermentação dos microrganismos presentes (OLIVEIRA, SANTOS, VALENÇA, 2019).

A fermentação dos nutrientes pela ação do metabolismo dos microrganismos ruminais é oriunda da conversão de compostos da dieta em proteína microbiana, amônia, nitrato, ácidos graxos voláteis (AGV's), dióxido de carbono, vitaminas do complexo B e vitamina K (OWENS, GOESTSCH, 1993).

Desta forma, as avaliações do *status* nutricional dos animais devem considerar as múltiplas interações entre os microrganismos ruminais e o hospedeiro. Destacando a proteína como um dos principais compostos fermentados por microrganismos no rúmen, a adequação de dietas visando minimizar as perdas nitrogenadas pelos animais, bem como o crescimento da população microbiana e desempenho animal não devem ser avaliadas de forma exclusiva (PEREIRA et al., 2005).

### **2.2 Degradação ruminal da proteína**

As proteínas podem ser classificadas como proteínas simples, que são compostos por AA unidos por ligações peptídicas ou proteínas complexas, que além de possuir AA em sua composição, também pode possuir outros compostos, como lipídeos (lipoproteínas), açúcares (glicoproteínas) ou grupo heme (hemoproteínas) (NRC, 2001).

A proteína é um nutriente importantíssimo na dieta de ruminantes, relacionadas a diversas funções vitais no organismo, tais como: “Crescimento e reparo dos tecidos, catálise enzimática, transporte e armazenamento, movimento coordenado, sustentação mecânica,

proteção imunitária, geração e transmissão de impulsos nervosos, controle do metabolismo, do crescimento e da diferenciação celular” (MARCONDES et al., 2010).

A PB contida nos alimentos dos ruminantes é composta por uma fração degradável no rúmen (PDR) e uma fração não degradável no rúmen (PNDR). Quando o bovino ingere o alimento, parte da proteína bruta presente na dieta será degradada no rúmen (PDR), pelo fato de que os ruminantes possuem interação simbiótica entre o animal e os microrganismos ruminais (COSTA et al., 2015). Desta forma, a digestão de proteína que ocorre no rúmen está relacionada a capacidade de degradação por microrganismos ruminais (JOBIM et. al., 2011), que utilizam o nitrogênio (N) contido nos alimentos, como aporte metabólico para nutrição e consequentemente desenvolver a população microbiana (LAZZARINI et al., 2009).

A degradação da proteína no rúmen tem início na ligação dos microrganismos ruminais (principalmente bactérias) ao alimento, resultando da diminuição do tamanho das partículas pela atividade das proteases (BACH, CASAMIGLIA, STERN, 2005).

Por meio de proteólise ruminal, os microrganismos realizam em um primeiro momento a hidrólise das moléculas proteicas em polipeptídios (nos pontos da cadeia que contém serina, cisteína ou aspartato), para então serem hidrolisados liberando peptídeos, aminoácidos (OLIVEIRA et al., 2007) e posteriormente em amônia (RIBEIRO et al, 2014). É válido salientar que a digestão por meio de proteases ligado a microrganismos ruminais é intensa, pois as proteínas são compostas por variadas combinações entre os 20 aminoácidos conhecidos atualmente (FURLAN, MACARI, FARIA FILHO, 2011).

O aminoácido (AA) formado adentra as bactérias e sofre alguns processos: degradação dos pequenos peptídeos a AA's livres, incorporação dos AA's livres e síntese microbiana, desaminação dos AA's livres em amônia e esqueletos de carbônicos (fonte de energia), utilização de amônia para formação de AA's e por fim, difusão da amônia para fora da célula (PINA et al., 2016) e então, parte da amônia presente no líquido ruminal assimilada pelos microrganismos ruminais, será convertida em proteína microbiana (GUIMARÃES JUNIOR et al., 2009).

A proteína microbiana, oriunda do rúmen é composta de uma mistura da flora ruminal, composta de bactérias, protozoários e fungos, representando mais de 50% da proteína que chega até o intestino delgado, (SCHWAB; BRODERICK, 2017). Contudo, Valente et al., (2016), salientam que a proteína microbiana sintetizada no rúmen é responsável pelo fornecimento de 40 – 90% da proteína que chega ao intestino delgado.

Estes valores variam, pois, a quantidade de proteína microbiana que chegará ao intestino delgado dependerá do fluxo microbiano e também da eficiência de produção

microbiana (AGUIAR et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2006). A proteína microbiana é de extrema importância no metabolismo animal, pois se trata de uma proteína de alto valor biológico devido a sua composição aminoacídica, que é semelhante aos AA sintetizados pelo animal, como por exemplo, AA's que formam a caseína (PINA et al, 2016).

### **2.3 Fatores que afetam a degradação de proteína no rúmen**

A degradação de proteína pode ser descrita como o processo que leva a quebra das cadeias aminoacídicas até sua transformação em amônia (BRODERICK, 1995). Contudo, este processo é complexo e depende de muitos fatores, tais quais: tipo de proteína, interações com outros ingredientes, população microbiana predominante, cuja ação também depende de fatores, como taxa de passagem e pH ruminal (BACH, 2005), entre outros.

Um dos fatores relacionados à velocidade em que uma proteína é convertida em amônia no rúmen, diz respeito à sua solubilidade (PEREIRA, et al., 2005), ou seja, velocidade em que a proteína é hidrolisada (proteases).

Atualmente, o CNPS (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System) classifica as proteínas dos alimentos, conforme sua solubilidade, estimando por meio de equações a digestão e a passagem destas frações, levando em consideração a fermentação ruminal (SNIFFEN, et al., 1992).

A solubilidade das proteínas pelo CNPS é dividida em frações da seguinte forma: fração A (fração solúvel – nitrogênio não proteico (NNP)), B1 (fração solúvel rapidamente degradada no rúmen), B2 (fração insolúvel, com taxa de degradação intermediária no rúmen), B3 (fração insolúvel lentamente degradada no rúmen) e fração C que é indigestível durante sua permanência no trato gastrintestinal.

Porém, a solubilidade de uma proteína, está diretamente relacionada com sua configuração estrutural. A albumina, por exemplo, é uma proteína de alta solubilidade, porém devido a sua estrutura possuir ligações de dissulfetos, o processo de degradação é lento (BACH, CASAMIGLIA, STERN, 2005).

A importância do CNPS, bem como o conhecimento sobre a solubilidade e estrutura de uma proteína, e que influencia diretamente na eficiência da degradação proteica, se deve a outro fator: as inter-relações com outros ingredientes, principalmente os carboidratos não fibrosos (CNF), ou seja, disponibilidade e sincronia entre energia e compostos nitrogenados.

Os carboidratos de modo geral, são fermentados e convertidos em ácidos graxos voláteis (AGV's) no rúmen, que são utilizados como fonte de energia para a manutenção e/ou crescimento da população de microrganismos (ALVES et al., 2009).

Quando não há sincronização entre as frações, dietas ricas em carboidratos e proteínas de alta degradabilidade há chances de ocorrer excesso de energia (oriunda de AGV's) e deficiência de nitrogênio pelo não aproveitamento de amônia, reduzindo assim a eficiência de fermentação ruminal e síntese microbiana (NETO et al., 2007). Os autores citados anteriormente, estudando o efeito de dietas com níveis crescentes de proteína degradável no rúmen, associada a fonte de amido de alta degradabilidade ruminal, observaram efeito quadrático no teor de proteína degradada no rúmen sobre a digestibilidade da matéria seca, indicando o efeito da sincronização entre a disponibilidade entre energia e nitrogênio.

Segundo Church (1993), mudanças nas concentrações de AGV's e amônia, levam a alteração no pH ruminal e conseqüentemente nas espécies de microrganismos predominantes no rúmen. Em dietas ricas de carboidratos não fibrosos, é comum encontrar valores de pH ruminal abaixo de 5,0, após o consumo (ZILIO, et al. 2011), contudo o pH ideal para máxima ação proteolítica situa-se entre 6,0 a 7,0 (DOMINGUES et al., 2010)

A sensibilidade ao pH de bactérias proteolíticas e conseqüente capacidade de sobreviver e crescer, dependem, além do gradiente elétrico, da capacidade de geração de uma ação próton-motora do citoplasma, que permite captar substratos do meio externo e desta forma (KOZLOSKI, 2011).

#### **2.4 Proteína não degradada no rúmen (PNDR)**

A proteína que não foi metabolizada pelos microrganismos, sofrerá a ação de proteases originadas da mucosa gástrica, pâncreas e também pela mucosa intestinal, sendo reduzidas a aminoácidos e peptídeos para serem absorvidos no intestino delgado (MEDEIRO; MARINO, 2015), representando outra fonte importante de AA, que auxiliarão no suprimento das exigências do animal (BRANCO et al., 2006).

O atendimento da exigência em aminoácidos dos ruminantes ocorre então, por meio da proteína metabolizável, que corresponde a soma da proteína microbiana, aminoácidos e proteína endógena absorvidas no intestino delgado. (SANTOS, 2006).

Desta forma, a proteína degradada no rúmen fornece substrato para o desenvolvimento dos microrganismos e a proteína não degradada no rúmen complementa a proteína microbiana no atendimento das exigências de proteína metabolizável (CLARINDO et al., 2008).

#### **2.5 Excesso ou falta de proteína na dieta**

Um dos principais limitantes para o crescimento de bactérias ruminais é a disponibilidade de N (PEREIRA et al, 2020), porém os ruminantes possuem baixa eficiência

na utilização de N (em torno de 25%) (CALSAMIGLIA et al., 2010). Assim sendo, o desafio da nutrição de precisão, é fornecer todo o aporte de N aos microrganismos ruminais e PNDR de forma assertiva, sem falta ou excesso.

A falta de proteína ou fornecimento de proteínas de baixa degradabilidade resultará no não atendimento das exigências nutricionais dos animais, devido ao baixo aporte de nitrogênio para os microrganismos ruminais, comprometendo a expressão de sua máxima produção.

O excesso proteico levará ao desequilíbrio entre N e energia (LADEIRA et al., 2002; MOREIRA et al., 2001) prejudicando o desempenho animal em maior escala do que a falta de aporte proteico. Os prejuízos do excesso proteico na dieta, de modo geral são: desperdício econômico, alterações produtivas e reprodutivas, aumento na excreção de urina e por consequência um maior gasto energético metabólico para sintetizar e eliminar a ureia, aumentando assim, a contaminação ambiental (VALADARES FILHO, et al. 2009).

Existem situações em que mesmo havendo excesso de proteína dietética, poderá haver deficiência proteica. Isso pode ocorrer quando fontes proteicas tiverem baixa degradabilidade e comprometer a disponibilidade de N para bactérias ruminais (MEDEIROS; MARINO, 2015).

Em uma dieta com excesso de proteína, a degradação ruminal excede a capacidade de absorção de aminoácido e amônia, levando ao aumento da amônia ruminal (MALACCO et al., 2015) e em muitos casos, até 25% da proteína podem ser perdidas na forma de amônia (MOREIRA et al., 2001). É de extrema importância que a amônia em excesso seja convertida, pois a mesma é 40 vezes mais tóxica que a ureia (KITAMURA et al., 2002).

Para cada molécula de ureia formada a partir de uma molécula de amônia, há um gasto energético bruto de três moléculas de ATP. Durante o processo de conversão no ciclo da ureia, forma-se uma molécula de fumarato, que será incorporada ao ciclo do ácido cítrico, gerando assim duas moléculas de ATP, resultando ao final do processo, uma molécula de ATP por molécula de ureia formada (MORAES, et al., 2012). Contudo, a ureia ainda pode ser reciclada e reaproveitada, voltando ao rúmen, via saliva ou via corrente sanguínea (NASCIMENTO et al., 2016).

## **2.6 Bioindicadores do status de nutrição proteica**

Os bioindicadores ou indicadores bioquímicos podem ser definidos como substâncias endógenas utilizadas para verificar fenômenos de natureza fisiológica, metabólica, nutricional e patológicos, podendo ser identificados em excreções e parâmetros sanguíneos

(NASCIMENTO et al., 2016). Os bioindicadores são extremamente importantes na hora de tomada de decisão em todos os setores de produção, nos permitindo o ajuste dos manejos nutricionais, reprodutivos, entre outros.

Alguns bioindicadores são comumente utilizados como formas de avaliação do *status* proteico da dieta, como por exemplo, a excreção de nitrogênio urinário (NU), o nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) e nitrogênio ureico sérico (NUS). Estes três bioindicadores apresentam correlação entre si, devido ao processo metabólico do nitrogênio. Contudo, estes três métodos (NUS, NAR e NU) podem ser considerados invasivos, causando estresse aos animais, além de estar susceptíveis aos erros analíticos.

Concentrações elevadas de N-NH<sub>3</sub> podem indicar excesso de proteína degradada no rúmen, em que valores entre 15 e 29mg/dL são considerados ideais para otimizar a fermentação da fibra e a síntese microbiana (ÁUREA et al., 2017). Desta forma, o uso de NAR representa um dos componentes utilizados frequentemente como indicador tanto de degradação proteica e equilíbrio entre produção, absorção e utilização pelos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2007), sendo a utilização dependente da energia disponível (ZEOULA et al., 1999).

A amônia ruminal não utilizada pelos microrganismos é absorvida por meio da parede ruminal, entra na corrente sanguínea pela veia porta e chega até o fígado, onde será convertido em ureia (BACH et al., 2005). Uma vez, o N circulante na corrente sanguínea, nos permite o diagnóstico e avaliação de alimentos na nutrição animal e estimar o processo de adaptação metabólica em mudanças nutricionais e fisiológicas (FREITAS JUNIOR, et al., 2010). Além do nitrogênio ureico do sangue (NUS) a albumina sérica também é um metabolito utilizado para monitorar o status nutricional proteico em bovinos (PEIXOTO et al., 2006).

Após a conversão da ureia pelo fígado, o N que não for reciclado via saliva ou epitélio ruminal, será eliminado via urina (WENERSBACH FILHO et al., 2006), sendo então a excreção do nitrogênio ureico urinário um excelente indicativo do aproveitamento proteico da dieta pelos animais. Além da excreção de ureia via urina, a partir do excesso de NH<sub>3</sub> no rúmen, o animal ainda pode perder N de outras formas. São elas: ácidos nucleicos sintetizados no rúmen, excreção fecal e urinária oriundas de secreções endógenas e excreção fecal de proteína microbiana não digerida (DIJKSTRA et al., 2013).

Entretanto, além das informações que os bioindicadores metabólicos nos fornecem a respeito da nutrição de ruminantes (ROCHA et al., 2016; AGUIAR et al., 2015), é necessário avaliar as variáveis envolvidas de maneira mais ampla.

Devido a inúmeros fatores que alteram a degradação proteica ruminal (tipo de proteína do alimento que compões a dieta, a taxa de diluição ruminal, pH, substrato, além de interação entre os nutrientes; BACH, CALSAMIGLIA, STERN, 2005), ambiente e animal, estudos com modelagem de dados estão sendo desenvolvidos para prever a excreção de N na urina, correlacionado com os bioindicadores, no intuito de melhorar a acurácia dos dados e garantir um fino ajuste na dieta e de forma coletiva.

Dong, Zhao, Chang (2014), analisaram um conjunto de dados com 49 estudos publicados, 180 dietas diferentes, compreendendo um total de 869 animais. Estes autores observaram que a ingestão de N foi o principal preditor da excreção de N na urina e nas fezes, enquanto o melhor modelo ajustado para excreção de N total na urina foi relacionado à digestibilidade aparente de N.

Em outro estudo, Konh et al (2005), utilizando um banco de dados com 41 publicações, encontraram uma forte correlação entre N ureico sérico e excreção de N na urina. Os autores também afirmaram que se NUS pode prever a excreção de N na urina, conseqüentemente a taxa de excreção fecal, taxa de ingestão de N e eficiência também poderiam ser preditos por estes modelos.

Atualmente, existem vários modelos que conseguem prever a relação de excreção de nitrogênio via urina, com NUS, NAR e também com relação ao nitrogênio presente no leite, contudo, estudos avaliando a amônia respiratória como um potencial bioindicador do status de nutrição proteica, ainda são escassos.

## **2.7 Amônia respiratória**

O potencial do uso de indicadores respiratórios em diagnósticos e análises clínicas é reconhecida há séculos (HILLIBARD; KILLARD, 2011). Da mesma forma, a amônia respiratória vem sendo amplamente estudados em seres humanos, comumente relacionado a distúrbios de metabolismo proteico (CHEN et al., 2020; BEVEC et al., 2017), porém estudos em ruminantes ainda são escassos.

Uma parte da amônia circulante na corrente sanguínea, antes de chegar ao fígado, consegue ser absorvido e chegar até os pulmões, onde é excretada via respiração (KRISHNAN et al., 2016). Pessoas com problemas de insuficiência renal apresentaram elevada concentração de amônia respiratória, pois não conseguem eliminar os compostos nitrogenados excedentes no organismo (LE MAOUT et al., 2018) e por este motivo, necessitam de um diagnóstico rápido, prático e não invasivo.

O acúmulo de nitrogênio ureico no sangue (NUS) por pacientes com problemas renais e a relação entre  $\text{NH}_3$  respiratória, foram observadas por Chuang et al., (2017). Os autores observaram redução de  $\text{NH}_3$  na respiração e também de nitrogênio ureico no sangue, em pacientes após a hemodiálise, obtendo também correlação positiva ( $r = 0,82$ ) entre os dois parâmetros. Os mesmos autores neste trabalho, também testaram um dispositivo com sensor TFB e por meio dos resultados obtidos, concluíram que este sensor pode ser utilizado na detecção de  $\text{NH}_3$  respiratória, em tempo real e de baixo custo para pacientes que realizam hemodiálise.

Estudos na área de detecção de  $\text{NH}_3$  respiratória e sua utilidade como bioindicador do metabolismo de N estão ocorrendo de forma mais intensa. Estudo semelhante foi realizado por Shang et al., (2019), em que o sensor testado, foi capaz de detectar diferenças entre pacientes antes e depois da hemodiálise, além de registrarem forte correlação ( $r = 0,96$ ) entre  $\text{NH}_3$  respiratória e NUS. Contudo, os autores relatam que ainda há muitos desafios na integração de metodologias rápidas, práticas e de baixo custo.

Outra forma de avaliar a relação do status de nutrição proteica com relação a  $\text{NH}_3$  respiratória, diz a respeito da relação com a saliva, pois a ureia antes de ser eliminada do organismo, pode ser reciclada via saliva. Chen et al., (2016), estudaram a  $\text{NH}_3$  respiratória em pacientes que tinham doenças renais em estágio final como biomarcador potencial para pacientes que faziam hemodiálise. Os autores encontraram forte correlação entre a ureia no sangue e a uréase salivar ( $r = 0,77$ ,  $P < 0,001$ ) e urease salivar correlacionada com  $\text{NH}_3$  respiratória, indicando que hidrólise da ureia pela urease salivar.

Em estudo com bovinos Valente et al., (2018), encontraram correlação positiva entre a amônia respiratória, com o nitrogênio ureico sanguíneo (NUS) e a excreção de nitrogênio na urina. Embora os resultados até agora são promissores quanto as mais diferentes metodologias, a  $\text{NH}_3$  respiratória ainda necessita de mais estudos, principalmente no que diz respeito aos ruminantes.

## 2.8 Referências bibliográficas

- AGUIAR M. A.; SILVA, F. F.; DONATO, S. L. R. et al., Síntese de proteína microbiana e concentração de ureia em novilhas leiteiras alimentadas com palma forrageira. **Opuntia Semina: Ciências Agrárias**, vol. 36, núm. 2, pp. 999-1012. 2015.
- AUREA, A. P.; EZEQUIEL, J. M. B.; AUREA, E. M. O. et al., Glicerina associada à ureia na terminação de bovinos: parâmetros ruminais, digestibilidade e massa microbiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.1, p.146-154, 2017.

- ALVES, T. C.; FRANZOLIN, R.; RODRIGUES, P. H. et al Efeitos de dietas com níveis crescentes de milho no metabolismo ruminal de energia e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.38, n.10, p.2001-2006, 2009.
- ALVES, E. M.; PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, C. A. S. et al. Importância da sincronização do complexo proteína/energia na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 20, Ed. 125, Art. 845, 2010.
- ALVES M.A.; PEDREIRA, M. D. S.; PEREIRA, M. L. A. et al. Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais.. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** Maringá, v. 34, n. 3, p. 287-295, July-Sept., 2012.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**. 88:(E. Suppl.):E9–E2, 2005.
- BEVEC, S.; MOHORKO, E.; KOLAR, M. et al., Measurement of breath ammonia for detection of patients with chronic kidney disease. **Clinical Nephrology**, Vol. 88 – Suppl. 1/2017 (S14-S17).
- BRANCO, A. F.; CONEGLIAN, S. M.; MAIA, F. J. et al., Digestibilidade intestinal verdadeira da proteína de alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.35, n.4, p.1788-1795, 2006 (supl.).
- BRODERICK, G.A. Methodology for the determining ruminal degradability of feed proteins. **In:** Simpósio internacional sobre exigências nutricionais de ruminantes. Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. p.139-176.
- CALSAMIGLIA, E.; FERRET, A.; REYNOLDS, C. K. et al., Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, 4:7, pp 1184–1196 The Animal Consortium 2010.
- CHURCH, D.C. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. *Metabolismo de la proteína en lo ruminantes*. Zaragoza: ACRIBIA, p.255-258. 1993.
- CHEN, W.; LAIHO, S. VAITTINEN, O. et al. Biochemical pathways of breath ammonia (NH<sub>3</sub>) generation in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. **Journal of Breath Research** 10 036011. 2016.
- CHEN, C. C.; HSIEH, J. C., CHAO, C.H. et al. Correlation between Breath Ammonia and Blood Urea Nitrogen Levels in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. **Journal of breath research**, 14(3), 036002. 2020.
- CHUANG, M. Y.; CHENG, C. C.; ZAN, H. S. et al., Organic Gas Sensor with an Improved Lifetime for Detecting Breath Ammonia in Hemodialysis Patients. **American Chemical Society**. 2017.
- CLARINDO, R. L.; SANTOS, F. A. P.; BITTAR, C. M. M. et al. Avaliação de fontes energéticas e proteicas na dieta de bovinos confinados em fase de terminação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 902-910, out./dez. 2008.
- CAVALCANTE, M. A. B.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C. et. al., Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de

- compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.1, p.203-210, 2006.
- COSTA, N. L.; MONTEIRO, A. L. G.; SILVA, A. L. P. et al. Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia** 64 (R): 31-41. 2015.
- DIAS, J.C.; RAMOS, A. F.; ANDRADE, V. J. et al. Alguns aspectos da interação nutrição-reprodução em bovinos: energia, proteína, minerais e vitaminas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 738, 2010.
- DIJKSTRA, J.; REYNOLDS, C. K.; KEBREAB, E. et al. Challenges in ruminant nutrition: towards minimal nitrogen losses in cattle. In **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production** (pp. 47-58). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.2013.
- DONG, R. L; ZHAO, G. Y.; CHAID, L. L. Prediction of urinary and fecal nitrogen excretion by beef cattle / R. L. Dong, G. Y. Zhao, L. L. Chai and K. A. Beauchemin. **Journal of animal science**. August 22, 2014.
- FREITAS JUNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P. et al., Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Ciência Rural**, v.40, n.4, abril, 2010.
- FORTALEZA, A. P. S.; SILVA, D. F.; RIBEIRO, L. A, et al. Degradabilidade ruminal In Situ dos componentes nutritivos de alguns suplementos concentrados usados na alimentação de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 30, núm. 2, abril-junho, pg. 481-495.2009,
- FURLAN, R. L.; MACARI, M. FARIA FILHO, D.; Anatomia e fisiologia Gastrointestinal. **In: Nutrição de ruminantes**. 2º Ed. Cap1. 17. 2011.
- GUIMARÃES JUNIOR, R.; GONSALVES, L. C.; PEREIRA, L. G. et al., Ureia na alimentação de gado de leite. **IN: Alimentos para gado de leite**. FEPMVZ ed. 568. Cap. 28, p. 2009.
- HIBBARD, T.; KILLARD, A. J. Breath ammonia levels in a normal human population study as determined by photoacoustic laser spectroscopy. **Journal of breath research**, v. 5, n. 3, p. 037101, 2011.
- JOBIM, C. C.; FERREIRA, A. G.; BUMBIERE JUNIOR, V. H., et al., Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 747-758, abr/jun. 2011.
- KRISHNAN, S. T., DEVADHASAN, J. P., KIM, S. Recent analytical approaches to detect exhaled breath ammonia with special reference to renal patients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 409(1), 2016.
- KOHN, R. A.; DINNEEN, M. M.; COHE, R. 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**. 83:879–889. 2005.

- KOZLOSKI, Gilberto Vilmar. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência-Editora UFSM, 2017.
- LADEIRA, M. M.; RODRIGUEZ N. M.; BORGES, I. et al., Balanço de Nitrogênio, Degradabilidade de Aminoácidos e Concentração de Ácidos Graxos Voláteis no Rúmen de Ovinos Alimentados com Feno de *Stylosanthes guianensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.6, p.2357-2363, 2002.
- LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; PAULINO, M. F. et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.38, n.10, p.2021-2030, 2009.
- LE MAOUT, P.; WOJKIEWICZ, J. L.; REDON, N. et al., Polyaniline nanocomposites based sensor array for breath ammonia analysis. Portable e-nose approach to non-invasive diagnosis of chronic kidney disease. **Sensors and Actuators B. Chemical**. 2018.
- MALACCO, V. M. R.; REIS, R. B.; LAGE, A. C. F. A. L. et al. Nutrição aminoacídica de bovinos leiteiros. **Caderno de ciências agrárias**. v.7, n.1.(sup). 2015.
- MANELA, M. Q.; LOURENÇO, A. J.; LEME, P. R. Recria de Bovinos Nelore em Pastos de *Brachiaria brizantha* com Suplementação Proteica ou com Acesso a Banco de Proteína de *Leucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.6, p.2274-2282, 2002.
- MARCONDES, M. I.; GIONBELLI, M. P.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Exigências nutricionais de proteína para bovinos de corte. Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados. **BR CORTE**, 2ª ed, Viçosa, 113-133, 2010.
- MEDEIROS, S. R.; MARINO, C. **Proteínas na nutrição de bovinos de corte**. Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE). 2015.
- MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, M. F. ZERVOUDAKIS, J. T. et al. Aspectos produtivos e econômicos de novilhos mestiços alimentados com suplementos proteico-energéticos contendo ureia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.5, p.1278-1284, 2012.
- MOREIRA, A. L.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R. et al., Produção de Leite, Consumo e Digestibilidade Aparente dos Nutrientes, pH e Concentração de Amônia Ruminal em Vacas Lactantes Recebendo Rações Contendo Silagem de Milho e Fenos de Alfafa e de Capim-Coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30(3):1089-1098, 2001 (Suplemento 1).
- NASCIMENTO, J. C. S.; SILVA, T. G. S.; RIZZO, H. et al. Indicadores bioquímicos e corporais para a avaliação do perfil metabólico e nutricional em ruminantes. **Ciência veterinária nos trópicos**. Recife-PE, v.19 n 3 - setembro/dezembro 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle: 2001**. National Academies Press.2001.
- NETO, S. F. C.; ZEOULA, L. M. KAZAMA, R. et al., Proteína degradável no rúmen associada a fontes de amido de alta ou baixa degradabilidade: digestibilidade in vitro e desempenho de novilhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.36, n.2, p.452-460, 2007.

- 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.** 27, 2945–2952 2012.
- OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes (Process fermentativo, digestive and factors antinutricionais of nutrients for ruminant). **REDVET. Revista eletrônica de Veterinária** 1695-7504 . 2007.
- OLIVEIRA, V. S.; SANTOS, A. C. P.; VALENÇA, R. L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ciência Animal**, v.29, n.3, p.114-132, 2019.
- OWENS, F. N; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. **In: CHURCH, D. C.(Ed).** The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. p.145-171, 1993.
- PEIXOTO, L. O.; BRONDANI, I. L.; NORNBORG, J. L.; Perfil metabólico proteico e taxas de concepção de vacas de corte mantidas em pastagem natural ou suplementadas com farelo de trigo com ou sem ureia. **Ciência Rural**, v.36, n.6, nov-dez, 2006.
- PEREIRA, K. P.; VÉRAS, A. S. C.; SILVA, D. K. A. et al., Síntese de Proteína Microbiana em Caprinos criados a Pasto no Semiárido. **Brazil of Journal. of Development.**, Curitiba, v. 6, n. 10, p. 77443-77458 oct. 2020.
- PEREIRA, J. C.; RIBEIRO, M. D.; VIEIRA, R. A. M.; PACHECO, B. M. Avaliação de Modelos Matemáticos para o Estudo da Cinética de Passagem de Partículas e de Fluidos por Bovinos em Pastagem Recebendo Suplementos Contendo Diferentes Níveis de Proteína Não-Degradável no Rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.34, n.6, p.2475-2485, 2005 (supl.).
- PEREIRA, S. E., ARRUDA, V. F.; MIRANDA, A. F., et al. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 26, núm. 1, pp. 125-134. 2005.
- PINA, D. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana. **IN: Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados. BR corte.** 2016.
- RIBEIRO, P. R., MACEDO, L, SILVA, S. P. Aspectos nutricionais da utilização da proteína pelos ruminantes. Review. **Veterinária Notícias.** Uberlândia, v.20, n. 2, p.1-14, jul./dez. 2014.
- ROCHA, T. C.; FONTES, C. A. A.; SILVA, R. T. S.; et al., Performance, nitrogen balance and microbial efficiency of beef cattle under concentrate supplementation strategies in intensive management of a tropical pasture. **Tropical Animal Health Production** 48:673-681.2016.
- SANTOS, F. A. P. S. Metabolismo de proteína. **In: Nutrição de ruminantes. BERCHIELLI, PIRES, OLIVEIRA.** Jaboticabal – Funep, cap.9. 2006.
- SANTOS, V.C.; EZEQUIEL, J. M. B., MORGADO, E. S. et al. Influência de subprodutos de oleaginosas sobre parâmetros ruminais e a degradação da matéria seca e da proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1284-1291, 2012.

- SHANG, Y. Y.; TUNG, T. W.; YANG, H. Y. et al., A Versatile Method to Enhance the Operational Current of AirStable Organic Gas Sensor for Monitoring of Breath Ammonia in Hemodialysis Patients. *CS Sensors* 4 (4), 1023-1031. 2019.
- SHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* Vol. 100 No. 12, 2017.
- SILVA T. I. S.; MACÊDO, A. J. S; JOELSON, A. et al. Nitrogênio ureico no leite e nitrogênio ureico no plasma de vacas leiteiras em pastejo: Revisão. *PUBVET* v.13, n.4, a314, p.1-10, Abr., 2019.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, Savoy, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, 1992.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed., Ithaca: Cornell University. 1994, 476p.
- VALADARES FILHO S.C., CHIZZOTI M. L., PAULINO P.V. R., Exigências nutricionais de bovinos de corte no Brasil: desafios. *Revista CERES* 56(4): 488-495, 2009.
- VALENTE, E. E. L.; ARAUJO, L. C.; CARVALHO, S. T. et al. Breath ammonia as a bioindicator of protein nutrition in heifers. *Livestock Science*, v. 218, p. 97-100, 2018.
- VALENTE, T. N. P.; LIMA, E. S.; SANTOS, W. B. R. et al. Ruminal microorganism consideration and protein used in the metabolism of the ruminants: A review. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 10(14), pp. 456-464, 14 April, 2016.
- WERNESBACH FILHO, H. L.; CAMPOS, J. M. S.; ASSIS, A. J. et al. Variáveis ruminais, concentração de ureia plasmática e excreções urinárias de nitrogênio em vacas leiteiras alimentadas com concentrado processado de diferentes formas. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.35, n.3, p.1236-1241, 2006 (supl.).
- ZILIO, B. S. C.; VITO, ANDRADE JUNIOR, E. D.; MERLINI, J. P. et al. Análise do líquido ruminal – Revisão de literatura. *Revista eletrônica de medicina veterinária*. ISSN: 1679-7353 Ano VI – Número 11. 2008.
- ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N; CECATO, U. Et al. Valor Nutritivo de Rações Compostas de Fontes de Amido e de Nitrogênio com Alta e Baixa Degradabilidade Ruminal. *Revista brasileira de zootecnia.*, v.28, n.5, p.1159-1167, 1999.

### 3. A AMÔNIA RESPIRATÓRIA PODE SER UTILIZADA COMO BIOINDICADOR DE NUTRIÇÃO PROTEICA?

**Resumo:** Objetivou-se com este estudo avaliar o uso da amônia respiratória como bioindicador de nutrição proteica em bovinos. Os tratamentos avaliados foram dietas 10, 13 e 16% de proteína bruta (PB) na matéria seca. Foram utilizados seis novilhos não castrados da raça Holandês, com idade média de 9 meses e massa corporal média inicial de 279,91 kg em delineamento duplo quadrado latino 3x3. As dietas foram fornecidas às 7h e às 19h. Os horários de avaliação foram às 0h, 6h, 12h e 18h. Foi avaliada a relação do teor dietético de PB sobre o fluxo e concentração de amônia respiratória e ruminal. Adicionalmente, analisou-se o método de NH<sub>3</sub> respiratória em comparação aos métodos tradicionais. Foi observado aumento linear ( $P<0,05$ ) no consumo e digestibilidade aparente de PB, bem como excreção de nitrogênio na urina (ENU) e nas fezes e efeito linear positivo ( $P<0,05$ ) de fluxo, concentração de NH<sub>3</sub>, nitrogênio ureico no soro (NUS) e nitrogênio amoniacal (NAR) com o aumento da proteína da dieta ( $P<0,05$ ). Os maiores valores observados ocorreram no tratamento com 16% de PB. A NH<sub>3</sub> expirado e NUS apresentaram diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os horários de amostragem, em que as maiores médias ocorreram às 12h. Também houve correlação ( $r>0,5$ ) de fluxo, concentração de amônia, NUS e NAR com consumo de PB, níveis de PB da dieta e ENU. A maior correlação encontrada ocorreu em NAR com ENU ( $r=0,85$ ). Concluiu-se que a excreção de amônia respiratória pode ser utilizada como bioindicador de nutrição proteica.

**Palavras-chaves:** Excreção, metabolismo, nitrogênio, proteína bruta, ruminantes.

## **CAN BREATH AMMONIA BE USED AS A PROTEIN NUTRITION BIOINDICATOR?**

**Abstract:** The objective of this study was to assess the use of breath ammonia as a bioindicator of protein nutrition in cattle. The assessed treatments were diets with 10%, 13%, and 16% of crude protein (CP) in dry matter. Six non-castrated Holstein calves, with a mean age of 9 months and a mean initial body mass of 279.91 kg, were used in a 3x3 double Latin square design. Diets were provided at 7 am and 7 pm. The assessment was carried out at 12:00 am, 06:00 am, 12:00 pm, and 06:00 pm. The relationship of dietary CP content on the flow and concentration of breath and ruminal ammonia was assessed. Additionally, the breath NH<sub>3</sub> method was analyzed in comparison to traditional methods. A linear increase ( $P<0.05$ ) was observed in the intake and apparent digestibility of CP, as well as urine nitrogen excretion (UNE) and feces and positive linear effect ( $P<0.05$ ) of flow, NH<sub>3</sub> concentration, serum urea nitrogen (SUN) and rumen ammoniacal nitrogen (RAN) with increased dietary protein ( $P<0.05$ ). The highest values observed occurred in the treatment with 16% of CP. Expired NH<sub>3</sub> and SUN showed a significant difference ( $P<0.05$ ) between sampling times, in which the highest averages occurred at 12:00 pm. There was also a correlation ( $r>0.5$ ) of flow, ammonia concentration, SUN and RAN with CP intake, dietary CP levels and UNE. The highest correlation found occurred in RAN with UNE ( $r=0.85$ ). It is concluded that breath ammonia excretion can be used as a bioindicator of protein nutrition.

**Keywords:** Excretion, metabolism, nitrogen, crude protein, ruminants.

### 3.1 Introdução

A proteína é um dos principais nutrientes na formulação de dieta para ruminantes, tem relação com inúmeras funções vitais, e desta forma, é indispensável promover um aporte proteico adequado, afim da manutenção de homeostase e consequente eficiência produtiva (VALADARES FILHO et al., 2015).

A proteína dietética é degradada por microrganismos ruminais a peptídeos, aminoácidos e amônia. Segundo Barbosa et al., (2001), a amônia presente no líquido ruminal é a principal fonte de nitrogênio utilizada na síntese de proteína microbiana.

Quando em excesso, a amônia é absorvida pela parede ruminal, transportada pela corrente sanguínea até o fígado, e posteriormente metabolizada em ureia, podendo ser reciclada através da saliva, difundida pelo trato gastrointestinal ou excretada via urina (VAN SOEST, 1994; PEREIRA et al., 2018). Assim, o status proteico pode ser avaliado pelos teores de ureia presente na urina e/ou sangue (SILVA et al., 2019).

Contudo, uso desses indicadores requer métodos considerados invasivos aos animais e/ou demorados, por depender de análises laboratoriais. Desenvolver métodos não invasivos de análise desses indicadores de nutrição proteica permitem uma análise individualizada do animal, otimizando tempo e custos, com a adequação da dieta (VALENTE et al., 2018).

Neste contexto, a amônia respiratória surge como um possível bioindicador da nutrição proteica. A respiração exalada contém mais de mil compostos, entre eles a amônia (HIBBARD, KILLARD, 2011; NERI et al., 2012). A amônia não utilizada por microrganismos ruminais, absorvidas pela parede do rúmen (VIEIRA et al., 2017), pode ser difundida do sangue para o pulmão, sendo excretada na respiração.

Estudos em humanos, Brannelly et. al., (2016) encontraram boa correlação entre a concentração de amônia na respiração e nitrogênio ureico no sangue e creatinina. Valente et al. (2018) observaram em bovinos correlação positiva entre a amônia respiratória, com o nitrogênio ureico sanguíneo (NUS) e a excreção de nitrogênio na urina. No entanto, ainda há pouco estudo relacionado ao assunto utilizando bovinos.

Desta forma, este trabalho teve como hipótese que, a amônia respiratória apresenta relação com o aproveitamento de nitrogênio (N) em ruminantes, podendo ser usada como indicador do *status* proteico. Objetivou-se avaliar o uso da amônia respiratória como bioindicador da nutrição proteica em bovinos.

## 3.2 Materiais e Métodos

### 3.2.1 Tratamentos e manejo

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê Brasileiro de Ética em Uso Animal (CEUA / UNIOESTE - Processo nº 85/17), de acordo com os princípios éticos de experimentação estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

O experimento foi conduzido de junho a agosto de 2018, no Núcleo de Estações Experimentais Dr. Antônio dos Santos, situado na linha Guará, município de Marechal Cândido Rondon - PR (Coordenadas: latitude -24,3322, longitude -54,0324° e altitude 410 m).

Foram utilizados seis novilhos não castrados da raça Holandês, com idade média de 9 meses  $\pm$  0,63 e massa corporal média inicial de 279,91 kg  $\pm$  20 kg. Os animais foram alojados em baias individuais de 5m<sup>2</sup>, providas de piso emborrachado antiderrapante, cochos e bebedouros individuais. Um mês antes do início do experimento, realizou-se a adaptação prévia dos animais à instalação e a máscara respiratória.

Os animais foram distribuídos em delineamento experimental em duplo quadrado latino 3x3. Cada período era composto de 21 dias, sendo 16 de adaptação e 5 para a realização das coletas. Do dia 1º ao 16º dia, os animais eram conduzidos para fora das instalações diariamente, por uma hora, para que os animais pudessem se exercitar.

As dietas avaliadas foram com 10%, 13% e 16% de PB na matéria seca, compostas por feno de *Cynodon spp.* cv. 85 e concentrados (Tabela 1), com relação volumoso: concentrado de 30:70. Estas foram fornecidas em duas refeições diárias: às 7h e às 19h e água “*ad libitum*”.

Tabela 1: Composição percentual da dieta experimental

Ingredientes	Níveis de proteína bruta na dieta		
	10 %	13%	16%
Feno Tifton <i>cv.</i> 85	30	30	30
Milho	67,48	59,78	52,29
Farelo de Soja	1,33	9,03	16,52
Bicarbonato de Sódio	0,6	0,6	0,6
Premix Mineral <sup>1</sup>	0,6	0,6	0,6
<b>Composição Bromatológica %</b>			
Matéria Seca	85,93	85,53	85,49
Proteína Bruta	10,19	13,13	15,86
FDN <sup>2</sup>	46,08	46,77	48,18
Extrato Etéreo	2,68	2,49	2,53
Matéria Mineral	17,48	17,6	16,83
Matéria Orgânica	82,51	82,39	83,16
Carboidratos Totais	69,24	67,29	66,13

<sup>1</sup>Composição 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). <sup>2</sup>FDN:Fibra em Detergente Neutro;

### 3.2.2 Coleta de dados

Diariamente, antes do fornecimento do primeiro trato, realizava-se a pesagem das sobras, seguido do reajuste da dieta de forma a permitir 5% de sobras com o intuito de garantir o consumo voluntário. Ao final de cada período experimental realizou-se uma amostra composta das sobras dos dias de avaliação e estas foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e conservadas a -20°C para análises posteriores. Adicionalmente foram coletadas amostras do feno e dos concentrados dos três tratamentos. A ingestão de matéria seca foi obtida pela diferença entre o fornecido e as sobras.

Para a determinação da digestibilidade, em cada período, do 17° ao 21° dia experimental, foi realizada a coleta total de fezes. Elas foram recolhidas diretamente do piso e colocadas em baldes coletores e diariamente foram quantificadas, homogeneizadas, amostradas aproximadamente 300g e acondicionadas em sacos plásticos, para posterior determinação da digestibilidade dos nutrientes.

A coleta total de urina foi realizada, do 17° ao 21° dia de cada período experimental, sempre no mesmo horário. Para a coleta, utilizou-se uma bolsa coletora, acoplada aos animais, com funis coletores conectados a mangueira de polietileno, pela qual a urina foi conduzida até um recipiente de plástico com tampa contendo 100 ml de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20% para evitar a volatilização de N e possível fermentação. Ao término de 24 horas de cada dia de coleta, a

urina foi pesada, homogeneizada, amostrada na quantidade de 50 ml em proveta graduada e posteriormente acondicionada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

No 21° dia de cada período, foram coletadas amostras de sangue, via punção da veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio sem gel separador, nos seguintes horários de amostragem: 0h, 6h, 12h e 18h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos (2.500RCF, gforce) para separação do soro, o qual foi transferido para eppendorfs e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para determinar o pH e a concentração de amônia ( $\text{NH}_3$ ) no líquido ruminal, foram coletadas amostras do fluido ruminal (aproximadamente 150 mL), no último dia de cada período (21° dia), via sonda esofágica utilizando uma bomba a vácuo, nos mesmos horários da coleta de sangue (0h, 6h, 12h e 18h).

Uma alíquota de 50 mL do fluido ruminal foi acidificada com 1 mL de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1), acondicionadas em frasco de polietileno e armazenadas para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N- $\text{NH}_3$ ). No momento da análise de N- $\text{NH}_3$ , as amostras de fluido ruminal foram descongeladas e centrifugadas a 3.000 rpm (110 RFC gforce) durante 15 minutos.

Para determinação do fluxo de amônia respiratória, as coletas ocorreram do 17° ao 21° dia de cada período de coleta, às 0h, 6h, 12h e 18h, por meio da técnica de respirometria em circuito fechado com o uso de máscara facial, conectada ao container (500 L) por 2 tubos flexíveis que permitia que o ar da inspiração e expiração passasse por vias distintas.

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 container. Antes de se iniciar o processo, era coletado uma amostra de ar do container, correspondente a concentração inicial ( $C_i$ ). Logo após a amostragem da concentração inicial, os tubos flexíveis eram fixados a máscara facial e o ar circulava dentro do container. Após o tempo médio de dois minutos, os tubos eram retirados e vedados para coletar o ar da respiração do animal, correspondente a concentração final ( $C_f$ ).

O tempo de cada mensuração em circuito fechado variou em função dos níveis de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) presente no interior da caixa, monitorado através de um aparelho asko, modelo AK786 e um aparelho detector de oxigênio modelo DG-4000 digital portátil. Entre uma coleta e outra, o container era aberto por três minutos e o ar era renovado com o auxílio de ventilador.

Posteriormente, o gás passava para a fase líquida. Uma alíquota de 600 ml de cada amostra de ar era retirada por seringas das bolsas e forçadas a passar por uma solução ácida,

contendo 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1%, recirculando por dez minutos, por um sistema de bombas. Após a impregnação da amônia na solução ácida, os tubos devidamente identificados, foram tampados e congelados a -20°C para posterior análise.

A amônia expirada foi coletada nos mesmos dias e horários do fluxo de amônia, contudo, a amostragem ocorreu diretamente de uma das narinas de cada animal, utilizando um adaptador acoplado a uma bolsa coletora de PVC.

A amônia no estado gasoso do rúmen foi coletada somente no último dia, nos mesmos horários das demais coletas. A coleta ocorreu por meio de uma sonda esofágica, em que um cano coletor chegava até o rúmen e era bombeado até uma bolsa coletora de PVC. Tanto a amônia expirada e a do rúmen, após a coleta, passaram pelo mesmo procedimento da utilizada no fluxo de amônia.

### **3.2.3 Análises laboratoriais**

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 dois milímetros. Após as mesmas foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) de acordo com AOAC (1990).

A determinação do nitrogênio total e na urina foi feita segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido (N-total) e o total de nitrogênio excretado nas fezes (N-fezes) e na urina (N-urina).

A determinação de ureia no soro sanguíneo foi realizada de acordo com o método diacetil modificado Kits comerciais (GoldAnalisa®).

A análise de Nitrogênio amoniacal foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Chaney, Marbarch (1962).

A amônia na fase líquida foi quantificada retirando-se uma alíquota de 1 ml de amostra e misturada com 1,0 ml de solução de salicilato de sódio (16%), nitroprussiato de sódio (0,01%) e 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. A concentração de Amônia respiratória foi convertida utilizando a lei dos gases ideais (correspondem a 0 °C e 1 atm) e após calculada pela seguinte equação:

$$AE = [ (Cf) - (Ci) \times 500 ] \div T$$

Em que: AE é a quantidade de amônia respiratória excretada (L/minuto); 500: Volume do container (L); Cf é a concentração de amônia no tempo final (%); Ci é a concentração de amônia no início das mensurações (%); T é o tempo da mensuração (minutos).

### **3.2.4 Análise Estatística**

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando proc mixed do SAS (Statistical Analysis System, versão university edition 2020). Contrastes ortogonais polinomiais foram utilizados para avaliar as respostas (linear e quadrática) ao aumento dos níveis de PB na dieta.

Para as variáveis fluxo de amônia, NH<sub>3</sub> expirado, pH, NUS E NAR também foi realizado uma análise de variância, seguido do teste de média (DSM de Fischer), em função dos tempos de amostragem, adotando-se nível de significância de 5%.

Foi utilizada correlação de Pearson entre as variáveis fluxo de amônia (NH<sub>3</sub>) expirado, NH<sub>3</sub> expirado, NH<sub>3</sub> ruminal, Nitrogênio Ureico Sérico (NUS), Nitrogênio Amoniacal Ruminal (NAR) com o Consumo de Proteína Bruta (CPB), Excreção de Nitrogênio Urinário (ENU) e Proteína Bruta (PB).

### **3.3 Resultados e discussão**

O consumo de matéria seca e o coeficiente de digestibilidade não foram afetados pelo teor de proteína da dieta ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2). Van Soest (1994) afirma que dietas com proteína bruta acima de 7% não influenciam no consumo corroborando com os resultados avaliados neste trabalho, nos níveis de 10%, 13% e 16%.

Tabela 2: Médias dos tratamentos, erro padrão da média e contrastes para consumo, digestibilidade e excreção de nitrogênio.

	PB dietética			EP	Contraste	
	10	13	16		L	Q
CMS (kg/dia)	7.78	7.61	7.93	0.51	0.707	0.499
CPB (kg/dia)	0.796	0.996	1.258	0.063	0.002	0.555
CDMS (kg/kg)	0.717	0.737	0.754	0.011	0.076	0.957
CDPB (kg/kg)	0.62	0.677	0.716	0.017	0.005	0.62
ENF (g/dia)	47.91	51.52	56.45	3.13	0.002	0.035
ENU (g/dia)	38.69	57.75	75.87	6.4	0.022	0.976
BCN (g/dia)	44.11	50.15	65.11	10.4	0.244	0.703

EP: Erro Padrão; L: Efeito Linear de 5 – 10% de probabilidade de erro; Q: Efeito Quadrático de 5 a 10% de probabilidade de erro. Consumo de Matéria Seca (CMS), Proteína Bruta (CPB), Coeficiente de Digestibilidade aparente da Matéria Seca (CDMS) e Proteína Bruta (CDPB), Excreção de Nitrogênio nas fezes (ENF), Excreção de Nitrogênio na urina (ENU) e balanço de compostos nitrogenados

Cavalcante et al., (2005), alertam que baixos níveis de proteína dietética podem levar ao não atendimento das exigências de compostos nitrogenados dos microrganismos ruminais, em que os mesmos têm seu crescimento limitado e como consequência, o consumo de matéria seca é afetado negativamente.

Além do baixo teor de proteína bruta na dieta, Ítavo et al. (2002), explicam que o consumo de matéria seca ainda pode ser reduzido em duas situações: quando há elevado nível de N na dieta, podendo provocar toxidez pelo excesso de liberação da amônia ou em dietas com baixa disponibilidade de compostos nitrogenados (PB abaixo de 12%), influenciado pela digestão da fibra e assim tornando mais lenta a taxa de passagem dos alimentos. Sendo assim, com base na explicação dos autores acima, pode-se admitir que as três dietas continham compostos nitrogenados em quantidade suficiente para atender a demanda dos microrganismos rumais, não afetando o CMS.

O consumo de proteína bruta e o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, aumentaram linearmente ( $P < 0,05$ ) ao aumento dos níveis de PB da dieta (Tabela 2), resultados semelhantes aos obtidos por Obeid et al. (2006) e Pereira et al. (2005).

No entanto, estes valores não podem servir como único parâmetro do *status* de nutrição proteica e nem ser analisada de forma isolada, pois os níveis proteicos alteram o metabolismo de nitrogênio e a excreção nas fezes e urina aumentam linearmente com o incremento de proteína dietética (MENEZES et al., 2016).

Neste trabalho, avaliando o consumo e digestibilidade da PB em conjunto com os valores de excreção de nitrogênio nas fezes e urina ( $P < 0,05$ ; Tabela 2), pressupõe que as dietas excederam as exigências nutricionais dos animais, visto as excreções, principalmente via urina, ocorreram quando a velocidade de utilização da amônia e íons de amônio formado

no rúmen pelos microrganismos ruminais foi menor que a velocidade de produção (KOZLOSKI, 2017).

O balanço de nitrogênio (BCN) não alterou ( $P > 0,05$ ) com aumento dos níveis de PB da dieta, contudo, todos os tratamentos apresentaram BN positivo, indicando que os animais estavam em condições de alimentares de ganho de N. O BN é fundamental para quantificar e avaliar se o organismo animal está ganhando ou perdendo proteína na forma de N (LADEIRA et al., 2002), ou seja, está correlacionado com a eficiência de utilização de N pelos microrganismos ruminais e desta forma recebendo influência das fontes de carboidratos e proteína da dieta (ALVES et al., 2012).

A amônia do líquido ruminal que não conseguiu ser aproveitada por microrganismos, é absorvida pela parede do rúmen e transportados pela corrente sanguínea por meio da veia porta até o fígado (VAN SOEST, 1994), podendo ser reciclado via saliva, eliminado via fezes e urina.

Alguns estudos em humanos (TURNER, SPENL, SMITH, 2006; BEVEC et al., 2017), comprovam que a amônia ainda consegue ser eliminada via respiração, sendo absorvida da corrente sanguínea, chegando até os alvéolos pulmonares. Estudos em bovinos realizados por Valente et. al, (2018), também encontraram aumento linear para  $\text{NH}_3$  expirada com relação aos níveis de proteína (9%, 12%, 15% e 18%) e também com relação aos tempos de amostragem.

É de extrema importância que a amônia em excesso seja convertida em ureia, pois a mesma é 40 vezes mais tóxica que a ureia, porém, para isso acontecer, há um gasto energético de 3  $\text{ATP}'_s$  (Adenosina Tri Fosfato) para a conversão de uma molécula de  $\text{NH}_3$  em ureia (KITAMURA et al., 2002).

Neste estudo, ocorreram aumentos lineares ( $P < 0,05$ ) do fluxo e concentração de amônia expirada pelo animal, bem como nitrogênio ureico sérico e nitrogênio amoniacal do rúmen com o aumento do nível dietético de proteína (Tabela 3), com exceção do  $\text{NH}_3$  na fase gasosa do rúmen.

Tabela 3: Média dos tratamentos, erro padrão da média, interações e contrastes para amônia, NUS, NAR e pH.

	PB dietética			EP	Trat	Temp	Trat x temp	Contraste	
	10	13	16					L	Q
NH <sub>3</sub> E (ppb)	281.58	399.27	430.1	21.5	<.0001	0.0025	0.8194	<0.001	0.0215
FNH <sub>3</sub> (uM/min)	1.28	1.58	2.19	0.38	0.0012	0.0789	0.3982	0.0003	0.4374
NH <sub>3</sub> R (ppm)	359.9	372.5	369.7	49	0,962	0,549	0,434	0.832	0.85
NUS (mg/dl)	9.43	10.02	11.05	0.7	0.0800	0.0197	0.1934	0.0327	0.6932
NAR (mg/dl)	6.26	8.21	12.70	1.08	<.0001	0.0226	0.1434	<0.001	0.2329
pH	6.94	6.94	7.00	0.07	0.5118	<.0001	0.3995	0,3123	0,7539

NH<sub>3</sub>E: Amônia Expirada; FNH<sub>3</sub>: Fluxo de amônia; NH<sub>3</sub>R: Amônia ruminal; NUS: Nitrogênio Ureico Sérico; NAR: Nitrogênio amoniacal do Rúmen; <sup>1</sup>ppb: partes por bilhão; <sup>2</sup> uM/min: Micromol/minuto, <sup>3</sup>ppm: partes por milhão; EP: Erro padrão; TRAT: Tratamento; TRATx Tempo: Interação; L: Efeito Linear de 5 -10% de probabilidade de erro; Q: Efeito quadrático de 5 a 10% de probabilidade de erro

Em situações de diminuição ou menor pH ruminal, ou seja, em ambientes mais ácidos, a absorção de amônia pelo epitélio ruminal é dificultada (ABDOUM, STUMPPF, MERTENS, 2006), o que poderia interferir nos dados deste trabalho, contudo este fato não ocorreu, conforme pode ser visto nos valores de pH (tabela 2).

Domingues et al., (2010) salientam que a faixa ideal de pH para atividades proteolíticas se encontra na faixa de 6 a 7, estando dentro do observado (Tabela 2), e que a máxima atividade proteolítica para a maioria dos microrganismos ocorre em pH próximo a 6,5.

A alteração do pH ruminal, além do tipo de substrato, também está relacionada com tempo, intervalo de alimentação e taxa de passagem, pois microrganismos que degradam celulose e hemicelulose crescem lentamente e utilizam amônia como fonte de N para a síntese microbiana (LADEIRA et al., 1999).

Desta forma, pH ruminal, NH<sub>3</sub> expirado, NUS e NAR observados neste trabalho, também apresentaram efeito de tempo (P<0,05; Figura 1). O comportamento observado pelo NH<sub>3</sub> expirado nos horários de amostragem é semelhante ao NUS, onde os maiores valores ocorrem 5 horas após a alimentação (7h e 19h), mostrando a similaridade entre o N circulante no sangue e o excretado. Resultados semelhantes obtidos por Valente et. al (2018) que observaram maior pico de NUS às 12h, 4 horas após a alimentação dos animais.

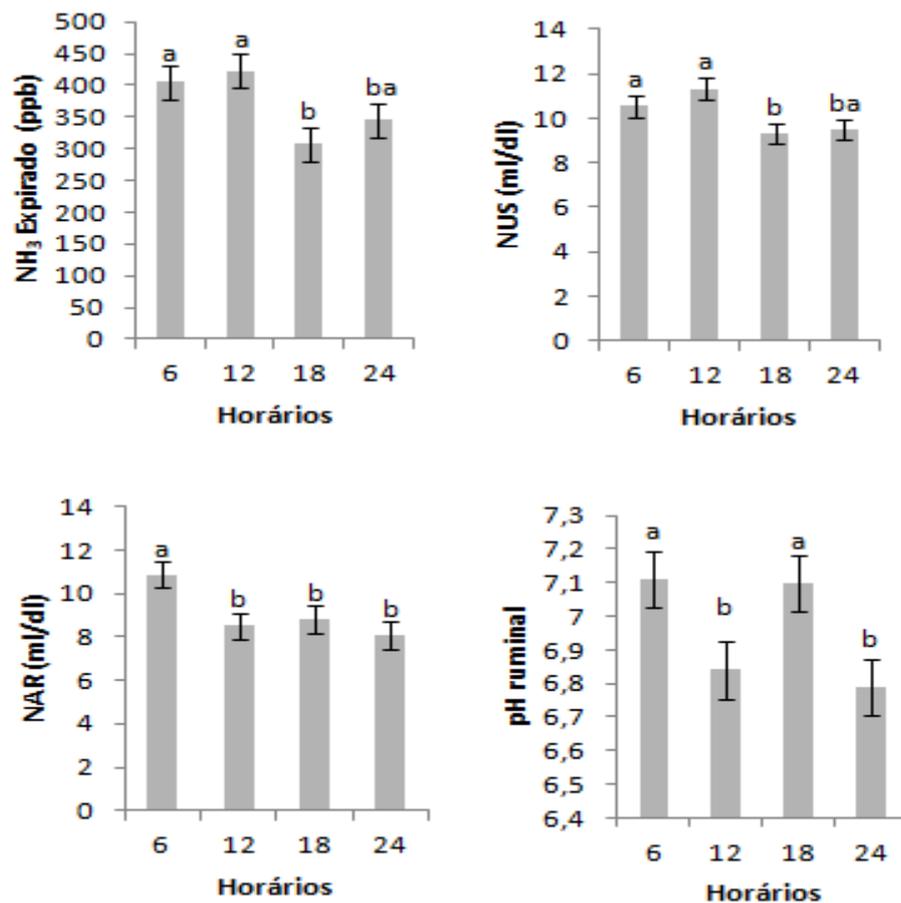


Figura 1: NH<sub>3</sub> expirado (ppb), Nitrogênio ureico sérico (NUS), Nitrogênio amoniacal do rúmen e pH ruminal em função dos horários de amostragem.

Porém, o efeito de horário de NAR com a NH<sub>3</sub> expirada e NUS não seguem o mesmo comportamento (Figura 1) e os menores picos ocorrem 5 horas após a alimentação. O NAR representa fonte de N para as bactérias ruminais realizarem a síntese de proteína microbiana e sua concentração varia em decorrência da absorção e utilização (PANCOTI et al., 2012), porém a fermentação ruminal frequentemente produz mais N-NH<sub>3</sub> ruminal que os microrganismos podem utilizar (SILVEIRA et al., 2002). Desta forma, uma maior produção de NAR e conseqüente concentração de NUS e NH<sub>3</sub> expirado, representa a utilização de N pelos microrganismos ruminais.

Entendendo a sincronia metabólica dos microrganismos ruminais em relação aos compostos nitrogenados e seus produtos, foram possíveis avaliar NAR, NUS, fluxo e concentração de amônia respiratória e observar correlação positiva ( $r > 0,5$ ) com o CPB, PB da dieta e ENU (Figura 2).

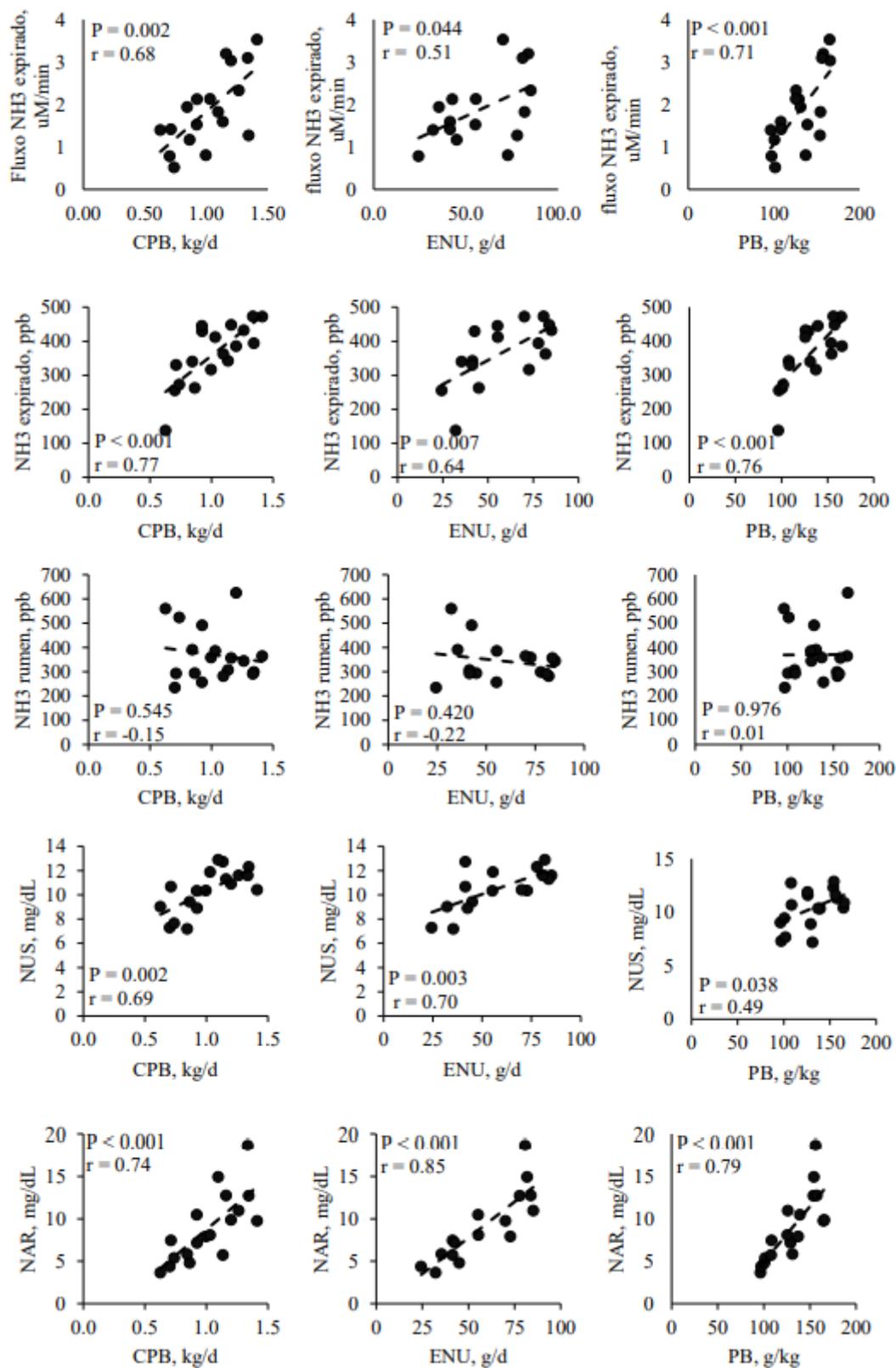


Figura 2: Correlação de Pearson entre fluxo de amônia (NH<sub>3</sub>, uM/min), NH<sub>3</sub> expirado (ppb), NH<sub>3</sub> ruminal (ppb), Nitrogênio Ureico Sérico (NUS, mg/dl) Nitrogênio Amoniacal do Rúmen (NAR, mg/dl) e o Consumo de Proteína Bruta (kg/d), Excreção de Nitrogênio na urina (ENU, g/dia), proteína bruta (PB, g/kg)

A principal correlação observada ocorreu com NAR e ENU ( $r = 85$ ), podendo indicar um desbalanço entre energia-proteína da dieta, e baixa eficiência na síntese de proteína microbiana, porém, essas variáveis não foram avaliadas neste trabalho. Isso ocorre segundo Dijkstra et al., (2013), pois a utilização de compostos nitrogenados pode ser baixa, pela grande variedade de fatores que interferem na assimilação de amônia por microrganismos, principalmente a relação proteína: energia.

A eficiência e a quantidade de proteína microbiana sintetizada no rúmen dependem da disponibilidade de energia e nitrogênio (principalmente na forma de amônia) e esta é consequência da taxa de passagem dos nutrientes no rúmen (MENDES et al., 2006). Uma dieta equilibrada na relação energia-proteína, melhorará na captura do nitrogênio degradável, aumentar o crescimento microbiano (FEREIRA et al., 2009) e reduzir a excreção via urina (ENU).

A correlação positiva de NUS com ENU ( $r = 0,70$ ) foi menor que a relação de ENU com NAR ( $r = 0,85$ ). Essa menor correlação pode ser resultado do metabolismo de reciclagem da ureia, que ao invés de ser eliminado, consegue voltar ao rúmen via saliva (GUIMARÃES JUNIOR, et al., 2016). A ureia que chega ao rúmen é prontamente convertida em amônia principalmente por bactéria urolíticas (SANTOS, CAGLIERI, MODESTO, 2001).

### **3.4 Conclusão**

O aumento da quantidade de proteína na dieta eleva as concentrações de amônia expirada em bovinos confinados.

A excreção de amônia pela respiração pode ser utilizada como bioindicador de nutrição proteica.

Os resultados da concentração e fluxo de  $\text{NH}_3$  expirada indicam que estas variáveis são promissoras para a avaliação do status proteico, em comparação com os métodos tradicionais (NUS e NAR). Porém, novos estudos devem ser desenvolvidos, com o intuito de aumentar o número de dados a respeito desta técnica e conseqüentemente aumentar a acurácia a fim de permitir uma padronização para melhor tomada de decisão.

### 3.5 Referências bibliográficas:

- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; MARTENS, H. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Animal Health Research Reviews**, 7(1-2), 43-59. 2006.
- ALVES M.A.; PEDREIRA, M. D. S.; PEREIRA, M. L. A. et al. Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** Maringá, v. 34, n. 3, p. 287-295, July-Sept., 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis.16.ed. Arlington: **AOAC** International, 1025p; 1990.
- BARBOSA, N. G. S.; LANA, R. P.; MÂNCIO, A. B., et al., Fermentação da Proteína de Seis Alimentos por Microrganismos Ruminais, Incubados Puros ou com Monensina ou Rumensin®. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(4):1316-1324, 2001.
- BRANNELLY, N. T.; HAMILTON-SHIELD, J. P.; KILLARD, A. J. The measurement of ammonia in human breath and its potential in clinical diagnostics. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 46, n. 6, p. 490-501, 2016.
- BEVEC, S.; MOHORKO, E.; KOLAR, M. et al., Measurement of breath ammonia for detection of patients with chronic kidney disease **Clinical Nephrology**, Vol. 88 – Suppl. 1/2017 (S14-S17).
- CAVALCANTE, M. A. B.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C. et. al. Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Bovinos de Corte: Consumo, Digestibilidade Total e Desempenho Produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.711-719, 2005.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-137, 1962.
- DIJKSTRA, J.; REYNOLDS, C. K.; KEBREAB, E. et al. Challenges in ruminant nutrition: towards minimal nitrogen losses in cattle. **In** Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production (pp. 47-58). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.2013.
- DOMINGUES, A. R.; SILVA, L. D. F.; RIBEIRO, E. L. A. et al. Consumo, parâmetros ruminais e concentração de ureia plasmática em novilhos alimentados com diferentes níveis de torta de girassol em substituição ao farelo de algodão. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 1059-1070, out./dez. 2010.
- FERREIRA, M. A.; SILVA, R. R.; RAMOS, A. O.; VÉRAS, A. S. C.; MELO, A. A. S.; GUIMARÃES, A. V. Síntese de proteína microbiana e concentrações de ureia em vacas alimentadas com dietas à base de palma forrageira e diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.38, n.1, p.159-165, 2009.
- GUIMARÃES JÚNIOR, R.; PEREIRA, L. G. R.; TOMICH, T. R.; MACHADO, F. S.; GONÇALVES, L. C. Informações gerais: o que é ureia. Embrapa Gado de Leite-Artigo em periódico indexado (ALICE). **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, nº 80 - abril de 2016.

- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência- Editora UFSM, 2017.
- HIBBARD, T.; KILLARD, A. J. Breath ammonia levels in a normal human population study as determined by photoacoustic laser spectroscopy. **Journal of breath research**, v. 5, n. 3, p. 037101, 2011.
- ÍTAVO, L. C. V.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, F. F.; VALADARES, R. F. D; CECON, P. R.; ÍTAVO, C. C. B. F.; MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, P. V. R. Níveis de Concentrado e Proteína Bruta na Dieta de Bovinos Nelore nas Fases de Recria e Terminação: Consumo e Digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.2, p.1033-1041, 2002 (suplemento).
- KITAMURA, S. S.; ORTOLANI, E. L.; ANTONELLI, A. C. Intoxicação por amônia em bovinos causada pela ingestão de ureia dietética: conceitos básicos e novas descobertas. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 5(3), 293-299. 2002.
- LADEIRA, M. M.; RODRIGUEZ, N. M.; BORGES, I. et al. Balanço de Nitrogênio, Degradabilidade de Aminoácidos e Concentração de Ácidos Graxos Voláteis no Rúmen de Ovinos Alimentados com Feno de *Stylosanthes guianensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.6, p.2357-2363, 2002.
- LADEIRA, M. M.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I. et al., Eficiência Microbiana, Concentração de Amônia e pH Ruminal e Perdas Nitrogenadas Endógenas, em Novilhos nelore. **Revista brasileira de zootecnia**. v.28, n.2, p.404-411, 1999.
- MENDES, A. R.; EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L. et al. Cinética digestiva e eficiência de síntese de proteína microbiana em novilhos alimentados com farelo de girassol e diferentes fontes energéticas. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.35, n.1, p.264-274, 2006.
- MENEZES, A. C. B.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, L. C., et al., Does a reduction in dietary crude protein content affect performance, nutrient requirements, nitrogen losses, and methane emissions in finishing Nelore bulls? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 223:239-249, 2016.
- 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.** 27, 2945–2952 2012.
- OBEID, J. A.; PEREIRA, O. G.; PEREIRA, D. H. et al. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: consumo, digestibilidade e desempenho produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.35, n.6, p.2434-2442, 2006.
- PANCOTI, C.G.; MOURÃO, R. C.; MOURA, A. M. et al. Eficiência na utilização de nitrogênio por bovinos de leite. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 5, Ed. 192, Art. 1291, 2012.
- PEREIRA, K. P.; LIMA, J. S.; SILVA, D. K. A. et al. Metabolismo de nitrogênio e perdas endógenas em caprinos criados a pasto em região da caatinga. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 2, p. 22-33, 2018.

- PEREIRA, M. L. A.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D. et al. 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.
- SANTOS, G. T.; CAGLIERI, F. L. B.; MODESTO, E. C. Recentes Avanços em Nitrogênio não Proteico na Nutrição de Vacas Leiteiras. s **Anais** do 2º Simpósio Internacional em Bovinocultura de Leite: Novos conceitos em Nutrição. UFLA, 2001, p. .199-228.
- SAS INSTITUTE INC. SAS University Edition: installation guide for windows. Cary: SAS Institute, 2014.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, **Imprensa Universitária**, 2002. 165p.
- SILVA T. I. S.; MACÊDO, A. J. S; JOELSON, A. et al. Nitrogênio ureico no leite e nitrogênio ureico no plasma de vacas leiteiras em pastejo: Revisão. **PUBVET** v.13, n.4, a314, p.1-10, Abr., 2019.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2002. 165p.
- SILVEIRA, R. N.; BERCHIELLI, T. T.; FREITAS, D. et al. Fermentação e Degradabilidade Ruminal em Bovinos Alimentados com Resíduos de Mandioca e Cana-de-Açúcar ensilados com Polpa Cítrica peletizada. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.31, n.2, p.793-801, 2002.
- TURNER, C., ŠPANEL, P., SMITH, D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. **Physiological Measurement**, 27(4), 2006.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminants. 2.ed., Ithaca: Cornell University. 1994, 476p.
- VALADARES, F. C. S.; CHIZZOTTI, M. L.; PAULINO, P. V. R. Exigências nutricionais de bovinos de corte no Brasil: desafios. **Ceres**, v. 56, n. 4, 2015.
- VALENTE, E. E. L.; ARAUJO, L. C.; CARVALHO, S. T. et al. Breath ammonia as a bioindicator of protein nutrition in heifers. **Livestock Science**, v. 218, p. 97-100, 2018.
- VIEIRA, P. A. S; AZEVÊDO, J. A. G.; SILVA, F. F. D. et al. Parâmetros ruminais e balanço de nitrogênio em bovinos alimentados com silagem da raiz de mandioca. **Embrapa Semiárido-Artigo** (2017).

#### 4 MODELAGEM DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITROGÊNIO UTILIZANDO PARÂMETROS TRADICIONAIS E AMÔNIA EXPIRADA EM BOVINOS

**Resumo:** Objetivou-se avaliar o ajuste de modelos de predição da excreção de nitrogênio urinário (ENU), com amônia respiratória (AE), nitrogênio ureico sérico (NUS), e nitrogênio amoniacal no rúmen (NAR). Os tratamentos avaliados foram dietas com 10%, 13% e 16% de proteína bruta na dieta com base na matéria seca. As dietas tinham relação volumoso-concentrado de 30:70, fornecidas às 7h e às 19h. Foram utilizados seis novilhos da raça holandês, não castrados, com idade média de 9 meses e massa corporal média de 279,91 kg  $\pm$  20, distribuídos em duplo quadrado latino 3x3. Cada período era composto de 16 dias para a adaptação dos animais à dieta e 5 dias para a coleta de dados. As amostras de AE ocorreram às 0h, 6h, 12h, 18h e foram coletadas 600 ml, diretamente de uma das narinas de cada animal, utilizando um adaptador acoplado a uma bolsa de PVC. Posteriormente as amostras passavam para a fase líquida por meio de um sistema de bombas onde o ar era forçado a passar por uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1% por 15 minutos em até 12h após a amostragem e quantificada por colorimetria. Amostras de sangue e líquido ruminal foram coletadas no último dia do período de coleta, imediatamente após a amostragem da amônia respiratória. O consumo de matéria seca foi obtido pela diferença entre o fornecido e as sobras. Foram testados modelos múltiplos envolvendo consumo de AE, NUS, NAR, consumo de matéria seca, teor proteico da dieta e consumo de proteína. O modelo de regressão linear da excreção de nitrogênio na urina em função do teor de proteína na dieta ( $P < 0,05$ ) apresentou coeficiente de determinação de 37,9. O melhor modelo com a amônia expirada foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína dietética e o consumo de proteína bruta ( $R^2_a = 42,5$ ) com fator de inflação de variância (FIV) menor que 2,01. O melhor modelo com o NUS foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína na dieta ( $R^2_a = 31,8$ ; FIV = 1,49). O melhor modelo com o NAR foi ajustado ( $P < 0,05$ ) incluindo o teor de proteína na dieta e consumo de matéria seca ( $R^2_a = 67,8$ ; FIV < 1,6). Concluiu-se que o AE apresenta menor ajuste em regressão múltipla que o NAR, mas maior ajuste que modelos com NUS. Portanto, AE pode ser utilizada para predição da excreção urinária de nitrogênio em bovinos.

**Palavras – chaves:** ambiente, modelo, nutrição proteica, regressão.

## URINARY NITROGEN EXCRETION MODELING USING TRADITIONAL PARAMETERS AND EXPIRED AMMONIA IN CATTLE

**Abstract:** The objective was to assess the adjustment of predictive models of urinary nitrogen excretion (UNE), with breath ammonia (BA), serum urea nitrogen (SUN), and rumen ammonia nitrogen (RAN). The assessed treatments were diets with 10%, 13%, and 16% of crude protein in the diet based on dry matter. The diets had a roughage:concentrate ratio of 30:70, provided at 7:00 am and 7:00 pm. Six non-castrated Holstein calves, with a mean age of 9 months and a mean initial body mass of  $279.91 \text{ kg} \pm 20$ , distributed in a double Latin square  $3 \times 3$  were used. Each period consisted of 16 days for the animals to adapt to the diet and 5 days for data collection. BA samples were taken at 12:00 am, 06:00 am, 12:00 pm, and 06:00 pm and 600 ml were collected directly from one of the nostrils of each animal, using an adapter attached to a PVC bag. Subsequently, the samples passed to the liquid phase through a pump system where the air was forced to pass through a 0.1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution for 15 minutes within 12 h after sampling and quantified by colorimetry. Blood and rumen fluid samples were collected on the last day of the collection period, immediately after breath ammonia sampling. The dry matter intake was obtained by the difference between the supplied and the leftovers. Multiple models involving BA intake, SUN, RAN, dry matter intake, dietary protein content, and protein intake were tested. The linear regression model of urine nitrogen excretion due to protein content in the diet ( $P < 0.05$ ) showed a determination coefficient of 37.9. The best model with expired ammonia was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content and crude protein intake ( $R^2_a = 42.5$ ) with variance inflation factor (VIF) lower than 2.01. The best model with SUN was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content ( $R^2_a = 31.8$ ;  $\text{VIF} = 1.49$ ). The best model with RAN was adjusted ( $P < 0.05$ ) including dietary protein content and dry matter intake ( $R^2_a = 67.8$ ;  $\text{VIF} < 1.6$ ). It is concluded that BA has a lower adjustment in multiple regression than RAN, but a greater adjustment than models with SUN. Therefore, BA can be used to predict urinary nitrogen excretion in cattle.

**Keywords:** Environment, Model, Protein nutrition, regression.

## 4.1 Introdução

A proteína é um dos componentes mais importantes no sistema produtivo, por ser o principal constituinte corporal dos animais envolvido nas funções reprodutivas, produtivas e de manutenção (VALENTIN et al., 2019). Em excesso, a proteína representa dois problemas distintos: a ineficiência econômica, visto o alto custo que a proteína representa, estando diretamente relacionada a gestão econômica em uma propriedade (QUINTÃO et al., 2009) e impacto ambiental com a eliminação de proteína na forma de nitrogênio na urina e fezes (PRADOS et al., 2021).

Desta forma, a avaliação da excreção de nitrogênio nas fezes e urina se tornou um método amplamente empregado na predição do *status* proteico da dieta (ALVES et al., 2010) de forma a melhorar a eficiência proteica na dieta. Para esta finalidade, outros métodos também são comumente empregados, a exemplo do Nitrogênio Amoniacal do Rúmen (NAR) e o Nitrogênio Ureico Sérico (NUS; MARTINS et al., 2018), porém são considerados invasivos e estressantes ao animal.

Neste contexto, a excreção de amônia expirada surge como um potencial método, não invasivo, com possibilidade de automação para obtenção de informações em tempo real em comparação aos parâmetros tradicionalmente utilizados como NAR (ZOZ et al., 2021). Valente et al., (2018), encontraram correlação positiva entre a amônia expirada NUS ( $r = 0,67$ ) e Nitrogênio Ureico na urina ( $r = 0,55$ ) e concluíram que a amônia pode ser utilizada como bioindicador do status de nutrição proteica.

Contudo, os dados encontrados na literatura variam de acordo com muitas questões, como por exemplo: raça, dieta, ambiente e etc. Sendo assim, o uso de modelos pode nos fornecer informações mais precisas e estimar dados que nos permitem aplicar o conhecimento para a formulação de dietas mais seguras e eficientes, em diferentes sistemas de produção e desta forma melhorar a produção e minimizar os impactos ambientais devido a eliminação de compostos nitrogenados (TEDESCHI, et al., 2016).

Modelos matemáticos têm sido utilizados para estimar a potencial excreção de N de vacas leiteiras, contudo não há estudos neste sentido para amônia expirada. Desta forma, objetivou-se se avaliar o ajuste de modelos para predição da excreção de nitrogênio urinário utilizando a amônia expirada, NAR, NUS, consumo de matéria seca, consumo de proteína bruta e proteína bruta na dieta.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Tratamentos e manejo

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê Brasileiro de Ética em Uso Animal (CEUA / UNIOESTE - Processo nº 85/17), de acordo com os princípios éticos de experimentação estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

O experimento foi conduzido de junho a agosto de 2018, no Núcleo de Estações Experimentais Dr. Antônio dos Santos Pessoa, situado na linha Guará, município de Marechal Cândido Rondon - PR (Coordenadas: latitude -24,3322, longitude -54,0324° e altitude 410 m).

Foram utilizados seis novilhos não castrados da raça Holandês, com idade média de 9 meses  $\pm$  0,63 e massa corporal média inicial de 279,91 kg  $\pm$  20,89 kg. Os animais foram alojados em baias individuais de 5m<sup>2</sup>, providas de piso emborrachado antiderrapante, cochos e bebedouros individuais. Um mês antes do início do experimento, realizou-se a adaptação prévia dos animais à instalação e a máscara respiratória.

O delineamento experimental foi um duplo quadrado latino 3x3. Cada período era composto de 21 dias, sendo 16 dias de adaptação e 5 dias para a realização das coletas. Do dia 1° ao 16° dia, os animais eram conduzidos para fora das instalações diariamente, por uma hora, para que os animais pudessem se exercitar.

Os tratamentos avaliados foram três dietas com 10%, 13% e 16% de PB na matéria seca, compostas por feno de *Cynodon spp.* cv. 85 e concentrados (Tabela 1), com relação volumoso: concentrado de 30:70. Estas foram fornecidas em duas refeições diárias, às 7h e às 19h horas e água “*ad libitum*”.

Tabela 1: Composição percentual da dieta experimental

Ingredientes %	Níveis de proteína bruta na dieta		
	10 %	13%	16%
Feno Tifton cv. 85	30	30	30
Milho	67,48	59,78	52,29
Farelo de Soja	1,33	9,03	16,52
Bicarbonato de Sódio	0,6	0,6	0,6
Premix Mineral <sup>1</sup>	0,6	0,6	0,6
<b>Composição Bromatológica %</b>			
Matéria Seca	85,93	85,53	85,49
Proteína Bruta	10,19	13,13	15,86
FDN <sup>2</sup>	46,08	46,77	48,18
Extrato Etéreo	2,68	2,49	2,53
Matéria Mineral	17,48	17,6	16,83
Matéria Orgânica	82,51	82,39	83,16
Carboidratos Totais	69,24	67,29	66,13

<sup>1</sup>Composição 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). <sup>2</sup>FDN:Fibra em Detergente Neutro.

#### 4.2.2 Coleta de dados

Diariamente, antes do fornecimento do primeiro trato, realizava-se a pesagem das sobras, seguido do reajuste da dieta de forma a permitir 5% de sobras com o intuito de garantir o consumo voluntário. Ao final de cada período experimental, realizou-se uma amostra composta das sobras dos dias de avaliação e estas foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e conservadas a -20°C para análises posteriores. Adicionalmente foram coletadas amostras do feno e dos concentrados dos três tratamentos. A ingestão de matéria seca foi obtida pela diferença entre o fornecido e as sobras.

A coleta total de urina foi realizada, do 17° ao 21° dia de cada período experimental, sempre no mesmo horário (0h, 6h, 12h e 18h). Para a coleta, utilizou-se uma bolsa coletora, acoplada aos animais, com funis coletores conectados a mangueira de polietileno, pela qual a urina foi conduzida até um recipiente de plástico com tampa contendo 100 ml de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20% para evitar a volatilização de N e possível fermentação. Ao término de 24 horas de cada dia de coleta, a urina foi pesada, homogeneizada, amostrada na quantidade de 50 ml em proveta graduada e posteriormente acondicionada a -20° C até o momento das análises.

No 21° dia de cada período, foram coletadas amostras de sangue, via punção da veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio sem gel separador, nos seguintes horários de amostragem: 0h, 6h, 12h e 18h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por

15 minutos (2.500RCF, gforce) para separação do soro, o qual foi transferido para eppendorfs e posteriormente armazenadas a -20 °C.

Para determinar a concentração de amônia (NH<sub>3</sub>) no líquido ruminal, foram coletadas amostras do fluido ruminal (aproximadamente 150 mL), no último dia de cada período (21º dia), via sonda esofágica utilizando uma bomba a vácuo, nos mesmos horários da coleta de sangue (0h, 6h, 12h e 18h). Uma alíquota de 50 mL do fluido ruminal foi acidificada com 1 mL de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1), acondicionadas em frasco de polietileno e armazenadas para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

Para determinação da amônia expirada, as coletas ocorreram do 17º ao 21º dia de cada período de coleta, às 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. A amostragem ocorreu diretamente de uma das narinas de cada animal, utilizando um adaptador acoplado a uma bolsa coletora de PVC com capacidade de 2L. Posteriormente, o gás passava para a fase líquida. Uma alíquota de 600 ml de cada amostra de ar era retirada por seringas das bolsas e forçadas a passar por uma solução ácida, contendo 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1%, recirculando por dez minutos, por um sistema de bombas. Após a impregnação da amônia na solução ácida, os tubos devidamente identificados, foram tampados e congelados a -20°C para posterior análise.

#### **4.2.3 Análises laboratoriais**

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 dois milímetros. Após as mesmas foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) de acordo com AOAC (1990).

A determinação do nitrogênio total e na urina foi feita segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002). A determinação de ureia no soro sanguíneo foi de acordo com o método diacetil modificado Kits comerciais (GoldAnalisa®).

A análise de Nitrogênio amoniacal foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Chaney, Marbarch (1962). No momento da análise de N-NH<sub>3</sub>, as amostras de fluido ruminal foram descongeladas e centrifugadas a 3.000 rpm (110 RFC gforce) durante 15 minuto

A amônia na fase líquida foi quantificada retirando-se uma alíquota de 1 ml de amostra e misturada com 1,0 ml de solução de salicilato de sódio (16%), nitroprussiato de sódio (0,01%) e 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.

#### 4.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando programa estatístico R. Para a escolha do modelo mais adequado, os modelos foram testados por meio de regressão linear múltipla, observando a significância das variáveis a 5% de probabilidade de erro. Os modelos múltiplos testados envolveram o consumo de matéria seca, teor proteico da dieta, consumo de proteína, AE, NUS e NAR.

### 4.3 Resultados e discussão

O melhor ajuste do modelo de regressão para excreção de nitrogênio urinário ocorreu no primeiro modelo testado com as regressoras de proteína bruta da dieta, consumo de proteína bruta (g/kg peso corporal) e consumo de matéria seca (NU<sup>1</sup>; Tabela 2), em que o coeficiente de regressão ajustado foi de 43,96%.

Tabela 2: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de proteína bruta da dieta, consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca

Modelo <sup>1</sup>	Regressora	Estimativa parâmetro	Desvio-padrão	P	FIV	R <sup>2</sup> <sub>a</sub> (%)
NU <sup>1</sup>	Intercepto	-62,08	9,96	1,82×10 <sup>-9</sup>	0	43,96
	PBD	0,7552	0,0873	4,92×10 <sup>-16</sup>	6,48	
	CPB2	-10,98	3,15	0,0006	8,14	
	CMS	5,77	1,09	2,46×10 <sup>-7</sup>	3,27	
NU <sup>2</sup>	Intercepto	-16,73	4,67	0,0004	0	41,91
	PBD	0,3117	0,0490	8,62×10 <sup>-10</sup>	1,97	
	CPB	21,31	4,84	1,54×10 <sup>-5</sup>	1,97	
NU <sup>3</sup>	Intercepto	-15,17	4,80	0,0018	0	38,25
	PBD	0,3933	0,0570	3,85×10 <sup>-11</sup>	2,51	
	CPB2	2,90	1,83	0,1153	2,51	
NU <sup>4</sup>	Intercepto	-14,80	4,81	0,0023	-	37,90
	PBD	0,4631	0,0361	<2×10 <sup>-16</sup>	-	

<sup>1</sup>NU: nitrogênio urinário; PBD: proteína bruta da dieta; CPB: consumo de proteína bruta (kg); CPB2: consumo de proteína bruta (g/kg de peso corporal), CMS: consumo de matéria seca (kg); P: probabilidade de significância; FIV = fator de inflação de variância; R<sup>2</sup><sub>a</sub> = coeficiente de determinação ajustado; tamanho amostral (n) = 269 observações.

Em contrapartida, o pior ajuste do modelo ocorreu entre a NU e somente com a proteína bruta da dieta (R<sup>2</sup><sub>a</sub> = 37,90; Tabela 2). Estes dados indicam a relação do nitrogênio urinário com o aumento nos níveis de proteína da dieta, mas que na prática há influência de outros fatores, como por exemplo, a eficiência de síntese de proteína microbiana. Quanto maior for a eficiência de síntese microbiana, maior será o aproveitamento de compostos

nitrogenados (principalmente amônia) e assim, menor será a excreção via urina (BERCHIELLI, PIRES, OLIVEIRA, 2006).

Outra hipótese para a  $R^2$  ser menor neste modelo entre NU e PB da dieta com relação aos demais modelos, é que em dietas com baixo teor de PB, pode ocorrer uma reciclagem de N para o rúmen, devido a necessidade fisiológica e metabólica de manutenção da população proteolíticas (VAN SOEST, 1994).

A excreção de nitrogênio pela urina permite afirmar que há também produção de amônia em excesso no rúmen, em que o mesmo foi absorvido, transportado via corrente sanguínea, metabolizado em ureia no rúmen e eliminado (KOSLOSKI, 2017). Parte dessa amônia na corrente sanguínea entra por meio de difusão aos alvéolos pulmonares que será suprimido, via respiração (KRISHNAN et al., 2016).

Quando avaliou-se os modelos incluindo a regressora amônia respiratória, o melhor ajuste ocorreu em conjunto com a proteína bruta da dieta e o consumo de proteína bruta ( $R^2 = 42,48$ ; Tabela 3), porém não sendo significativo para AE. Este fato pode ser explicado pela qualidade da proteína presente no alimento ingerido pelo animal. Dependendo da composição da dieta, a exemplo de dietas com elevado percentual de proteínas em frações B3, há uma alteração na taxa de passagem no alimento e taxa de fermentação favorecendo a eficiência, massa microbiana e fluxo microbiano no rúmen (RIBEIRO et al., 2001).

Tabela 3: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de amônia expirada, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca

Modelo <sup>1</sup>	Regressora	Estimativa Parâmetro	Desvio-padrão	P	FIV	$R^2_a$ (%)
NU <sub>5</sub>	Intercepto	-16,62	4,65	0,0004	0	42,48
	PBD	0,3000	0,0491	$3,64 \times 10^{-9}$	2,00	
	AE	0,0074	0,0039	0,0572	1,12	
	CPB	20,02	4,86	$5,07 \times 10^{-5}$	2,01	
NU <sub>6</sub>	Intercepto	-14,80	4,76	0,0021	0	39,03
	PBD	0,4361	0,0375	$<2 \times 10^{-16}$	1,10	
	AE	0,0096	0,0039	0,0157	1,10	
NU <sub>7</sub>	Intercepto	37,35	1,98	$<2 \times 10^{-16}$	-	8,32
	AE	0,0231	0,0046	$9 \times 10^{-7}$	-	

<sup>1</sup>NU: nitrogênio urinário; PBD: proteína bruta da dieta; AE: amônia expirada; CPB: consumo de proteína bruta (kg); CPB2: consumo de proteína bruta (g/kg de peso corporal), CMS: consumo de matéria seca (kg); P: probabilidade de significância; FIV = fator de inflação de variância;  $R^2_a$  = coeficiente de determinação ajustado; tamanho amostral (n) = 269 observações.

A relação direta entre excreção urinária e os níveis de proteína bruta da dieta, indicam que outros processos metabólicos possam estar relacionados antes da excreção da amônia,

como é o caso do NAR. Este fato é comprovado na Tabela 4, onde todos os modelos de regressão foram significativos para as variáveis analisadas e o melhor ajuste de avaliando a excreção de ureia na urina com proteína bruta da dieta, consumo de matéria seca e NAR ( $R^2_a = 67,77$ ).

Tabela 4: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de nitrogênio amoniacal no rúmen, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca

Modelo <sup>1</sup>	Regressora	Estimativa parâmetro	Desvio-padrão	P	FIV	$R^2_a$ (%)
NU <sup>8</sup>	Intercepto	-42.06	11.7	<0,001	0	67,77
	PBD	0.303	0.07	<0,001	1.58	
	CMS	4.925	1.036	<0,001	1.08	
	NAR	1.937	0.381	<0,001	1.6	
NU <sup>9</sup>	Intercepto	-0.082	8.89	0.993	0	56,73
	PBD	0.224	0.079	<0,001	1.49	
	NAR	2.414	0.426	<0,001	1.49	
NU <sup>10</sup>	Intercepto	22.9	3.72	<0,001	-	52.04
	NAR	3	0.36	<0,001	-	

<sup>1</sup>NU: nitrogênio urinário; PBD: proteína bruta da dieta; NAR: nitrogênio amoniacal no rúmen; CMS: consumo de matéria seca (kg); P: probabilidade de significância; FIV = fator de inflação de variância;  $R^2_a$  = coeficiente de determinação ajustado; tamanho amostral (n) = 64 observações.

Sabendo da relação metabólica entre as variáveis estudadas, é plausível que o AE tenha um menor ajuste que NAR, visto que para ocorrer a excreção de amônia via respiração, primeiramente deve-se ter uma produção de amônia ruminal e que este N-NH<sub>3</sub> e parte será aproveitado pelos microrganismos. Entretanto AE teve um melhor ajuste dos modelos com relação ao NUS (Tabela 5).

Tabela 5: Modelo de regressão linear do nitrogênio urinário em função de nitrogênio ureico no sangue, proteína bruta da dieta, e consumo de proteína bruta para bovinos, ajustados com base na matéria seca

Modelo <sup>1</sup>	Regressora	Estimativa parâmetro	Desvio-padrão	P	FIV	R <sup>2</sup> <sub>a</sub> (%)
NU <sup>11</sup>	Intercepto	-18.55	13.03	0.159	0	31.83
	PBD	0.351	0.08	<0,001	1.49	
	NUS	2.345	0.891	<0,001	1.49	
NU <sup>12</sup>	Intercepto	-7.66	13.73	0.579	0	22.34
	CMS	4.92	1.66	0.004	1.08	
	NUS	2	0.96	0.018	1.08	
NU <sup>13</sup>	Intercepto	20.43	10.55	0.057	-	12,49
	NUS	3	0.98	0.003	-	

<sup>1</sup>NU: nitrogênio urinário; PBD: proteína bruta da dieta; NUS: nitrogênio ureico sérico; CMS: consumo de matéria seca (kg); P: probabilidade de significância; FIV = fator de inflação de variância; R<sup>2</sup><sub>a</sub> = coeficiente de determinação ajustado; tamanho amostral (n) = 67 observações.

Com base nos modelos apresentados acima, é possível prever o nitrogênio urinário com base em NUS, principalmente quando associado a PB da dieta, porém com R<sup>2</sup><sub>a</sub> ajustados menores que todos os outros modelos (com exceção do modelo NU<sup>7</sup>).

Esse baixo ajuste, como comentado anteriormente pode ser explicado pelo fato de que parte do N contido, ainda poderá ser reciclada via saliva ou difundido via epitélio ruminal, para ser aproveitado pelos microrganismos, e não necessariamente excretada via urina. Estima-se que em torno de 10 a 15% de todo N ingerido, consegue ser reciclado (RIBEIRO, MACEDO JÚNIOR, SILVA, 2014).

Da mesma forma, Kohn, Dinneen e Cohe (2005), trabalhando com modelos de regressões múltiplas, mostraram que o uso de nitrogênio ureico no sangue em bovinos foi correlacionada linearmente com a excreção urinária de nitrogênio e desta forma as amostras de sangue conseguem prever a excreção de NU.

De modo geral, outro ponto que podemos destacar neste trabalho, refere-se ao fator de inflação das variáveis (FIV). FIV é definida como uma medida de quanto a variância de cada coeficiente de regressão no modelo estatístico se encontra inflado em que as variáveis independentes não estão correlacionadas (BIAGGI, MEDVID, ASSIS, 2017). Neste sentido, todos os fatores de inflação das variáveis foram baixas nos modelos testados neste trabalho, indicando assim a dependência da variável fixa com as variáveis regressoras.

#### 4.4 Conclusão

Concluiu-se que a amônia expirada apresenta menor ajuste no modelo em regressão múltipla que o nitrogênio amoniacal do rúmen, mas maior ajuste que modelos com nitrogênio ureico sérico.

Concluiu-se que a amônia expirada pode ser utilizada para predição da excreção urinária de nitrogênio em bovinos.

#### 4.5 Referências Bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis.16.ed. Arlington: AOAC **International**, 1025p; 1990.
- ALVES, E. M.; PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, C. A. S. et al. Importância da sincronização do complexo proteína/energia na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 20, Ed. 125, Art. 845, 2010.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Minerais. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006.
- BIAGGI, M. K. S.; MEDVID, M.; ASSIS, M. C. Fator de inflação da variância e regressões auxiliares para o diagnóstico do problema de multicolinearidade nos modelos de regressão. **Anais**, XIX congresso brasileiro de engenharia de avaliações e perícias. 2017.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-137, 1962.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência- Editora UFSM. Ed:14, pág. 73, 2017.
- KOHN, R. A.; DINNEEN, M. M.; COHE, R. 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**. 83:879–889. 2005.
- MARTINS, H. C.; SILVA JÚNIOR, J. M.; RENNÓ, L. N. et al. Concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen e nitrogênio ureico no soro de bovinos em pastejo. **ANAIS 55° Reunião da sociedade brasileira de Zootecnia**. 2018.
- PRADOS, L. F., CHIZZOTTI, M. L., VALADARES FILHO S. C., S. et al., Manejo ambiental e predição da excreção de nitrogênio e fósforo por bovinos de corte. Disponível em: <https://brcorte.com.br/>; Acessado em: <11/05/2021.
- QUINTÃO, F. A., PÉREZ, J. R. O., SALVADOR, F. M et al., Desempenho de borregas Santa Inês alimentadas com duas fontes de nitrogênio não-proteico em dietas formuladas estimulando a síntese de proteína microbiana ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, 33(1), 279-284. 2009.

- RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O. G. et al. Eficiência Microbiana, Fluxo de Compostos Nitrogenados no Abomaso, Amônia e pH Ruminais, em Bovinos Recebendo Dietas Contendo Feno de Capim-Tifton 85 de Diferentes Idades de rebrota. **Revista brasileira de Zootecnia.**, 30(2):581-588, 2001.
- RIBEIRO, P. R.; MACEDO JÚNIOR, G. L; SILVA, S. P.; Aspectos nutricionais da utilização da proteína pelos ruminantes. A review. **Veterinária Notícias.** Uberlândia, v. 20, p. 1-14, jul/dez. 2014.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, **Imprensa Universitária**, 2002. 165p.
- TEDESCHI, L. O.; Fox, D. G. (2006). Using mathematical nutrition models to improve beef cattle efficiency. Texas A&M University System, 95-103.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminants. 2.ed., Ithaca: Cornell University. 1994, 476p.
- VALENTE, E. E. L.; ARAUJO, L. C.; CARVALHO, S. T. et al. Breath ammonia as a bioindicator of protein nutrition in heifers. **Livestock Science**, v. 218, p. 97-100, 2018.
- VALENTIM, J. K., MENDES, J. P., PRZYBULINSKI, B. B., et al. Fatores Nutricionais Aplicados à Reprodução de Ruminantes. **UNICIÊNCIAS**, 23(2), 77-82. 2019
- ZOZ, K.; VALENTE, E. G. L.; GRUNEVOLD, D. G. et al. Modelagem da excreção urinária de nitrogênio utilizando parâmetros tradicionais e amônia expirada em bovinos. **Anais**, 31º Congresso nacional de Zootecnia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos em questão se mostraram eficientes para mensuração da amônia a nível ruminal e respiratório, porém novos estudos deverão ser conduzidos para consolidar a metodologia utilizada.