

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

LAILA CECÍLIA RAMOS BENDIA

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE COLETA DE URINA PARA ESTIMAR A
SÍNTESE MICROBIANA EM BOVINOS RECEBENDO DIETAS COM OU SEM
ADIÇÃO DE LIPÍDIOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO – 2014

LAILA CECÍLIA RAMOS BENDIA

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE COLETA DE URINA PARA ESTIMAR A
SÍNTESE MICROBIANA EM BOVINOS RECEBENDO DIETAS COM OU SEM
ADIÇÃO DE LIPÍDIOS**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.**

ORIENTADOR: Prof. Carlos Augusto de Alencar Fontes

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO DE 2014

LAILA CECÍLIA RAMOS BENDIA

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE COLETA DE URINA PARA ESTIMAR A
SÍNTESE MICROBIANA EM BOVINOS RECEBENDO DIETAS COM OU SEM
ADIÇÃO DE LIPÍDIOS**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal.**

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Fábio da Costa Henry (D. Sc., Medicina Veterinária) – UENF

Prof. Alberto Magno Fernandes (D. Sc., Zootecnia) – UENF

Prof. Nivaldo de Faria Sant'Ana (D. Sc., Zootecnia) – UFRRJ

Prof. Carlos Augusto de Alencar Fontes (PhD, Animal Science) - UENF

Orientador

À minha família:

Minha mãe e meu pai, Leila e Amâncio pelo amor e apoio incondicional, pelo exemplo de vida, pelo que sou e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Meus queridos irmãos Amanda e Amâncio Filho de que tanto me orgulho. Aos meus sobrinhos João Lucas e Maria Clara pela enorme alegria que trouxeram a nossa família.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora e São Geraldo que intercederam por mim a Deus nesta etapa da minha vida;

Aos meus pais, por tornarem tudo isso possível minha eterna gratidão e amor eterno;

A minha irmã Amanda pelo amor, amizade e preocupação e por trazer mais alegria a nossa família com João Lucas e Maria Clara.

Ao meu irmão Amâncio Filho que com sua enorme alegria e espírito de festividade faz com que todos os momentos que a família se reúne sejam momentos inesquecíveis;

A meus avós (*in memoriam*), Salotéria e Alexandrino, e meus avós Luiz Carlos e Cecília, por me ensinarem os verdadeiros valores da vida que levarei sempre comigo;

A todos os meus familiares que sempre me incentivaram e tiveram presença marcante em minha vida;

A Cassiano, pela confiança, carinho, compreensão e enorme apoio;

Ao Professor Carlos Augusto de Alencar Fontes, meu orientador, pela competência científica, pela disponibilidade ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Aos professores Alberto, Fábio e Nivaldo que gentilmente aceitaram o convite de participar da banca de defesa e pelas sugestões que enriqueceram ainda mais esta dissertação;

Aos técnicos de Laboratório: Josias e Almir pela disponibilidade, atenção e ensinamentos para a execução das análises laboratoriais.

As amigas Elizabeth e Renata pela amizade, apoio e ajuda, e por sempre poder contar com vocês durante esta etapa da minha vida;

Aos companheiros de trabalho Elizabeth, Clóvis, Tiago, Jéssica, Camila, Fábio, Lucas, Ítalo, Mateus, Carolina, João Gomes e Viviane que não só tornaram possível a realização deste trabalho, mas também por tornarem os dias de trabalho ao sol e as madrugadas mais agradáveis e divertidas;

Aos funcionários do setor de Gado de Corte, que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Karina Zorzi (*in memorian*), que tanto contribuiu para a realização deste trabalho, com sua enorme disponibilidade e força de vontade, e pelo belo exemplo de pessoa que nunca desiste de seus sonhos e que jamais esquecerei;

Enfim, a todos que estiveram presentes na minha vida e que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui o meu MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

Laila Cecília Ramos Bendia, filha de Leila Aparecida de Oliveira Ramos Bendia e Amâncio Gabriel Bendia, nasceu em 25 de abril de 1988, na Cidade de Varre-Sai, Rio de Janeiro.

Em março de 2007 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, na Cidade de Campos dos Goytacazes – RJ.

Em março de 2009 iniciou a participação como bolsista de Iniciação Científica, na área de Bovinocultura de Corte da UENF, orientada pelo professor Carlos Augusto de Alencar Fontes.

Em março de 2012, com o mesmo orientador submeteu à defesa de monografia e em abril de 2012 com o título “Eficiência de síntese microbiana em bovinos de corte recebendo diferentes níveis de concentrado em associação com cana-de-açúcar *in natura* ou silagem de cana com aditivos” conclui o curso de Zootecnia.

No ano de 2012 ingressou no mestrado no programa de pós-graduação em Ciência Animal na mesma universidade e em fevereiro de 2014 submeterá a defesa de dissertação onde receberá o título de mestre em Ciência Animal.

RESUMO

BENDIA, LAILA CECÍLIA RAMOS, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2014; Avaliação de metodologias de coleta de urina para estimar a síntese microbiana em bovinos recebendo dietas com ou sem adição de lipídios. Professor Orientador: Carlos Augusto de Alencar Fontes.

Objetivou-se avaliar a influência da suplementação energética, com ou sem adição de lipídios na forma de óleo de soja ou soja grão moída, sobre a produção e eficiência de síntese microbiana, concentração de amônia ruminal e nitrogênio ureico no soro, excreção urinária de ureia e balanço de nitrogênio. Objetivou-se, ainda, avaliar a efetividade do método de coleta de amostra *spot* de urina na predição do volume e dos conteúdos urinários e dos compostos nitrogenados: creatinina, ureia e derivados de purina, tomando-se como referência os valores obtidos por coleta total de urina por períodos de 24 horas. Foram utilizados oito novilhos fistulados no rúmen, mantidos em baias individuais. Os tratamentos foram: T1-silagem de milho; T2-silagem de milho + concentrado; T3-silagem de milho + concentrado com adição de lipídio na forma de óleo de soja; T4-silagem de milho + concentrado com adição de lipídios na forma de soja grão moída. As estimativas de síntese de proteína microbiana foram obtidas com base na excreção urinária de derivados. As concentrações de amônia no rúmen foram determinadas imediatamente antes 2, 4, 6 e 8 horas após a alimentação. Verificaram-se diferenças ($P < 0,05$) entre os valores de volume urinário e síntese microbiana determinados por coleta total de urina e aqueles estimados a partir de amostras *spot* de urina e de equações propostas por diferentes autores. Houve efeito ($P < 0,05$) da suplementação energética sobre a síntese de proteína microbiana, eficiência de síntese e balanço nitrogenado, verificando-se maiores valores para os tratamentos T2, T3 e T4, em relação ao T1 (silagem apenas). Não houve efeito ($P > 0,05$) da adição de lipídios, independentemente da fonte (T3 e T4, em relação a T2), sobre a síntese de proteína microbiana, eficiência de síntese e balanço de nitrogênio. A adição de lipídios ao suplemento (T3 e T4, em relação ao T2) trouxe redução ($P < 0,05$) da concentração de amônia no rúmen. Houve efeito ($P < 0,05$) da suplementação energética sobre a

concentração de nitrogênio ureico no soro, excreção urinária de ureia e balanço de nitrogênio, verificando-se nos tratamentos T2, T3 e T4 maiores valores ($P < 0,05$) que no T1. Não houve efeito ($P > 0,05$) da adição de lipídios (T3 e T4, em relação ao T2) sobre a concentração de nitrogênio ureico no soro, excreção urinária de ureia e balanço de nitrogênio. Conclui-se que é necessária a coleta total de urina, por período de 24 horas, para estimar a síntese microbiana, com base na excreção urinária de derivados de purina. A suplementação energética, com ou sem adição de lipídios, pode ser utilizada com estratégia para aumentar a síntese de proteína microbiana em bovinos recebendo dieta à base de silagem de milho.

Palavras-chave: óleo de soja, soja grão moída, amônia ruminal e balanço de nitrogênio.

ABSTRACT

BENDIA, LAILA CECÍLIA RAMOS, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2014; Evaluation of methodologies of urine collection to estimate microbial synthesis in bovines fed diets containing or not lipids. Advisor: Carlos Augusto de Alencar Fontes.

The research aimed to evaluate the influence of energetic supplement, containing or not, soybean oil or ground soybean seeds on yield and efficiency of microbial synthesis, concentration of ruminal ammonia and serum urea nitrogen, urinary urea excretion and nitrogen balance. It was also an objective to evaluate the effectiveness of urinary spot sample method to predict urinary volume and content of the nitrogenous : creatinine, urea and purine derivatives taking as reference values those obtained from total urinary collection, during a 24 hour-period. They were utilized eight rumen-cannulated steers, which were maintained in individual stalls. The imposed experimental treatment were: T1-corn silage only; T2- corn silage plus concentrate; T3- corn silage plus concentrate containing soybean oil; T4-corn silage plus concentrate containing ground soybean seeds. Estimates of microbial protein synthesis were obtained based on urinary purine derivatives excretion. Ruminal ammonia concentration were determined immediately before feeding and two, four, six and eight hours after feeding. They were observed differences ($P < 0.05$) among urinary volume values from total collection and values obtained from spot samples and from literature equations. There was effect of energetic supplementation on microbial protein output, protein synthesis efficiency and nitrogen balance, with higher ($P < 0.05$) observed for T2, T3 and T4 treatments, in relation to T1 (silage only). There was not effect of lipid addition to concentrate ($P > 0.05$) irrespectively to source (T3 and T4 versus T2) on microbial protein output, efficiency of synthesis and nitrogen balance. Addition of lipid to supplement (T3 and T4 versus T2) reduced ($P < 0.05$) rumen ammonia concentration. Supplementation (T2, T3 and T4 versus T1) increased ($P < 0.05$) serum nitrogen concentration, urea excretion and nitrogen balance. There was no effect ($P > 0.05$) of lipid addition on (T3 and T4 versus T2)

sérum nitrogen concentration, urea excretion and nitrogen balance. It was concluded that to have good estimate of microbial protein synthesis based on purine derivatives, it is required total urine collection during a 24-hour period. Energetic supplementation with or without lipid addition may be used as na strategie to increase microbial protein synthesis in bovines receiving corn silage based diets.

Key-words: soybean oil, ground soybean seed, rumen ammonia, nitrogen balance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Eficiência de síntese microbiana.....	17
2.2. Efeito da suplementação energética sobre a síntese microbiana.....	19
2.3. Lipídios na dieta dos ruminantes.....	21
2.3.1. Metabolismo dos lipídios no rúmen.....	21
2.3.2. Efeitos da suplementação lipídica sobre a fermentação ruminal.....	23
2.3.3. Efeito da suplementação lipídica sobre o metabolismo do nitrogênio	24
2.4. Métodos para estimar a síntese microbiana.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

O rúmen é um componente importante do trato digestivo dos ruminantes, habitado por uma densa e variada população de microrganismos, cuja importância está no fato de degradar material vegetal, principalmente, a parede celular, que não poderia ser digerido pelos ruminantes e a habilidade de usar nitrogênio não proteico (NNP). Os produtos finais da fermentação microbiana no rúmen são ácidos graxos voláteis (AGV), usados pelo hospedeiro com fonte de energia, metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e proteína microbiana (OWENS e GOETSCH, 1993).

Embora haja sequestro e “turnover” de microrganismos no rúmen, grande proporção dos microrganismos deixa o rúmen e é digerido no trato gastrointestinal posterior (CLARK et al., 1992). Cerca de 40 a 80% dos requerimentos diário de aminoácidos dos ruminantes são atendidos a partir da proteína microbiana (PBmic) absorvida no intestino delgado (SNIFFEN e ROBINSON, 1987).

Os microrganismos do rúmen são compostos por cerca de 47% de proteína com base no seu peso seco (HESPELL e BRYANT, 1979), com alto valor biológico. A composição dos aminoácidos da PBmic é semelhante aos presentes nos produtos de origem animal, leite e carne e, quando comparada com grãos, apresenta maior proporção de metionina e lisina, aminoácidos essenciais (VERBIC, 2002).

Em vista da importância da PBmic para a nutrição proteica dos ruminantes, tem-se buscado maximizar a síntese de PBmic (STERN et al., 1994), e enfatizado o estudo de fatores que a afetam (STERN e HOOVER, 1979).

A conservação da forragem na forma de silagem é prática comum, muito utilizada durante o período seco do ano como suplemento alimentar. No entanto, em animais consumindo silagem, a síntese de PBmic é baixa (THOMAS et al., 1979).

A silagem de milho apresenta alto teor de nitrogênio não proteico (amônia, aminoácidos e peptídeos), podendo corresponder a 52% (CABRAL et al., 2000) e 55% (SNIFFEN et al., 1992) da proteína bruta. Isto implica em maior disponibilidade de nitrogênio no rúmen. Está bem estabelecido que a síntese de PBmic é maximizada quando a taxa de fermentação dos carboidratos ocorre na mesma taxa de degradação da proteína (CLARCK et al., 1992). Desta forma, tem se recomendando a utilização de concentrado em dietas contendo silagem de milho como estratégia para reduzir as perdas de nitrogênio, maximizando a síntese de

PBmic (MALAFAIA et al. 1997) que corresponde a forma mais econômica de atender as exigências proteicas dos ruminantes.

Avaliar o quanto de PBmic é produzida numa vasta gama de condições alimentares torna-se essencial para identificar e corrigir os fatores que a afetam, de modo a fazer melhor uso do nitrogênio presente nas forragens e em fontes de proteína não degradada no rúmen (PNDR), uma vez que, os requerimentos de proteína metabolizável dos ruminantes são atendidos pela absorção intestinal de PBmic e PNDR. As exigências de PNDR são calculadas como o requerimento total de proteína menos a quantidade PBmic alcançando o duodeno (NRC, 1996).

A excreção urinária de derivados de purina (DP), termo dado à soma de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, permite estimar o fluxo de nitrogênio microbiano para o duodeno (CHEN e GOMES, 1992), sendo considerado um método mesmo invasivo, por não requerer animais fistulados, no entanto, implica no uso de fúnis e sondas para coleta total de urina em machos e fêmeas, respectivamente, os quais podem trazer desconforto, feridas e infecções urinárias em períodos prolongados de coleta (VALADARES et al., 1997).

Uma vez que, os métodos tradicionais para quantificar a produção microbiana são laboriosos, requerem animais fistulados e podem apresentar resultados inconsistentes devido a dificuldades de se mensurar o fluxo da digestão e obter uma amostra representativa dos microrganismos do rúmen (BRODERICK e MERCHEN, 1992), a técnica baseada na excreção de DP na urina tem ganhado mais atenção.

O uso da excreção de creatinina como um marcador interno do volume urinário tem permitido quantificar a excreção diária de DP sem coleta total, a partir de uma única amostra de urina, denominada amostra *spot* (VALADARES et al., 1999), o que possibilita não só, a obtenção de dados de forma simples e sem desconforto animal, mas também a sua aplicação a nível de fazenda.

A estimativa do volume urinário a partir da amostra *spot* de urina se baseia na relação entre a excreção diária de creatinina e a concentração de creatinina na amostra *spot*. Na literatura é possível observar trabalhos sugerindo o uso da amostra *spot* de urina para estimar a excreção urinária de DP (VALADARES et al., 1999; SILVA et al., 2001; BARBOSA et al., 2006; CHIZZOTTI et al., 2006). Contudo, nos referidos trabalhos a excreção diária de creatinina foi obtida pelo produto do volume urinário e da concentração de creatinina da coleta total quantificada no

experimento. Desta forma, a indicação da amostra spot para estimar a excreção de DP, pode não se aplicar quando é realizado somente coleta de amostra *spot* de urina, uma vez que, nesta metodologia, a excreção diária de creatinina deve ser estimada a partir de equações.

Portanto é necessário comparar a capacidade de predição do volume urinário por meio de amostra *spot* de urina utilizando equações para estimar a excreção diária de creatinina, pois, uma vez que, seja necessário realizar coleta previa de urina total para quantificar a excreção diária de creatinina, não se justifica o uso de amostra *spot* de urina, visto que, o volume urinário já tenha sido quantificado.

O uso da suplementação lipídica, por meio de óleos, sementes oleagenosas ou gordura *bypass* não é prática recente na nutrição dos ruminantes e tem por objetivo principal aumentar a densidade energética da dieta. Tal prática tem recebido renovada atenção, sendo utilizada não só como fonte de energia, mas também, como estratégia nutricional para aumentar a eficiência animal, reduzindo a emissão de metano e alterar o perfil dos ácidos graxos presentes nos produtos oriundos dos ruminantes, leite e carne. No entanto, a suplementação lipídica frequentemente leva a um decréscimo na digestão da matéria orgânica (MO), devido principalmente a uma redução na digestão da fração fibrosa (DOREAU e CHILLIARD, 1997) e modificações no ecossistema ruminal (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al., 1983; CZERKAWSKI et al., 1975).

A suplementação lipídica apresenta dois efeitos sobre a síntese de PBmic e esses efeitos seriam antagonistas: um efeito negativo sobre o metabolismo microbiano se opondo ao favorável efeito da defaunação sobre a síntese de biomassa microbiana, de modo que, a resposta da suplementação lipídica sobre síntese de PBmic dependeria do efeito líquido destes dois fatores (Van NEVEL e DEMEYER, 1981).

Considerando a importância da PBmic para a nutrição proteica dos ruminantes, bem como, o interesse em adicionar fontes lipídicas à dieta, e a necessidade de se obter métodos simples que permitam quantificar a síntese microbiana de forma precisa, objetivou-se com este trabalho avaliar a efetividade do método de predição do volume urinário e da composição urinária a partir de amostras spot de urina, tomando como referência os valores obtidos por coleta total de urina no período de 24 horas, bem como, a influência da suplementação

energética e da adição de lipídios ao suplemento sobre a produção microbiana e eficiência de síntese microbiana (Emic), estimada com base na excreção urinária de DP, balanço nitrogenado (BN), níveis de amônia ruminal (N-NH_3) e nitrogênio ureico no soro (NUS) e excreção urinária de ureia (ExUU), em bovinos confinados suplementados ou não com diferentes fontes lipídicas, na forma de soja grão moída ou óleo de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Eficiência de síntese microbiana

No rúmen, a MO digestível é fermentada a AGV, dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4), assim gerando energia, principalmente na forma de adenosina trifosfato (ATP). Os microrganismos utilizam ATP na ligação de pequenos compostos nitrogenados (peptídeos, aminoácidos e amônia), oriundos da fermentação ruminal, para sintetizar PBmic. A eficiência energética desse processo, isto é, eficiência de síntese microbiana (E_{mic}) é obtida dividindo a quantidade de N microbiano sintetizado pela quantidade de energia disponível (HOOVE e STOKES, 1991), e tem sido a mais comum forma de avaliar a eficiência de crescimento microbiano (BACH et al., 2005).

Em 1960, BAUCHOP e ELSDEN (1960) introduziram o termo Y_{ATP} (gramas de matéria seca microbiana/mol de ATP produzido, $\text{gMS}_{\text{mic}}/\text{ATP}$) ao observarem que a produção de diferentes microrganismos foi proporcional a quantidade de ATP sintetizado, e que a produção destes microrganismos por mol de ATP era relativamente constante. No entanto, trabalho posterior permitiu observar que Y_{ATP} pode não ser constante mesmo em ótima taxa de crescimento e que diferentes tipos de microrganismos podem variar na sua taxa de crescimento se energia é utilizada para manutenção e não para o crescimento (ROBSON e SUMMER, 1967). Com o advento do quimiostato, tornou-se aparente que a produção celular poderia variar com a taxa de crescimento dos microrganismos e a energia poderia ser utilizada para funções não relacionadas ao crescimento.

Os microrganismos do rúmen apresentam exigências de manutenção específicas (ISAACSON et al., 1975), as quais são atendidas em preferência ao crescimento, sendo a energia disponível para o crescimento representada pela energia total menos a energia necessária para manutenção. A energia de manutenção tem sido definida como a energia desviada do crescimento para processos que não resultam em aumento na massa celular (HESPELL e BRYANT, 1979), podendo corresponder a uma quantidade significativa da energia utilizada quando os microrganismos apresentam baixa taxa de crescimento (ISAACSON et al., 1975).

A síntese de PBmic depende principalmente de um adequado fornecimento de carboidratos como fonte de energia, o qual acredita-se ser o principal fator limitando o crescimento microbiano. O fornecimento de N e a sincronia com o qual N e energia tornam-se disponíveis também afetam a síntese microbiana (CLARK et al., 1992).

A disponibilidade de energia estimula a taxa de crescimento e utilização de compostos nitrogenados pelos microrganismos, e reduz a concentração de amônia no rúmen (RUSSELL et al., 1983), no entanto, quando existe excesso de energia, ocorre redução na taxa de crescimento e a concentração de nitrogênio passa a ser o fator limitante controlando a taxa de crescimento (VAN KESSELL e RUSSELL, 1996), e o fornecimento de fontes de nitrogênio adicionais aumenta a taxa de crescimento (RUSSELL et al., 1983; STOKES et al., 1991; VAN KESSELL & RUSSELL, 1996).

A menor taxa de crescimento observada quando há excesso de energia tem sido relacionada à capacidade dos microrganismos de dissiparem energia por meio de ciclos fúteis de prótons, potássio ou amônia quanto ocorre um desbalanço entre as reações de catabolismo e anabolismo, comumente referido como desacoplamento energético (RUSSEL e COOK, 1995).

O desacoplamento energético não representa uma exigência de manutenção *per si* (RUSSELL e COOK, 1995), mas reduz a eficiência de crescimento e tem sido categorizado com um dos componentes da exigência de manutenção (HESPELL e BRYANT, 1979).

Quando as concentrações de amônia no rúmen estão baixas, esta é assimilada pelo processo envolvendo glutamina sintase, o qual requer ATP, podendo reduzir Y_{ATP} em 14% (LENG e NOLAN, 1984). No entanto, a adição de aminoácidos em dietas onde ureia é a única fonte de nitrogênio pode promover maiores taxas de crescimento (MAENG e BALDWIN, 1975).

O rúmen, embora bem tamponado, pode ter variações nos valores de pH sob diferentes condições dietéticas, sendo a síntese microbiana relacionada negativamente com o pH (BACH et al., 2005). Valores de pH ruminal baixo é o resultado maiores quantidades de matéria orgânica (MO) fermentada no rúmen (HOOVER e STOKES, 1991), o que acarreta em maior disponibilidade de substratos para a síntese microbiana. No entanto, em pH 6,0, a Emic pode ser reduzida devido

ao desvio da energia do crescimento para a manutenção do pH intracelular (STROBEL e RUSSELL, 1986).

A reciclagem de nitrogênio que ocorre no rúmen pode reduzir a eficiência de síntese. A reciclagem de N per si não representa uma perda excessiva de N, contudo a energia é utilizada ineficientemente para resíntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes, o que aumenta o custo de manutenção (LENG e NOLAN, 1984).

Apesar de altas taxas de diluição reduzirem a digestibilidade da MO, a eficiência de síntese é maior (ISAACSON et al., 1975; MENG et al., 1999), o que tem sido atribuído a menores exigências de manutenção relacionadas a elevadas taxas de crescimento (ISAACSON et al., 1975), seleção de espécies com maior taxa de crescimento, maior proporção de microrganismos em fase exponencial de crescimento e redução da reciclagem de N no rúmen, devido menor tempo de permanência e engolfamento de bactérias, em virtude do maior fluxo de bactérias e protozoários para o intestino (MENG et al., 1999).

2.2. Efeito da suplementação energética sobre a síntese microbiana

A quantidade de PBmic que alcança o intestino delgado depende da disponibilidade de nutrientes e da eficiência de utilização desses nutrientes pelos microrganismos do rúmen (STERN et al., 2006). Proteína bruta e carboidratos são os principais nutrientes requeridos para o crescimento microbiano. A proteólise determina a disponibilidade de amônia (NH_3), aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos de cadeia ramificada, enquanto a fermentação dos carboidratos fornece esqueletos de carbono e energia na forma de ATP (STERN et al., 1994).

Os carboidratos são a principal fonte de energia para os microrganismos (NOCEK e RUSSELL, 1988), portanto, a disponibilidade de energia depende da composição da dieta e da extensão da fermentação ruminal dos carboidratos, que em primeiro momento, depende da quantidade de carboidratos rapidamente fermentados no rúmen como, açúcares, amido e pectina, e, posteriormente, da quantidade e composição dos componentes da parede celular (HOOVER e STOKES, 1991).

A sincronia na disponibilidade de energia e compostos nitrogenados (N) no rúmen tem sido reconhecida como o fator que mais afeta a síntese de proteína microbiana (CLARK et al., 1992). A taxa na qual a energia é disponibilizada é o fator mais limitante à síntese de proteína microbiana, uma vez que os carboidratos fibrosos apresentam lenta taxa de digestão, e as proteínas são rápida e extensivamente degradadas no rúmen.

Em estudo realizado para avaliar o efeito de diferentes fontes de carboidratos (pectina, sacarose, amido e fibra detergente neutro (FDN)) sobre a síntese de PBmic em sistemas de fermentação *in vitro*, Hall e Herejk (2001), observaram que o amido proporcionou maior síntese, seguido da pectina, sacarose e por último da FDN. Também foi observado neste experimento que os picos de produção de PBmic foram atingidos 15h6min; 13h5min; 12h6min e 19h3min horas após o início da fermentação, respectivamente, para amido, pectina, sacarose e FDN. Comparando dois níveis de inclusão de amido (21 e 32%), em dieta a base de silagem de alfafa, Oba e Allen (2003), verificaram maior síntese de PBmic para o nível de 32% de amido na forma de grão de milho úmido ou moído.

A alterações na relação volumoso:concentrado da dieta podem modificar as quantidades de energia e proteína disponíveis no rúmen, conseqüentemente, a síntese microbiana (CLARK et al., 1992), entretanto, a magnitude do efeito depende do tipo de volumoso. O benefício de aumentar o nível de concentrado da dieta pode ser menos evidente quando o volumoso é de boa qualidade, tendo elevados teor proteico e digestibilidade (CANTALAPIEDRA-HIJAR et al., 2009).

A adição de grãos e suplementos proteicos a dietas baseadas em silagem pode favorecer a síntese de PBmic, promovendo melhor sincronia entre energia e nitrogênio e, em parte substituindo, a energia que foi convertida em AGV durante a fermentação no silo (ROOKE et al., 1985).

Ao avaliar o efeito de níveis crescente de concentrado (25,0; 37,5; 50,0 62,5 e 75,0%) na dieta, sobre a Emic, foram observados efeito quadrático (TIBO et al., 2000; LADEIRA et al., 1999) e ausência de efeito (DIAS et al., 2000) dos diferentes níveis de concentrado sobre a Emic.

Segundo Sniffen e Robinson (1987), o crescimento microbiano seria máximo em dietas com 70% de volumoso, devido as melhores condições de pH e taxa de passagem.

2.3. Lipídios na dieta dos ruminantes

2.3.1. Metabolismo dos lipídios no rúmen

As dietas tipicamente fornecidas aos ruminantes contêm baixas concentrações de lipídios, em torno de 3,5% (PALMQUIST e JENKINS, 1980), os quais se encontram principalmente na forma de ácido graxo (DOREAU e FERLAY, 1994). Os ácidos graxos (AG) são constituídos por uma cadeia de hidrocarboneto, cujo comprimento varia de quatro a 36 átomos de carbono, com um grupo metil (CH_3) em uma extremidade e um grupo carboxila (COOH) na outra, podendo ainda ser classificado em saturado, quando apresentam apenas ligações simples entre carbonos, ou insaturado, contendo uma ou mais duplas ligações na cadeia carbônica (LEHNINGER et al. 1995).

Os AG presentes nas dietas dos ruminantes se encontram principalmente na forma de ácido graxo insaturado (AGI), sendo o linoleico (18:2n-6), predominante nas sementes oleaginosas, enquanto que o ácido linolênico (18:3n-3), geralmente é maior nas forragens (PALMQUIST & JENKINS, 1980). No entanto, durante seu metabolismo no rúmen, os lipídios dietéticos são extensivamente modificados pela atividade dos microrganismos em dois principais processos, lipólise das ligações ésteres e biohidrogenação dos AGI, resultando em marcada diferença entre o perfil dos AG dietéticos e os ácidos graxos disponíveis para absorção e utilização dos tecidos.

Os lipídios dietético que chegam ao rúmen são rapidamente hidrolisados por lipases extracelulares produzidas predominantemente por bactérias, com pouca evidência de um significativo papel dos protozoários, fungos, ou lipases presentes na saliva e vegetais (LOCK et al, 2006). As lipases microbianas hidrolisam as ligações ésteres, como consequência, glicerol e ácidos graxos são liberados no rúmen, sendo o glicerol rapidamente fermentado levando a formação de ácido propiônico (GARTON et al, 1961). Apesar da rápida atividade lipolítica, com pouca formação de intermediários, como, mono- e diglicerídeos, a extensão da hidrólise pode ser afetada pela inclusão de antimicrobianos, onde os ionóforos apresentam maior efeito inibitório (VAN NEVEL e DEMEYER, 1995), e pH abaixo de 6, podendo

a atividade lipolítica ser reduzida em 50% em pH 5,5 (VAN NEVEL e DEMEYER, 1996).

A biohidrogenação é a segunda maior transformação que os lipídios dietéticos sofrem no rúmen. Este processo, no entanto, utiliza como substrato AGI que apresentam o grupo carboxila livre, portanto, dependente da hidrólise (KEPLER et al., 1970), sendo realizado em maior taxa e extensão para lipídios aderidos a partículas de alimento (HARFOOT, et al., 1973), podendo ainda, ser afetada pela quantidade de substrato. Aumento nos AGI eleva a extensão da biohidrogenação de ácidos graxos polinsaturados (18:2 e 18:3) e decresce as dos ácido monoinsaturados (18:1 e *trans* 18:1), resultando em aumento no fluxo intestinal destes ácidos (HARVANTINE e ALLEN, 2006).

O passo inicial da biohidrogenação dos ácidos linolênico e linoleico envolve uma isomerização responsável pela formação de duplas ligações conjugadas, resultando na formação do ácido *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoico, o qual, então sofre hidrogenação de sua dupla ligação *cis* transformando em ácido *trans*-11-octadecanoico, ácido vacênico. O último passo é a hidrogenação deste ácido a ácido octadecanoico, ácido esteárico (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997), como consequência, os produtos oriundos dos ruminantes, carne e leite, apresentam maiores proporções de ácidos graxos saturados.

Os microrganismos envolvidos na biohidrogenação são divididos em dois grupos, A e B, dependendo do substrato utilizado e do produto gerado, sendo os do grupo A relacionados ao primeiro passo da biohidrogenação, portanto, utilizam como substrato os ácidos linoleico e linolênico e produzem ácido *trans*-11-octadecanoico. O último passo da biohidrogenação é realizado pelo grupo B, o qual converte o ácido *trans*-11-octadecanoico a ácido esteárico, de modo que, para uma eficiente e completa biohidrogenação os dois grupos são requeridos (KEMP e LANDER, 1984).

Os microrganismos também podem incorporar os AG presentes no rúmen, podendo reduzir a síntese *de novo* (DEMEYER et al., 1978), sendo esta atividade maior quando se adiciona lipídios a dieta, levando em alguns casos, a formação de gotículas de lipídios citoplasmáticas (BAUCHART et al., 1990), e a redução na biohidrogenação (DEMEYER et al., 1978; BAUCHART et al., 1990).

2.3.2. Efeitos da suplementação lipídica sobre a fermentação ruminal

A necessidade de elevar a densidade energética da dieta para atender a maior demanda de animais de alta produção, bem com, o interesse em aumentar a eficiência animal, inibindo a produção de metano enquanto aumenta a produção de ácido propiônico (CZERKAWSKI et al., 1966), e alterar o perfil dos ácidos graxos presentes nos produtos oriundos dos ruminantes, aumentando a concentração do ácido linoleico conjugado (CLA) e reduzir os AGS (CHILLIARD et al., 2001; LUNA et al., 2008), são os motivos pelos quais, fontes ricas em lipídios, são adicionadas na dieta dos ruminantes.

No entanto, as alterações benéficas nos produtos da fermentação, em muitos casos, tem sido acompanhadas por uma redução na digestão da matéria orgânica (MO) e fibra detergente neutro (FDN) no rúmen (SUTTUN et al., 1983; IKWUEGBU e SUTTON, 1982), contudo, modificações nos ácidos graxos voláteis (AGV) podem ser observadas, sem efeito negativo sobre a degradação da MO no rúmen (DOREAU et al., 1991; OHAJURAKA et al., 1991), ou de forma contrária, uma redução da digestibilidade da matéria seca (MS) pode ser observada sem alterações nas proporções molares dos AGV (MURPHY et al., 1986) quando lipídios são adicionados a dieta dos ruminantes

A redução na digestibilidade ruminal, pode ser compensada por uma maior digestibilidade intestinal (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al., 1983; BOGGS et al., 1987; JENKINS e FOTOUHI, 1990; VAN NEVEL et al., 1992), como consequência, a suplementação lipídica, em muitos casos, não reduz a digestibilidade no trato total (BOGGS et al., 1987; JENKINS e FOTOUHI, 1990; VAN NEVEL et al., 1993), embora, decréscimo possa ser observado (IKWUEGBU e SUTTON, 1982).

As diferenças observadas na literatura sobre os efeitos da suplementação lipídica têm sido atribuídas: (1) à quantidade de lipídio: pouco efeito negativo é observado em baixas concentrações de lipídios; (2) natureza do lipídio: distúrbios são maiores para óleos fornecidos na forma livre (SUTTON et al., 1983), e polinsaturados (PALMQUIST e JENKINS, 1980, JENKINS, 1993); (3) diferentes dietas basais: os efeitos dos lipídios são menores para dietas ricas em forragem quando comparadas com dietas ricas em concentrado (UEDA et al., 1993) e maiores para silagem de milho do que, para feno (BEN SALEM et al. 1993).

Os distúrbios observados quando se adiciona lipídios à dieta, têm sido atribuídos, principalmente, a mudanças no ecossistema ruminal. A suplementação lipídica tem efeito defaunatório, podendo reduzir drasticamente o número de protozoários no rúmen (IKWUEGBU & SUTTON, 1982; SUTTON et al., 1983), acompanhada por uma aumento no número de bactérias (CZERKAWSKI et al., 1975).

Os ácidos graxos, principalmente, os insaturados e com configuração *cis* apresentam efeitos tóxicos aos microrganismos do rúmen (NAGARAJA et al, 1997), sendo as bactérias gram-positivas e protozoários mais sensíveis, inibindo seu crescimento e metabolismo ao desestruturar sua membrana celular, interrompendo sua função (JENKINS, 1993). A menor sensibilidade das bactérias gram-negativas é atribuída à presença de uma segunda membrana, uma membrana externa, revestida de lipopolissacarídeos que age filtrando ácidos graxos de cadeia média e longa e evita o acúmulo de ácidos graxos no interior da membrana celular em concentrações inibitórias (SHEU e FREESE, 1973).

A capacidade de adsorção dos lipídios sobre as partículas de alimento, impedindo a ação digestiva das enzimas microbianas, o que reduziria, não só, a digestão ruminal, como também, a disponibilidade de nitrogênio e energia para o crescimento microbiano, também tem sido utilizada para explicar os efeitos da suplementação lipídica, sendo esses efeitos, antimicrobiano e de recobrimento físico, as principais ações dos lipídios responsáveis por modificações na fermentação ruminal (JENKINS, 1993).

2.3.3. Efeito da suplementação lipídica sobre o metabolismo do nitrogênio

O metabolismo do N no rúmen pode ser dividido em degradação proteica e síntese microbiana (BACH et al., 2005). A adição de lipídio a dieta dos ruminantes pode decrescer (CZERKAWSKI et al., 1975; JENKINS 1987; JENKINS & FOTOUHI, 1990), não afetar (BROUDISCOU et al., 1994), bem como, aumentar (SUTTON et al., 1983; MURPHY et al., 1987) a degradação ruminal da proteína.

Apesar do efeito negativo sobre o metabolismo microbiano e o fornecimento de pouca energia para o crescimento microbiano (AFRC, 1993), a suplementação lipídica tipicamente eleva a eficiência de síntese microbiana (SUTTON et al., 1983;

IKWUEGBU & SUTTON, 1982; BOGGS et al., 1987; JENKINS & FOTOUHI, 1990, BROUDISCOU et al., 1994). No entanto, na ausência de redução da degradação ruminal e do número de protozoários, a suplementação lipídica demonstra pouca influencia sobre a Emic (OHAJURUKA et al., 1991; KRYSL et al., 1991; DOREAU et al., 1991).

Em uma revisão, Doreau e Ferlay (1995) concluíram que a maior eficiência ocorreria principalmente quando a degradabilidade da matéria orgânica no rúmen era reduzida pela suplementação lipídica. De fato, os resultados de maior Emic, acima citados, foram acompanhados por redução na digestão no rúmen. No entanto, a maior Emic foi atribuída principalmente, à redução no número de protozoários (SUTTON et al., 1983; IKWUEGBU e SUTTON, 1982) ou ainda, à maior taxa de diluição (BOGGS et al., 1987).

Demeyer e Van Nevel (1979) demonstram, *in vitro*, que os protozoários diminuem a síntese líquida de célula microbiana, no entanto, não alteram a taxa de crescimento total. Essa ineficiência é causada pela reciclagem do N entre bactérias e protozoários (LENG e NOLAN, 1984), em decorrência do engolfamento de bactérias por protozoários e a preferencial retenção de protozoários no rúmen. Oldick et al. (2000) observaram que a reciclagem de N no rúmen decresceu linearmente com o aumento no grau de insaturação da fonte de lipídios fornecida a novilhas e vacas não lactantes.

Apesar de a suplementação lipídica frequentemente aumentar a Emic, esse aumento nem sempre é acompanhado por maior fluxo de N microbiano (JENKINS e FOTOUHI, 1990; VAN NEVEL et al., 1993), podendo reduzir (BOGGS et al., 1987) o fluxo de N microbiano para o duodeno. No entanto, aumento no fluxo também pode ser observado (SUTTON et al., 1983; BROUDISCOU et al., 1994).

Na tentativa de identificar o nível de suplementação lipídica que aumentaria a Emic sem reduzir a degradação ruminal da MO, Ikwuegbu e Sutton (1982), forneceram quantidades crescentes de óleo de linhaça (0, 13, 26, 40 mL de óleo/dia) a ovinos. Apesar de a suplementação decrescer linearmente a digestibilidade ruminal, e não afetar o fluxo de N microbiano para o duodeno, os autores observaram um efeito quadrático da suplementação sobre a Emic, com maiores valores observados com 26 mL/dia (32 vs 59 gN/kg MODR, dieta controle e suplementa, respectivamente), coincidindo com drástica redução na população de

protozoários (372 vs 9×10^4 /mL dieta controle e suplementa, respectivamente). Em maiores níveis de suplementação (40mL/dia), houve redução na Emic, o que, foi atribuído pelos autores à inexistência de redução adicional do número de protozoários (9 vs 1×10^4 /mL, 26 e 40mL/dia, respectivamente).

Em estudos utilizando animais faunados e defaunados, constatou-se que, a defaunação aumentou o fluxo de N microbiano e a Emic, em relação a animais faunados recebendo dieta controle, sem adição de lipídios, no entanto, a suplementação lipídica teve pouco ou nenhum efeito sobre estes parâmetros, quando fornecida a animais defaunados (BROUDISCOU et al., 1994; VAN NEVEL et al., 1993).

Van Nevel & Demeyer (1981) sugeriram que a suplementação lipídica teria dois efeitos sobre a síntese microbiana, e esses efeitos seriam antagonistas: um efeito negativo sobre o metabolismo microbiano se opondo ao favorável efeito da defaunação sobre a síntese de biomassa microbiana e que a resposta da suplementação lipídica sobre síntese de Pmic dependeria do efeito líquido destes dois fatores.

A redução da concentração de nitrogênio amoniacal (NH_3) tem sido considerada o efeito mais consistente da suplementação lipídica, atribuído à redução dos protozoários. Além de sua atividade proteolítica, grande parte dos protozoários do rúmen utilizam a bactéria, por eles engolfadas, como fonte de compostos nitrogenados, no entanto, de forma ineficiente, liberando grande quantidade de aminoácidos e NH_3 no rúmen (LENG e NOLAN, 1984).

Por outro lado, a infusão de 300 mL de óleo de soja no rúmen, não reduziu a concentração de NH_3 no rúmen (KRYSL et al., 1991), ou o fornecimento de sabão de cálcio ou a mistura de fontes vegetal e animal de lipídios (OHAJURUKA et al., 1991). No entanto, nestes trabalhos não foram avaliadas as concentrações de protozoários.

2.4. Métodos para estimar a síntese microbiana

A proteína microbiana representa a principal fonte de aminoácidos para os ruminante, com alto valor biológico (CLARK et al., 1992) e digestibilidade (NRC, 1996), e sua estimativa tem sido utilizada para determinar as exigências proteicas

dos ruminantes em sistemas de avaliação de proteína adotados em diversos países, de modo que, sua determinação torna-se importante.

As principais técnicas utilizadas para quantificar a proteína microbiana presente na digesta deixando o rúmen são baseadas na determinação de marcadores químicos, os quais podem ser classificados como internos e externos (STERN & HOOVER, 1979). Os marcadores internos utilizados são compostos químicos característico dos microrganismos (ácido 2,6-diaminoplnélico DAPA). Os marcadores externos são adicionados no rúmen para marcar os microrganismos (^{15}N , ^{35}S e ^{32}P) (BRODERICK e MERCHEN, 1992). No entanto, este método requer animais fistulados e é laborioso, o que dificulta o seu uso rotineiro.

O método baseado na excreção DP na urina foi proposto após observações de que fornecimento de fontes de proteína elevava a excreção de alantoína em carneiros (BLAXTER e MARTIN, 1962) e bovinos (ELLIOT e TOPPS, 1963), e que a excreção de alantoína na urina foi correlacionada com a concentração de ácidos nucleicos no rúmen (TOPPS e ELLIOT, 1965).

Chen & Gomes (1992) propuseram dois modelos, um para ovinos e outro para bovinos, para calcular o fluxo de N microbiano a partir da excreção de DP urina. Este método assume que todo ácido nucléico de origem dietética é degradado no rúmen, e que o fluxo duodenal de ácido nucléico é essencialmente de origem microbiana e que, após digestão intestinal, as bases purinas (adenina e guanina) são catabolizadas e excretadas na urina como seus derivados proporcionalmente à quantidade absorvidas. Após correção da contribuição endógena para a excreção de DP e recuperação de purinas absorvidas como DP na urina (VERBIC et al., 1990), o fluxo de N microbiano para o duodeno seria estimado a partir da quantidade de purina absorvida, obtida por meio da excreção urinária de DP e do conhecimento prévio da relação N-purina:N-total na massa microbiana (CHEN e GOMES, 1992).

Em bovinos as concentrações urinárias de hipoxantina e xantina são irrisórias, devido à alta atividade da enzima xantina oxidase presente em vários tecidos, incluindo o plasma, o que converte hipoxantina e xantina em ácido úrico (CHEN et al., 1990), de modo que, a estimativa da excreção urinária de DP, para bovinos, pode ser baseada na determinação das excreções de alantoína e ácido úrico. (RENNÓ et al., 2000).

Trabalhos comparando o método baseado na excreção de DP com os métodos tradicionais não mostraram diferença no fluxo de N microbiano (PÉREZ, et al., 1997; RENNÓ et al., 2000; GONZA'LEZ-RONQUILLO et al., 2004), o que permitiu aos autores concluir que o método baseado na excreção de DP fornece valores confiáveis do fluxo de N microbiano e constitui um método não invasivo para prever a produção microbiana. No entanto, o método baseado na excreção de DP, implica na coleta total de urina para quantificar a excreção diária de DP, sendo recomendadas coletas por vários dias consecutivos para reduzir a variação na produção de urina (CHEN & GOMES, 1992). Entretanto, amostras representativas de urina podem ser obtidas em coletas de 24 horas (VALADERES et al., 1997; BARBOSA et al., 2006; LEAL et al., 2007).

Na tentativa de simplificar a obtenção de dados e permitir seu uso a campo, a creatinina excretada na urina tem sido utilizada como um indicador interno para estimar o volume urinário total. A creatinina é um metabólito formado no tecido muscular pela remoção não enzimática e irreversível de água, o qual origina do metabolismo dos aminoácidos (HAPPER et al., 1982), apresenta excreção relativamente constante (FUJIHARA et al., 1987) e em função do peso vivo (VAGNONI et al., 1997). Desta forma, o volume urinário pode ser obtido por meio da concentração de creatinina na amostra *spot*, desde que, seja conhecida a excreção diária de creatinina por unidade de peso do animal, permitindo quantificar a excreção diária de DP sem coleta total de urina (VALADARES et al., 1999).

A amostra *spot* de urina tem se mostrado capaz de estimar satisfatoriamente o volume urinário, não apresentando diferença ao volume urinário obtido pela coleta total, 24 horas (OLIVEIRA et al., 2001; SILVA et al., 2001; CHIZZOTTI et al., 2007). No entanto, diferenças significativas foram observadas entre o volume urinário estimado e o obtido (CHIZZOTTI et al., 2006; RENNÓ et al., 2008). Contudo, apesar da diferença 14,61 (CHIZZOTTI et al., 2006) e 5,96 L (RENNÓ et al., 2008) entre o volume estimado e o observado, os autores não observaram diferenças na excreção de DP e, conseqüentemente, na síntese de N microbiano entre as diferentes metodologias.

O método baseado na amostra *spot* parte dos seguintes pressupostos: existe pouca variação durante o dia nas concentrações de DP na urina; a concentração de DP na amostra *spot* reflete a excreção média diária de DP na urina e, por

desconhecer o volume urinário, assume que a taxa de excreção de creatinina é relativamente constante (CHEN et al., 1995).

Em estudos onde coletas de urina foram tomadas por dias consecutivos e em pequenos intervalos de tempo, flutuações na excreção de alantoína na urina de novilhos alimentados uma ou duas vezes ao dia foram observados (CHEN et al., 1992). Shingfield e Offer (1998) observaram diferenças na excreção de creatinina entre vacas, dias e horários de coleta, o qual, segundo os autores inviabiliza o uso da excreção de creatinina para estimar o volume urinário, sendo necessária coleta total para avaliar com mais acurácia a excreção de DP na urina.

Segundo Kozloski et al. (2005), a estimativa da produção urinária, com base na concentração de creatinina em amostras *spot* de urina, poderia ser confiável se, amostras pontuais fossem coletadas em diferentes horários para constituir uma amostra composta representativa de um ciclo de 24 horas, devido as variações na concentração de creatinina ao longo do dia. Excreções médias de creatinina durante o período de 17:00 às 05:00 tendem a ser 5% maiores do no período de 05:00 às 17:00 horas (VALADARES et al., 1999).

A estimativa de volume urinário com base em amostras *spot* utiliza dados de outros experimentos para calcular a excreção diária de creatinina, no entanto, predições podem ser confundidas quando a dieta influência na excreção de creatinina, podendo estar sujeito a erros de > 10% entre dietas (FAICHNEY et al., 1995). Aumento de 5% na excreção de creatinina foi observado para vacas recebendo dietas com 50% concentrado a base de milho grão úmido, em relação às dietas com 20 e 35% de concentrado (VALADARES et al., 1999).

No entanto, Barbosa et al. (2006), não observaram diferenças na excreção de creatinina expressa mg/kg PV, mg/kg PV^{0,75} e mmol/kg PV^{0,75}, obtidas em função dos níveis de concentrado, diferentes categorias de bovinos da raça Nelore e dos dias de coleta. De forma semelhante, Ítavo et al. (2004), não observaram efeito de diferentes níveis de concentrado contendo 32% de N na forma de NNP sobre a excreção de creatinina em novilhos. A excreção de creatinina não foi afetada pela porcentagem de proteína bruta da dieta e foi proporcional ao peso corporal em estudo com bovinos de diferentes grupos genéticos (RENNÓ, et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no setor de Bovinocultura de Corte, da Unidade de Apoio a Pesquisa em Zootecnia (UAPZ), do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, no período de Junho a Outubro de 2012.

Foram utilizados oito novilhos mestiços fistulados no rúmen, com peso vivo médio inicial de 300 kg, mantidos em baias individuais, parcialmente cobertas, com piso de concreto, dotadas de bebedouros e cocho. Os animais foram vermifugados e passaram por um período pré-experimental para adaptação às instalações e condições experimentais. Neste período todos os animais receberam a mesma alimentação, constituída de silagem de milho e ração concentrada, contendo milho e farelo de soja.

Após o período de adaptação, os animais foram alocados, aleatoriamente, em dois quadrados latinos 4x4 balanceados, compreendendo quatro animais, quatro tratamentos e quatro períodos, os quais foram conduzidos simultaneamente.

Os tratamentos compreenderam:

T1 - Silagem de Milho;

T2 - Ração constituída de 70% de silagem de milho e 30% de concentrado, na matéria seca (MS);

T3 - Ração constituída, na MS, de 70% de silagem de milho e 30% de concentrado, contendo 5% de lipídeos, com adição de lipídeos na forma de óleo de soja;

T4 - Ração constituída, na MS, de 70% de silagem de milho e 30% de concentrado, contendo 5% de lipídeos, com adição de lipídeos na forma de soja grão moída.

O arraçoamento foi realizado duas vezes ao dia, em porções iguais, as 08:00 e 16:00 horas, na forma de mistura completa, procurando-se manter as sobras em torno de 5% para garantir o consumo alimentar *ad libitum*. O concentrado foi manualmente misturado à silagem no momento do arraçoamento. O consumo foi obtido pela diferença entre o fornecido e as sobras, sendo as sobras pesadas diariamente e 10% do seu peso amostrado para posterior análise. Na Tabela 1 e 2 pode-se visualizar a proporção dos ingredientes e a composição das dietas experimentais, respectivamente.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas rações experimentais.

Composição	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
	%MS			
Silagem de milho	100,00	70,00	70,00	70,00
Soja grão	-	-	-	16,43
Milho	-	16,88	13,12	13,02
Óleo de Soja	-	-	3,10	-
Calcário	-	0,59	0,57	0,55
Farelo de Soja	-	12,53	13,21	-

Tabela 2 – Teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e fibra detergente neutro (FDN) das dietas experimentais.

Item	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
MS	31,63	46,85	48,84	47,37
	%MS			
MO	84,50	85,52	85,66	85,88
PB	6,95	12,57	12,04	12,21
EE	1,60	1,77	5,0	5,0
FDN	54,22	40,46	41,39	39,92

Os períodos experimentais tiveram duração dezoito dias, sendo os catorze primeiros dias à adaptação dos animais, sendo as coletas de dados realizadas nos quatro últimos dias.

No início de cada período de coleta, foram realizadas as pesagens dos animais e coletas de sangue. As amostras de sangue foram obtidas quatro horas

após o arraçoamento matinal, via punção na veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos, obtendo-se o soro sanguíneo, o qual foi armazenado a -15°C, para posterior análise de ureia.

No 16º e 17º dia de cada período experimental foram realizadas as coletas totais de urina e fezes, por 24 horas. As coletas de urina executadas no período 24 horas foram obtidas utilizando-se funis coletores adaptados aos animais. Mangueiras de borracha, acopladas aos funis, conduziram a urina até recipientes plásticos contendo 200 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 20%. Ao término de cada período de 24 horas, a urina produzida era devidamente mensurada, homogeneizada e filtrada em papel de filtro e, em seguida, eram obtidas duas amostras de urina: uma com volume de 10 mL, diluída com 40 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 0,036 N e a outra, com aproximadamente 50 mL, sem diluição, sendo ambas identificadas e armazenadas em frascos plásticos a - 15 °C para posteriores análises de creatinina, ureia, alantoína e ácido úrico.

Simultaneamente as coletas de urina, foram realizadas as coletas de fezes. As amostras obtidas por defecção espontânea eram coletadas e armazenadas em sacos plásticos. Ao final de cada período de 24 horas, as amostras eram pesadas, homogeneizadas, retirando-se amostras correspondentes a 2% do peso total, que eram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C e armazenadas, para posterior análise de N nas fezes.

Amostras *spot* de urina foram obtidas nos dias de coleta total de urina, quatro horas após o arraçoamento matinal. Para tal, a urina proveniente dos funis coletores era direcionada, manualmente, a recipientes de plástico e foram processadas da mesma forma que as amostras referentes às coletas totais de 24 horas.

No 18º dia, foram realizadas as coletas de líquido ruminal, para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH₃), antes e duas, quatro, seis e oito horas após arraçoamento matinal. As amostras de líquido ruminal, após a coleta, foram filtradas em camada tripla de gazes e acondicionadas em frascos plásticos contendo 1 mL de solução de ácido sulfúrico (1:1) e armazenadas -20°C para posterior determinação do N-NH₃, mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, conforme técnica de FENNER (1965), adaptada e descrita por VIEIRA (1980).

As estimativas do fluxo de nitrogênio microbiano foram obtidas por meio da absorção intestinal de purinas (X, mmol/dia), estimada com base na excreção dos derivados de purina (Y, mmol/dia) e no peso metabólico ($PV^{0,75}$), de acordo com a equação (VERBIC et al., 1990):

$$X = \frac{Y - 0,385PV^{0,75}}{0,85}$$

em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina urinários; e $0,385 PV^{0,75}$ corresponde à contribuição endógena para a excreção de urina.

O fluxo intestinal de compostos nitrogenados (N) de origem microbiana (Y, mmol/dia) foi estimado em função das purinas microbianas absorvidas (X, mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN & GOMES, 1992):

$$Y = \frac{70X}{0,83 * 0,116 * 1000}$$

em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas ($mg\ N.mmol^{-1}$); 0,83 corresponde a digestibilidade das purinas microbianas; e 0,116 é a relação N-RNA:N nas bactérias.

O volume urinário (L), estimado a partir das amostras *spot* foi calculado a partir da concentração de creatinina na amostra *spot* de urina (mg/L) e da quantidade de creatinina excretada diariamente em mg/KgPV:

$$Vol\ (L) = \frac{PV(Kg) * excreção\ de\ creatinina\ (mg.\ KgPV^{-1})}{concentração\ de\ creatina\ (mg.L^{-1})}$$

Para fins de comparação, a excreções diária de creatinina (EC), foi estimada de três formas, sendo elas:

- A partir do produto do volume total e da concentração de creatinina da coleta total;
- Por meio de equações propostas na literatura:
 - CHIZZOTTI et al. (2004):

$$EC(\text{mg/kgPV}) = 32,27 - 0,01093PV$$
 - SILVA et al. (2012):

$$EC (g/dia) = 0,0345 * PV^{0,9491}$$

As análises de ureia no plasma, de creatinina, ácido úrico e ureia na urina foram realizadas utilizando-se *kits* comerciais (Labtest), segundo orientações dos fabricantes. As análises de alantoína na urina foram feitas pelo método colorimétrico proposto por FUJIHARA et al.(1987), descrito por CHEN & GOMES (1992).

As amostras de silagem de milho e concentrados fornecidos, sobras e fezes foram avaliadas quanto aos teores de MS (AOAC 967.03; AOAC, 1990), matéria orgânica (MO), PB (THIEX et al., 2002), gordura bruta (GB) (AOAC 2003.06; THIEX et al., 2003), fibra em detergente neutro (FDN) (AOAC 2002.04, MERTENS, 2002).

As análises estatísticas referentes ao volume urinário diário e excreções urinárias diárias de creatinina, alantoína, ácido úrico, derivados de purina, ureia, absorções diárias de derivados de purina, compostos nitrogenados microbianos e eficiência microbiana, foram realizadas utilizando-se o procedimento Proc Mixed dos SAS para medidas repetidas (dia alinhado em período). O modelo incluiu os efeitos de quadrado latino, tratamento, período, dia dentro de período e as interações tratamento x quadrado latino e quadrado latino x período.

Foram testadas as estruturas de covariância autoregressiva AR (1) e simetria composta (CS), sendo adotada a estrutura AR (1), com base nos critérios de informação: AIC, AICC, BIC e -2 Res Log Likelihood.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os valores médios do volume urinário (L) observado, obtido por meio de coleta total de urina, por 24 horas, e os volumes urinários (L) estimados por meio de equações propostas na literatura são apresentados na Tabela 3.

Tabelas 3 - Médias e intervalos de confiança (95%) para volumes urinários diários (L) e nitrogênio microbiano (g/dia) observados (OBS) e estimados (EST), por tratamento.

Variáveis	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
	Volume urinário (L)			
OBS	5,51±1,51aB	4,81±1,54aB	5,40±1,52aB	5,90±1,52aB
EST-ExR ¹	9,67±3,17aA	9,12±2,72aA	8,57±2,89aA	8,86±2,93aA
EST- I ²	13,37±6,01aA	11,65±5,33aA	13,24±5,51aA	12,71±5,52aA
EST- II ³	11,37±5,52aA	10,59±4,85aA	11,92±5,02aA	11,47±4,99aA

Médias seguidas por letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas diferem entre si, de acordo com intervalo de confiança, ao nível de 95%

¹ Estimado partir da concentração de creatinina na amostra spot e da excreção diária de creatinina obtida no experimento, por coleta total de urina

² Equação I proposta por Chizzotti et al. (2004): $EC(mg/KgPV)=32,27-0,01093PV$

³ Equação II proposta por Silva et al. (2012): $EC(g/dia)= 0,0345xPV^{0,9491}$

No método baseado na amostra *spot* (Tabela 3), o volume urinário diário foi estimado utilizando-se a fórmula: volume urinário = excreção diária de creatinina / concentração de creatinina na amostra spot. No presente trabalho, a excreção diária de creatinina foi obtida de diferentes formas, sendo elas: a partir do produto entre o volume urinário e a concentração de creatinina na coleta de urina total (Estimado-ExR) ou por meio de equações (Estimado I e II).

Verifica-se na Tabela 3 que o volume estimado de urina com base na amostra spot, mesmo partindo-se da excreção real de creatinina (Estimado-ExR), diferiu ($P<0,05$) do volume real observado em 24 horas de coleta, para os quatro tratamentos. Isto indica que as concentrações de creatinina nas amostras *spot* não

foram iguais à sua concentração na urina obtida por coleta total. Caso as concentrações de creatinina nas amostras *spot* fossem iguais à concentração real, verificada na urina obtida por coleta total, os volumes urinários estimados para os diferentes tratamentos seriam exatamente iguais aos aferidos por coleta total.

A metodologia da amostra *spot* baseia-se na concentração de creatinina na amostra *spot*, como representativa de sua concentração na urina total excretada em 24 horas, e na estimativa da excreção diária de creatinina, em função do peso vivo do animal, com base em equações desenvolvidas por diferentes autores, que pressupõe que a excreção de creatinina, por kg de peso vivo, é constante ou pode ter apenas ligeira variação, em função do conteúdo corporal de proteína (quantidade de músculos) do animal.

Variações aleatórias na concentração de creatinina na amostra *spot* e possíveis variações na excreção de creatinina, por kg de peso vivo, seriam, portanto, fontes de erro incontroláveis, que impediriam a correta estimativa do volume de urina excretado. Essas duas fontes de erro podem explicar a grande diferença ($P < 0,05$) observada entre os valores de excreção urinária observados por coleta total e os valores estimados utilizando-se as equações de Chizzotti et al (2004) e Silva et al. (2012), neste trabalho (Tabela 3). Como se verifica, os valores estimados, na maioria dos casos, correspondem a mais de duas vezes os valores observados por coleta total.

Valadares et al. (1999), Silva et al. (2001), Oliveira et al. (2001) e Chizzotti et al. (2007), sugeriram o uso da amostra *spot* para estimar a excreções de compostos nitrogenados na urina, alegando não terem encontrado diferenças entre o volume urinário estimado por meio da amostra *spot* e o determinado por coleta total de urina durante 24 horas. Deve-se ressaltar, entretanto, que, nos referidos trabalhos, a excreção diária de creatinina, utilizada para estimar o volume urinário a partir de amostras *spot* de urina, não foi estimada por meio de equações, mas sim determinada por meio de coleta total de urina, como o produto do volume urinário excretado em 24 horas, determinado em cada pesquisa, pela concentração de creatinina observada na amostra total.

O uso da excreção diária de creatinina, obtida por meio de coleta total, nos citados trabalhos, para estimar o volume urinário, descaracteriza o método baseado na amostra *spot*, o qual foi proposto para substituir a coleta total de urina (CHEN et

al. 1992), além de gerar estimativas de volume urinário artificialmente mais próximas do volume real que aquelas obtidas quando se emprega com fidelidade o método de amostragem *spot*, por eliminar a fonte de erro representada pelas variações entre animais na excreção de creatinina por kg de peso vivo, em relação aos valores médios adotados para se estimar a excreção diária de creatinina por cada animal.

A adoção da amostra *spot*, baseado em resultados obtidos parcialmente por coleta total, pode conduzir a resultados errôneos, ao se estimar a excreção diária de creatinina por meio de equações proposta na literatura.

O uso de equações obtidas em experimentos diferentes para estimar a excreção diária de creatinina pode ser feita, se for válido presumir que a excreção de creatinina é constante, em função do peso vivo e não é afetada pela dieta (FAICHNEY et al. 1995).

A creatinina é oriunda do metabolismo proteico do tecido muscular e excretada proporcionalmente à quantidade deste tecido no corpo do animal (SCHUTTE et al., 1981). Devido ao fato dos animais apresentarem proporções diferentes de tecidos em cada estágio de desenvolvimento, é possível que haja variações nas excreções diárias de creatinina expressas em função do peso vivo do animal.

Kozloski et al. (2005), ao avaliarem as excreções totais de creatinina em ovinos, obtidas em quatro experimentos, não observaram diferenças na excreção de creatinina, por unidade de peso vivo, entre animais de mesmo experimento, mas observaram diferença na excreção entre experimentos e animais e concluíram que a estimativa da excreção diária de creatinina, com base em experimentos diferentes, pode resultar em erros significativos na estimativa da produção urinária dos animais.

Em experimento em quadrado latino, com vacas multíparas com peso vivo (PV) médio de $611 \pm 67,5$ Kg, Shingfield e Offer (1998), observaram diferenças significativas entre vacas em relação à excreção de creatinina.

Por outro lado, Barbosa et al. (2006), ao avaliarem a excreção de creatinina em animais Nelore de diferentes categorias, novilhas, machos castrados, machos inteiros e vacas com 243, 265, 226 e 467Kg de peso vivo, respectivamente, não observaram influência da categoria animal sobre a excreção de creatinina obtendo valor médio de 27 mg/KgPV. Rennó et al. (2000), observaram excreções de creatinina de 30,31, 32,57, 21,57 e 24,98mg/Kg de PV, em bovinos F1 Limousin x

Nelore (268KgPV), F1 Limousin x Nelore (279KgPV), F1 Simental x Nelore (300Kg) e novilhos Nelore (300KgPV), respectivamente, as quais, segundo os autores, foram proporcionais ao PV (animais menores apresentaram maior excreção por unidade de peso vivo, por terem maior proporção de tecido muscular). Os autores encontraram o valor médio diário de 27,36mg/KgPV para os diferentes grupos genéticos. Entretanto, os resultados mostram claramente que a excreção de creatinina, por unidade de peso vivo, não pode ser representada por um valor constante, para animais de diferentes grupos genéticos ou categorias, o que levanta dúvida sobre a possibilidade de se utilizar valores de excreção de creatinina obtidos em um determinado experimento em experimentos diferentes.

Vários autores têm relatado que a excreção de creatinina é pouco afetada pela dieta (SUSMEL et al. 1994; VAGNONI et al. 1997; BARBOSA et al., 2006; RENNÓ et al. 2000). Entretanto, efeitos da dieta sobre a excreção de creatinina também foram relatados na literatura (FAICHNEY et al. 1995). Valadares et al. (1999), observaram efeito significativo do nível de concentrado, tanto na taxa de excreção de creatinina, quanto na excreção de creatinina em mg/KgPV, em coletas de urina realizadas em intervalos de 12 horas (17:00 às 05:00 horas), sendo a excreção média geral cerca de 5% maior em vacas consumindo dieta contendo 50% de concentrado, do que naquelas consumindo dietas com 20 e 35% de concentrado.

CHIZZOTTI et al. (2004) observaram que a excreção de creatinina em animais em crescimento foi variável, e recomendaram o uso da seguinte equação: excreção de creatinina(mg/KgPV) = $32,27 - 0,01093 * PV$, para estimar a excreção de creatinina em função do peso vivo em Kg. Posteriormente, esta equação foi utilizada para estimar o volume urinário dos mesmos animais dos quais ela foi obtida (CHIZZOTTI et al. 2006), no entanto, houve diferença de 14,67 litros entre os valores observados e estimados (17,61 e 32,28 litros para valor observado e estimado, respectivamente). Rennó et al. (2000), também observaram diferenças significativas entre o volume urinário estimado e observado. No entanto, neste trabalho não foi esclarecido se, ao se estimar o volume urinário, a partir da amostra *spot*, estimou-se a excreção de creatinina por meio equações ou se se utilizou a excreção diária de creatinina observada no próprio experimento.

Conforme salientado anteriormente, no presente experimento, o uso da excreção diária de creatinina, obtida pela coleta total, para estimar o volume urinário em amostras *spot* não impediu que fossem observadas diferenças ($P < 0,05$) entre o volume obtido e o estimado (Tabela 3).

O uso de amostras *spot* de urina também requer que as concentrações de creatinina e derivados de purina (DP) na amostras *spot* representem o valor médio diário de excreção de creatinina e DP e que exista pouca variação na sua excreção ao longo do dia (CHEN et al., 1995).

Valadares et al. (1999) observaram que a excreção média de creatinina em vacas, durante o período de 17:00 às 05:00, foi 5% maior que no período de 05:00 às 17:00 horas. Concentrações mais elevadas durante a madrugada e pela manhã, e mais baixas à tarde e início da noite, também foram observadas em ovinos (Kozloski et al., 2005). Também Shingfield e Offer (1998) observaram que as concentrações de creatinina verificadas em amostras pontuais, a cada duas horas, durante um período de 24 horas, diferiram entre animais e horas de coleta.

Neste experimento, a coleta de amostra *spot* foi realizada 4 horas após o arraçoamento matinal, entre 12:00 e 13:00 horas, o que, possivelmente pode ter superestimado o volume urinário, visto que nesse horário a concentração de creatinina na urina é baixa (VALADARES et al, 1999, KOZLOSKI et al. 2005). CHEN et al. (1992), sugeriram horário de 15:00 à 20:00 horas para obter amostras de urina, pois neste intervalo, tanto a concentração de creatinina e alantoína na amostra de urina, tiveram melhor correlação e se aproximaram da média diária excretada.

Desta forma, diferenças observadas neste estudo, entre o volume urinário e estimado, pode ser atribuído à introdução de erro ao utilizar equações obtidas em outros experimentos para estimar a excreção diária de creatinina e, também a possíveis diferenças na concentração de creatinina na amostra *spot* de urina.

O volume urinário em amostras *spot* de urina é estimado para que, a partir dele, possa se determinar as excreções diárias de DP e, por conseguinte, a síntese microbiana. Como uma consequência dos valores urinários obtidos por meio de estimativas na presente pesquisa, a síntese microbiana representada por N_{mic} na Tabela 4, foi superestimada e apresentou valores pouco precisos, conforme indicado pelos intervalos de confiança.

Tabelas 4 - Médias e intervalos de confiança (95%) para nitrogênio microbiano (g/dia) observado (OBS) e estimado (EST), por tratamento.

Variáveis	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
	Nitrogênio microbiano (g/dia)			
OBS	30,3±5,5b	55,2±5,5a	57,4±5,5a	52,2±5,6a
EST-ExR ¹	97,2±97,2a	132,7±87,1a	84,1±84,1a	88,5±88,5a
EST- I ²	135,2±118,3a	157,4±102,7a	122,2±107,5a	140,6±107,8a
EST- II ³	127,1±112,8a	141,8±95,5a	110,8±99,4a	127,8±99,9a

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, de acordo com intervalo de confiança, ao nível de 95%

¹ Estimado partir da concentração de creatinina na amostra spot e da excreção diária de creatinina obtida no experimento, por coleta total de urina

² Equação I proposta por Chizzotti et al. (2004): $EC(mg/KgPV)=32,27-0,01093PV$

³ Equação II proposta por Silva et al. (2012): $EC(g/dia)= 0,0345xPV^{0,9491}$

Variações nas concentrações de DP na amostra *spot*, ao longo do dia, foram também relatadas por Chen et al. (1992). Baixa correlação entre a excreção diária de DP e a concentração de DP em amostras spot coletadas em intervalos de 6 horas foram também observadas por George et al. (2011) e por Nsahlai et al. (2000).

A quantidade de bases púricas microbianas que chegam ao intestino delgado dos ruminantes depende do balanço entre síntese e degradação de proteína microbiana no rúmen, sendo que, para um dado alimento, a quantidade de proteína microbiana é dependente do consumo, taxa de digestão e passagem. Desta forma, a transferência de bases púricas microbianas para o intestino delgado e, conseqüentemente, a excreção de DP na urina, pode não ser constante ao longo do dia.

Chen et al. (1992), sugeriram o uso da creatinina para ajustar a variação da concentração de DP na urina, por meio de índice $[DP,mmol]:[creatinina, mmol]*PV^{0,75}$. No entanto, segundo os mesmo autores, a desvantagem desta expressão está na própria variabilidade observada para a excreção de creatinina,

entre animais e dias, a qual seria inevitavelmente adicionada a esta relação. Ainda segundo Chen et al. (1995), o uso de amostras *spot* poderia não ter sensibilidade suficiente para comparar tratamentos, caso exista entre eles pouca diferença na passagem de proteína microbiana para o intestino delgado.

Com base nos resultados obtidos neste experimento e com base no que foi discutido, fica claro que, para a obtenção de resultados mais precisos referentes à excreção de DP, com a finalidade de se estimar a síntese de proteína microbiana, faz-se necessário à coleta total de urina.

Chen e Gomes (1992) recomendaram períodos de mais de cinco dias de coleta de urina para se obter uma medida mais realista da excreção de DP na urina.

Conforme observado na Tabela 5, a excreção de creatinina neste experimento, não foi afetada pelo tratamento ($P>0,05$). Apesar de não demonstrada na tabela, não houve também efeito ($P>0,05$) do dia de coleta sobre a excreção de creatinina.

A ausência de efeito de dias de coleta sobre a excreção diária de creatinina está de acordo com as observações descritas por Valadares et al. (1997) e Barbosa et al. (2006), que não encontraram diferenças nas excreções de creatinina obtidas durante 12, 24, 48 ou 72 horas de coleta e por seis dias consecutivos, respectivamente, os quais concluíram que amostras representativas de urina podem ser obtidas em período de coleta de 24 horas.

Tabela 5 – Médias, erro padrão (EP) e níveis de probabilidade para excreções de creatinina em mg/KgPV e mg/ PV^{0,75} para bovinos suplementados ou não com diferentes fontes lipídicas.

	Tratamentos				EP	Contrastes		
	T1	T2	T3	T4		C1	C2	C3
mg/KgPV	21,59	20,68	21,52	20,21	1,01	0,4328	0,8606	0,2898
mg/ PV ^{0,75}	96,88	88,12	92,71	85,58	4,94	0,1023	0,8258	0,1945

T1= silagem de milho (SM); T2= SM + concentrado (CON); T3 = SM + CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de óleo de soja; T4= SM+ CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de soja grão moída.

C1= T1 vs os demais tratamentos; C2=T2 vs T3 e T4, C3= T3 vs T4.

Desta forma, recomenda-se o uso de coletas totais de urina, por 24 horas, para se estimar a síntese de proteína microbiana com base na excreção urinária de DP.

Uma vez que, houve diferenças significativas no volume urinário obtido por amostra spot e coleta total, as informações referentes à excreção de DP, síntese de proteína microbiana e balanço nitrogênio, serão discutidos com base nos resultados obtidos por meio de coleta total de urina.

Os valores médios obtidos para as excreções urinárias de alantoína (ALA), ácido úrico (AcU) e derivados de purina (DP), purinas absorvidas (Pabs), relação alantoína:derivados de purina (ALA/DP), nitrogênio microbiano (Nmic), carboidratos degradados no rúmen (CHODR), eficiência microbiana (Emic) e concentração de amônia no rúmen (N-NH₃) são apresentados na Tabela 6.

O contraste C1 indicou que, para as variáveis ALA, AuC, DP, Pabs, Nmic, CHODR e Emic o tratamento T1, silagem de milho, foi inferior aos demais tratamentos (P<0,05).

Os DP excretados na urina têm origem da absorção tanto dos ácidos nucleicos microbianos, como também, dos ácidos nucleicos do próprio tecido dos ruminantes, sendo este último chamado de fração endógena (CHEN & GOMES, 1992). A contribuição da fração endógena é pequena e sua participação declina quando a contribuição dos ácidos nucleicos microbianos aumenta. De acordo com observações de Verbic et al. (1990), quando a excreção de DP é acima de 35 mmol/dia, a excreção de DP na urina seria linearmente correlacionada com a absorção de ácidos nucleicos microbianos. Neste sentido, diferenças observadas entre tratamentos neste experimento, não poderiam ser atribuídas à maior contribuição da fração endógena, uma vez que, em todos os tratamentos, as excreções de DP foram acima de 35 mmol/dia, mas sim, a diferenças na taxa de síntese microbiana.

No entanto, não houve diferença (P>0,05) quanto à relação ALA/DP entre os tratamentos, com valores entre 88,16 e 89,53%. A contribuição da alantoína para o total de DP excretados na urina tem se mostrado constante, tanto em novilhos (VERBIC et al., 1990) como em vacas (VAGONONI et al., 1997), independente do fluxo de purinas. Os valores observados neste experimento foram superiores aos

mencionados por Chen e Gomes (1992) de 80-85% para bovinos. Por outro lado inferior ao valor de 93,2% observados por De Boever et al. (1998).

A disponibilidade de energia e nitrogênio são os principais fatores dietéticos limitando a síntese microbiana (CLARK et al., 1992). Desta forma, maiores sínteses de Nmic observadas para os tratamentos T2, T3 e T4, em relação ao T1, podem ser atribuídas aos maiores consumos ($P < 0,05$) observados de matéria orgânica (CMO) e proteína (CPB), conforme indicado pelo contraste C1 (Tabela 7), elevando a quantidade de substratos disponíveis para a fermentação ruminal.

Tabela 6 – Médias, erro padrão (EP) e níveis de probabilidade para excreções de alantoína (ALA), ácido úrico (AcU), derivados de purina (DP) obtidos na coleta total de urina, purinas absorvidas (Pabs), porcentagem de alantoína (ALA/DP) nos DP, nitrogênio microbiano (Nmic), carboidratos degradados no rúmen (CHODR), eficiência microbiana (Emic) para bovinos suplementados ou não com diferentes fontes lipídicas.

Variáveis	Tratamentos				EP	Contrastes		
	T1	T2	T3	T4		C1	C2	C3
	mmol/dia							
ALA	59,29	83,20	86,97	80,88	3,28	0,0001	0,8426	0,1607
AcU	6,60	11,42	10,24	10,41	0,98	0,0006	0,2969	0,8907
DP	66,68	94,76	96,82	91,54	3,52	0,0001	0,8770	0,2384
Pabs	42,26	76,42	78,22	72,65	4,27	0,0001	0,8397	0,3085
	%							
ALA/DP	89,39	88,16	89,53	88,54	1,03	0,4540	0,3414	0,3566
	g/dia							
Nmic	30,27	55,23	57,37	52,20	2,64	0,0001	0,8851	0,1508
	kg/dia							
CHODR	1,72	2,61	2,38	2,35	0,13	0,0001	0,1534	0,8839
Emic ¹	17,58	21,19	24,59	22,25	1,25	0,0171	0,1444	0,1781

T1= silagem de milho (SM); T2= SM + concentrado (CON); T3 = SM + CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de óleo de soja; T4= SM+ CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de soja grão moída.

C1= T1 vs os demais tratamentos; C2=T2 vs T3 e T4, C3= T3 vs T4.

¹gNmic/Kg CHODR.

A produção de Nmic geralmente aumenta com o aumento da quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen (OWENS e GOETSCH, 1993). A adição de concentrado aumenta a quantidade de matéria orgânica (MODR) e carboidratos degradados no rúmen (CHODR) (LADEIRA et al., 1999; DIAS et al., 2000; TIBO et al., 2000). Desta forma, maior quantidade de matéria orgânica fermentescível foi fornecida ao se incluir concentrado energético à dieta a base de silagem de milho, estimularia a síntese de Nmic.

Vagnoni et al. (1997) observaram aumento de 54g Nmic/dia no fluxo de para vacas recebendo dieta a base de silagem de alfafa, quando a suplementação com milho grão úmido passou de 24 para 40%. Em dietas a base de silagem, maior parte do nitrogênio (N) encontram-se na forma de NNP (amônia, peptídeos e aminoácidos) que é rapidamente convertido em amônia no rúmen (SNIFFEN et al., 1992). A extensiva degradação ruminal do NNP pode exceder a disponibilidade de energia para a síntese de Nmic.

Estudos *in vitro* (HALL e HEREJK, 2001) e *in vivo* (OBA e ALLEN, 2003) têm demonstrado que carboidratos rapidamente disponíveis, como amido, são mais efetivos do que outros carboidratos em promover eficiente uso de proteína degradada no rúmen e síntese microbiana.

Segundo Clark et al. (1992), o fornecimento de dieta na forma de dieta total (forragem + concentrado) promove maior e mais eficiente síntese de Nmic do que concentrado ou forragem apenas. Uso mais eficiente da energia para a síntese de Nmic foi observado em ovinos recebendo dieta isoprotéicas suplementadas com iguais porções de amido de trigo e celulose, em relação às dietas suplementadas com amido ou celulose apenas (OFFER et al., 1978).

Desta forma, as maiores síntese de Nmic e Emic observadas para os tratamentos com suplementação energética (T2, T3 e T4) pode ser em parte atribuídas a maior disponibilidade de energia e ao padrão mais uniforme, ao longo do dia, de energia disponível, quando dietas a base de silagem foram suplementadas com concentrado.

Os resultados obtidos neste experimento estão em concordância com as observações de Sniffen e Robinson (1987), os quais afirmaram que o crescimento microbiano máximo é atingido com 70% de volumoso, devido às melhores condições

de pH, taxa de passagem e condições para a colonização microbiana das partículas alimentares.

Maior Emic tem sido observada para animais com maior consumo alimentar (ZINN e OWENS, 1983; ROBINSON et al., 1985,; CHEN et al., 1992; DEWHURST e WEBSTER, 1992; DJOUVINOV e TODOROV, 1994).

Tabela 7 – Médias, erro padrão (EP) e níveis de probabilidade para os consumos de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra detergente neutro (CFDN) para bovinos suplementados ou não com diferentes fontes

Variáveis	Tratamentos				EP	Contrastes		
	T1	T2	T3	T4		C1	C2	C3
	Consumo (kg)							
CMS	5,47	7,97	7,47	7,36	0,44	0,0005	0,3142	0,8637
CMO	4,95	7,33	6,86	6,83	0,15	0,0003	0,3308	0,9502
CPB	0,33	0,93	0,87	0,84	0,04	0,0001	0,1557	0,7119
CEE	0,07	0,14	0,37	0,36	0,01	0,0001	0,0001	0,6852
CFDN	3,08	3,31	3,13	3,02	0,20	0,7436	0,3533	0,7049

T1= silagem de milho (SM); T2= SM + concentrado (CON); T3 = SM + CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de óleo de soja; T4= SM+ CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de soja grão moída.

C1= T1 vs os demais tratamentos; C2=T2 vs T3 e T4, C3= T3 vs T4.

Aumento no consumo proporciona maior taxa de passagem (EVANS, 1981), com reduz o tempo de retenção dos microrganismos no rúmen e do custo de manutenção dos microrganismos (ISSACSON et al., 1974). A síntese microbiana está relacionada com a quantidade de substrato disponível e com a energia utilizada para a manutenção, que por sua vez, é função da exigência de manutenção e taxa de crescimento dos microrganismos (PIRT, 1965). Desta forma, o maior consumo de matéria seca ($P < 0,05$) para os tratamentos T2, T3 e T4, em relação ao T1, conforme indicado pelo contraste C1 (Tabela 7), pode ter aumentado a taxa de passagem,

reduzindo as exigências de manutenção, possibilitando uso mais eficiente da energia para o crescimento e, conseqüentemente, maior Emic para estes tratamentos.

As concentrações de N-NH₃ foram influenciadas quadraticamente pelos tempos de coleta (Tabela 8). As concentrações máximas estimadas nos pontos máximos foram 8,22 às 3,20, 17,14 às 2,10, 12,25 às 1,84 e 13,05mg/dL às 2,62 horas após alimentação para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

Tabela 8 - Médias, regressão, coeficientes de determinação (R²), e variação (CV) obtidos em função das concentrações de amônia nos tratamentos (Trat) T1, T2, T3 e T4.

Trat	[NH ₃] ¹	Regressão	R ²	CV%
T1	7,13b	$\hat{Y}=6,8642 + 0,8452*X - 0,1318*X^2$	0,42	29,16
T2	13,54a	$\hat{Y}=16,0244 + 1,0575X - 0,2510*X^2$	0,56	29,05
T3	9,90c	$\hat{Y}= 11,6636 + 0,6470X - 0,1758*X^2$	0,42	36,00
T4	11,08c	$\hat{Y}= 10,9301 + 1,5873*X - 0,3049*X^2$	0,52	28,63

¹ Valores seguidos com letras diferentes na coluna diferem entre si pelo Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

O comportamento quadrático da concentração de amônia está de acordo com observações anteriores, com valores máximos em torno de 2 a 3 horas após a alimentação (DelCURTO et al., 1990; CABRAL et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Apesar da silagem de milho ser rica em nitrogênio não proteico (CABRAL et al., 2000), que é rapidamente convertido em amônia no rúmen (SNIFFEN et al., 1992), máxima concentração de amônia no tratamento T1 foi obtida somente 3,02 horas após alimentação, valor este próximo ao observado por Cabral et al. (2008) de 3,55 horas.

Wholt et al. (1976), observaram que vacas recebendo dieta rica em concentrado tiveram menor consumo de proteína solúvel, no entanto, estas apresentaram maior concentração de amônia no rúmen, do que vacas consumindo deitas rica em silagem de alfafa com alto teor de proteína solúvel.

A degradação proteica no rúmen depende não só da solubilidade da proteína, como também, da atividade proteolítica dos microrganismos do rúmen. A proliferação de microrganismos ruminais amilolíticos, sabidamente mais proteolíticos do que os celulolíticos, é estimulada por dietas à base de cereais (SIDDONS e PARADINE, 1981). Desta forma, a atividade proteolítica dos microrganismos parece ser a explicação mais lógica para as diferenças observadas entre os tratamentos.

A menor concentração de amônia, tanto valor médio (Tabela 8), como estimada, foi observada para o tratamento T1, no entanto, foi superior ao valor mínimo de 5,0 mg/dL requerido para máxima síntese de Nmic (SATTER e SLYTER, 1974). Desta forma, pode-se inferir que a síntese microbiana para o tratamento T1, foi limitada pela disponibilidade de energia.

As concentrações de amônia neste experimento dão suporte a observações anteriores de que, a concentração de amônia no rúmen reflete o consumo de proteína bruta (ELLIOT e TOOPS, 1964; HAALAND et al., 1982). Desta forma, o menor consumo de proteína ($P < 0,05$), observado para o tratamento T1 explica a menor concentração de amônia neste tratamento.

Conforme indicado pelo contraste C2 (Tabela 7), o tratamento T2 não diferiu ($P > 0,05$) dos tratamentos com adição de lipídios (T3 e T4) em relação ao consumo de proteína, mas houve diferença significativa ($P < 0,05$) na concentração de amônia, com menor concentração observada para os tratamentos com adição de lipídios ($P < 0,05$), em relação ao tratamento T2 (Tabela 8).

Estudos anteriormente publicados também relataram redução na concentração de amônia ruminal, quando lipídios foram adicionados à dieta (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; JENKINS e FOTOUHI, 1990; BROUDISCOU et al., 1994; HRISTOV et al., 2004; KIRAN e MUTSVANGWA, 2010).

Comportamentos semelhantes ao observado neste experimento foram relatados por Doreau et al. (1991) e Bem Salem et al. (1993). Os autores observaram respectivamente, redução na concentração ruminal de amônia 2h5min e 3h horas após arraçoamento matinal com dietas contendo 5 ou 10% e 6,6% de óleo de colza, respectivamente.

A concentração de amônia no rúmen é o balanço entre 2 fontes: degradação de compostos nitrogenados, dietéticos e microbiano, e da hidrólise da ureia oriunda da reciclagem, e três saídas: incorporação na PBmic, absorção pela parede do

rúmen e fluxo para o duodeno (OWENS & BERGEN, 1983). Mudanças em algum desses fatores altera a concentração de NH_3 no rúmen.

Menor concentração de amônia ruminal em dietas com adição de lipídios não aparece ser atribuída a absorção de amônia, o qual é conhecido depender da concentração de amônia e do pH. Menor pH ruminal decresce absorção de amônia (OWENS e ZINN, 1988). Na maioria dos estudos, onde a concentração de amônia foi mensurada, a adição de lipídios não altera o pH (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; JENKINS e FOTOUHI, 1990; BROUDISCOU et al., 1994).

Em revisão realizada por Doreau e Ferlay (1995), eles observaram que a adição de lipídios não modifica a taxa de passagem de líquidos, de modo que o fluxo de amônia para o duodeno não é modificada.

Neste experimento, não houve diferença na síntese N_{mic} ($P > 0,05$) entre o tratamento T2 em relação ao T3 e T4, conseqüentemente, variações na concentração de amônia ruminal podem ser atribuídas a modificações na degradação de compostos nitrogenados no rúmen, proteína dietética e microbiana.

Os efeitos dos lipídios sobre a degradação da proteína dietética no rúmen ainda não estão muito claros, sendo relatados tanto decréscimos (JENKINS e FOTOUHI, 1990; JENKINS, 1987), ausência de efeito (ZINN, 1989; DOREAU et al., 1991) e aumento (BEM SALEM et al., 1993).

A redução na concentração de amônia, em função da adição de lipídios à dietas, tem sido atribuída principalmente à redução no número de protozoários. Os protozoários apresentam atividade proteolítica e são conhecidos como predadores, por engolfarem bactérias, de onde obtém sua fonte de nitrogênio. Desta forma, a redução da população de protozoários pode diminuir a concentração de amônia no rúmen, por reduzir a reciclagem de nitrogênio, em decorrência de menor predação das bactérias (KOENG et al., 2000), proporcionando maior síntese total e líquida de N_{mic} (DEMEYER e VAN NEVEL, 1979) e menor degradação da proteína dietética no rúmen.

Na presente pesquisa, não se pode afirmar que a menor concentração de amônia observada, em resposta à adição ao concentrado, estaria ligada à redução no número de protozoários, uma vez que estes não foram quantificados. Além disso, não há consistência nos resultados de pesquisas quanto ao efeito da suplementação lipídica sobre a degradação da proteína no rúmen, conforme discutido acima.

Não foi observado efeito da adição de lipídios ($P>0,05$), bem como, da forma com que os lipídios foram adicionados às dietas ($P>0,05$), sobre a Emic, conforme indicado pelos contrastes C1 e C2, respectivamente (Tabela 3).

Alguns autores (CZERKAWSKI et al., 1975; IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al., 1983; JENKINS e FOTOUHI et al., 1990), verificaram aumento da Emic com a adição de lipídios á dieta. Entretanto, trabalhos mais recentes demonstraram que a suplementação lipídica pode não afetar a Emic (DOREAU et al., 1991; OHAJURUKA et al., 1991; FERLAY et al., 1992; PALMQUIST et al., 1993; EIFERT et al., 2005; MESSANA et al., 2012).

Modificações na Emic estão, normalmente relacionadas ao decréscimo da digestão ruminal da MO e a distúrbios no ecossistema ruminal. Experimentos nos quais a Emic é aumentada pela suplementação lipídica geralmente mostram redução do número de protozoários no rúmen (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al., 1983). O aumento na Emic na ausência de protozoários é atribuído á menor reciclagem de nitrogênio no rúmen, a qual apresenta correlação negativa com Emic, uma vez que, a reciclagem aumenta a exigência de manança dos microrganismos (LENG e NOLAN, 1984). Divergindo dos autores anteriormente citados, Ohajuruka et al., (1991) e Messana et al.(2012), não verificaram redução no número de protozoários com a adição de lipídios e a Emic não foi afetada.

Ueda et al. (2003), ao avaliarem o efeito da adição de 3% de óleo de linhaça em dietas rica em volumoso (65:32) e rica em concentrado (35:62), observaram redução no número de protozoários somente dieta rica em concentrado. Messana et al. (2012), também não observaram efeito da adição de 2, 4 ou 6% de lipídio na forma de soja grão moída sobre o número de protozoários em dietas contendo 50% de concentrado. Com base nas citadas pesquisas pode-se inferir que o número de protozoários neste experimento, possivelmente, foi inalterada em função da alta relação volumoso:concentrado (70:30). Em dietas ricas em volumoso grande parte dos ácidos graxos estaria adsorvido sobre a superfície hidrofóbica da partícula de alimento, tornando o lipídio menos tóxico aos microrganismos por reduzir a interação entre lipídios e microrganismos (BEN SALEM et al., 1993).

Neste experimento a quantidade de carboidratos degradados no rúmen (CHODR) utilizada para calcular a Emic, foi obtida por meio de estimativa empregando-se equações propostas por Sniffen et al. (1992). Como as citadas

equações não contemplam possível redução na degradação dos carboidratos no rúmen, em função da adição de lipídios, o que pode aumentar o valor estimado da Emic, os valores encontrados de Emic no presente trabalho, para os tratamentos com adição de lipídio, pode ter sido subestimada.

No entanto, deve-se ressaltar que, a quantidade de Nmic alcançando o duodeno nesta pesquisa não foi afetada pela adição de lipídios. A quantidade de Nmic que atinge o duodeno dá informação mais segura sobre a quantidade de proteína microbiana sintetizada que a Emic, uma vez que a Emic expressa a relação entre síntese microbiana e degradação de carboidratos e esta relação pode ser elevada quando a degradação de carboidratos é baixa, sem que a síntese microbiana verificada seja alta. Conforme destacou Owens e Goetsch (1993), a produção microbiana, ou seja, a síntese de proteína microbiana, não deve ser confundida com a Emic, uma vez que a Emic é independente da produção, de modo, maior Emic não implica em maior produção e vice-versa. Ainda segundo os autores, se a meta é aumentar a síntese de proteína microbiana sintetizada e o seu fluxo para o duodeno, aumentar a quantidade de MO fermentada no rúmen parece ser mais frutífero do que tentar aumentar a Emic.

Os valores médios observados para excreção urinária de ureia (ExUU), N-ureico no soro (NUS), N-ingerido, N-urina, N-fezes e balanço de nitrogênio (BN) são apresentados na Tabela 9.

Conforme indicado pelo contraste C1 (Tabela 9), verificou-se menores concentrações de NUS e ExUU ($P < 0,05$) em animais que receberam o tratamento T1 (apenas silagem) em relação àqueles submetidos aos tratamentos T2, T3 e T4 (silagem + suplemento).

É consenso que há correlação positiva entre as concentrações de NUS e ExUU (KOHN et al., 2005), as quais são influenciadas pela porcentagem de PB na dieta e consumo de nitrogênio (Van Soest, 1994). Desta forma, a menor porcentagem PB na dieta e a menor quantidade de e N-ingerido observados para o tratamento T1 proporcionaram menores concentrações de NUS e ExUU, no citado tratamento.

Concentração elevada de NUS seria um indicativo de utilização ineficiente de proteína bruta da dieta (Broderick, 1995), no entanto, os valores observados neste experimento, independentemente do tratamento, não ultrapassaram os valores

13,52 a 15,15 mg/dL de NUS, o qual, segundo Valadares et al. (1997), corresponderia a máxima Emic e provavelmente representaria o limite a partir do qual estaria ocorrendo perdas de proteína da dieta para novilhos zebuínos recebendo ração com 45% de concentrado.

O tratamento T2 não diferiu ($P>0,05$), dos tratamentos com adição de lipídio, T2 e T3, em relação à concentração de NUS e ExUU, conforme indicado pelo contraste C2 (Tabela 6). No entanto, tal resultado diverge de observações de Leng e Nolan (1984), segundo os quais, os níveis de NUS seguem a concentração de amônia no rúmen. Apesar de significativa, as diferenças na concentração de amônia no rúmen foram pequenas, 3,64 e 2,6 mg/dL para os tratamentos T3 e T4, respectivamente, em relação ao tratamento T2, de modo que, diferenças podem não ter sido detectadas para as concentrações de NUS entre o tratamento T2 e os com adição de lipídios (T3 e T4).

Tabela 8 – Médias, erro padrão (EP) e níveis de probabilidade para excreção urinária de ureia (ExUU), N-ureico no soro (NUS), N-ingerido, N-urina, N-fezes e balanço de nitrogênio (BN) para bovinos suplementados ou não com diferentes fontes lipídicas.

Variáveis	Tratamentos				EP	Contrastes		
	T1	T2	T3	T4		C1	C2	C3
	mg/dl							
NUS	5,28	11,35	14,54	12,49	0,89	0,0001	0,4414	0,7867
	mg/kg/PV							
ExUU	17,20	147,63	157,02	161,76	14,85	0,0001	0,0626	0,1210
	g/dia							
N-ingerido	52,80	148,87	139,20	134,40	5,78	0,0001	0,2166	0,3272
N-urina	29,21	74,37	63,80	72,88	3,86	0,0001	0,1670	0,0770
N-fezes	14,34	36,49	47,12	37,34	3,42	0,0001	0,2399	0,0897
BN	9,25	37,94	28,28	24,18	4,78	0,0001	0,8397	0,3085

T1= silagem de milho (SM); T2= SM + concentrado (CON); T3 = SM + CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de óleo de soja; T4= SM+ CON com 5% de lipídio na dieta total na forma de soja grão moída.

C1= T1 vs os demais tratamentos; C2=T2 vs T3 e T4, C3= T3 vs T4.

As excreções de nitrogênio, urinário e fecal, aumentaram ($P < 0,05$) com a inclusão de concentrado à dieta, no entanto, estes apresentaram maior BN, conforme indicado pelo contraste C1. Segundo Yan et al. (2007), o consumo e a excreção, bem como, a quantidade de nitrogênio retido, são positivamente relacionados com o consumo de matéria seca e energia, e negativamente relacionado a proporção de forragem.

Não houve diferença ($P < 0,05$) entre o tratamento T2 e os tratamentos com adição de lipídio, conforme indicado pelo contraste C2 para as excreções de nitrogênio na urina e fezes, bem como, para o BN.

Uma das principais formas de evitar a perda de nitrogênio dietético é reduzir a concentração de amônia no rúmen e aumentar a quantidade de proteína degradada no rúmen que é convertida em proteína microbiana. A concentração de amônia é relacionada negativamente com a reciclagem de ureia para o rúmen (KENNEDY e MILLIGAN, 1980), de modo que, a redução na concentração de amônia no rúmen, poderia aumentar a reciclagem de ureia para o rúmen, e seu maior sequestro para a síntese de proteína microbiana.

Kiran et al. (2009), ao adicionar 6% de óleo de girassol na dieta de ovinos, relataram redução 3,74 e 3,31 mg/dL na concentração de amônia no rúmen, respectivamente, em dietas com 10 e 15% de proteína, e maior reciclagem de ureia endógena, a qual foi principalmente utilizada para síntese de proteína microbiana, como consequência, a excreção de nitrogênio na urina reduziu.

Apesar das reduções na concentração de amônia no rúmen observadas neste experimento de 3,64 e 2,46 mg/dL para os tratamentos T3 e T4, respectivamente, em relação ao tratamento T2, terem sido próximas as observadas por Kiran et al. (2009), não houve na redução na excreção de N na urina, quando comparado com o tratamento T2, sendo a urina a principal forma de excreção de nitrogênio observada para todos os tratamentos.

Ikwuegbu e Sutton (1982), ao fornecerem níveis crescentes de óleo de linhaça a ovinos observaram redução linear na excreção de n-urina, reduzindo em até 33% a excreção de N na urina no maior nível de lipídio. No entanto, de forma semelhante a este experimento, o BN não mudou em virtude do aumento linear da excreção N nas fezes.

Para que possa haver diferença na retenção de nitrogênio mudanças na excreção de nitrogênio na urina devem ser acompanhadas por redução ou manutenção na quantidade de nitrogênio excretado nas fezes e vice-versa, de modo que, alteração apenas na via de excreção de nitrogênio não resulte em mudanças no BN.

Embora tenha havido aumento na excreção de nitrogênio, quando se adicionou suplemento e não tenha havido influência da adição de lipídios, sendo mais elevado para animais suplementados, o BN foi positivo em todos os tratamentos, o que indica adequado balanceamento de proteína e energia nas dietas e ausência de mobilização de reservas corporais, mesmo para dietas constituídas apenas por silagem de milho.

5. CONCLUSÕES

A amostra *spot* não permite estimar a síntese de proteína microbiana, com base na excreção urinária de derivados de purinas, sendo necessário coleta total de urina, que pode ser realizada por um período de 24 horas.

A suplementação energética, com ou sem adição de lipídios, pode ser utilizada como estratégia para aumentar a síntese de proteína microbiana, em bovinos recebendo dieta à base de silagem de milho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL – AFRC. **Energy and protein requirement of ruminantes**. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1993. 159p.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. and STERN, M. D. Nitrogen metabolismo in the rumen. **Journal Dairy Science**. v. 88, (E. Suppl.), p. 9-21, 2005.
- BARBOSA, A. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADERES FILHO, S. C. VÉRAS, R. M. L. et al. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.3, p.870-877, 2006.
- BAUCHART, D.; LEGAY-CARMIER, F.; DOREAU, M. and GAILLARD, B. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. **British Journal Nutrition**. v. 63, p. 563-578, 1990.
- BAUCHOP, T. and ELSDEN, S. R. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. **Journal of General Microbiology**. v. 23, p. 457-469, 1960.
- BEN SALEM, H.; KRZEMINSKI, R.; FERLAY, A. and DOREAU, M. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: comparison of hay and corn-silage diets. **Can. Jour. Anim. Sci.** 73:547–557, 1993.
- BLAXTER, K. L., MARTIN, A. K., The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. **British Journal Nutrition**. v. 16, p. 397-407, 1962.
- BOGGS, D. L.; BERGEN, W. G. and HAWKINS, D. R. Effects of tallow supplementation and protein withdrawal on ruminal fermentation, microbial synthesis and site of digestion. **Journal Animal Science**. v. 64, p. 907-914, 1987.
- BRODERICK, G. A. Use of milk urea as indicator of nitrogen utilization in the lactation dairy cow. In: **U.S. Dairy Forage Center Research Summaries**. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 122p. 1995.
- BRODERICK, G. A. and MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal Dairy Science**. v. 75, p. 2618-2632, 1992.
- BROUDISCOU, L.; POCHET, S. and PONCET, C. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of

- ciliate-free and refaunated sheep. **Animal Feed Science and Technology**. v. 49, p. 189-202, 1994.
- CABRAL, L. S. C.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T. et al. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.5, p.919-925, 2008.
- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; MALAFAIA, P. A. M.; LANA R. P. et al. Frações proteicas de alimentos tropicais e suas taxas de digestão estimadas pela incubação com proteases ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.6, p.2316-2324,(Supl.2), 2000.
- CANTALAPIEDRA-HIJAR, G.; YANEZ-RUIZ, D. R.; MARTIN-GARCIA, A. I. and MOLINA-ALCAIDEZ. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. **Journal Animal Science**. v. 87, p. 622-631, 2009.
- CHEN, X. B.; CHEN, Y. K.; FRANKLIN, M. F.; ORSKOV, E. R. and SHAND, W. J. The Effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. **Journal Animal Science**. v. 70, p. 1534-1542, 1992.
- CHEN, X.B. and GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details**. Bucksburnd: Rowett Research Institute, International Feed Resources Unit, 21p.1992.
- CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ORSKOV E. R. OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**.v. 55, p.185-191, 1992.
- CHEN, X. B.; MEJIA, A. T.; KYLE, D. J. and ORSKOV, E. R. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. **Journal of Agricultural Science**. v. 125, p. 137-143, 1995.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A. and DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**. v. 70, p. 31-48, 2001.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Excreção de creatinina em novilhos e novilhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...Campo Grande:2004**. (CD-ROM).
- CHIZZOTTI, M. L.; VAADARES FILHO, S. C.; VALADRES, R. F. D. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de

- diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 35, n.4, p.1813-1821, (supl.), 2006.
- CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C. VALADARES, R. F. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.1, p.138-146, 2007.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.
- CZERKAWSKI, J. W.; CHRISTIE, W. W.; GRACE BRECKENRIDGE and HUNTER, M. L. Changes in the rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. **British Journal Nutrition**. v. 34, p. 25-44, 1975.
- DAVENPORT, G. M.; BOLING, J. A.; GAY, N and BUNTING, L. D. Effect of soybean lipid on growth and ruminal nitrogen metabolism in cattle fed soybean meal or ground whole soybean. **Journal Animal Science**. v. 65, p. 1680-1689, 1987.
- De BOEVER, J. L.; IANTCHEVA, N.; COTTYN, B. G.; De CAMPENEERE, S.; FIEMS, L. O. and BOUCQUÉ, Ch. V. Microbial protein synthesis in growing-finishing bulls estimated from the urinary excretion of purine derivatives. **Animal Feed Science and Technology**. v. 75, p. 93-109, 1998.
- DeICURTO, T.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R. et al. Supplementation of dormant allgrass-Prarie forage: II. Performance and forage utilization characteristics in grazing beef cattle receiving supplements of different protein concentrations. **Journal of Animal Science**, v.68, n.2, p.532-542, 1990.
- DEMEYER, D. I.; C. HENDERSON, and R. A. PRINS. Relative significance of exogenous and de novo synthesized fatty acids in the formation of rumen microbial lipids in vitro. **Appl. Environ. Microbiol.** v.35, p.24-31, 1978.
- DEMEYER, D. I. and VAN NEVEL, C. J. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. **British Journal Nutrition**. v. 4, p. 515-524, 1979.
- DEWHURST, R. J. and WEBSTER, A. J. F. A note on the effect of plane of nutrition on fractional outflow rates from the rumen and urinary allantoin excretion by wether sheep. **Animal Production**. v. 54, p. 445-448, 1992.
- DIAS, H. L. C.; VALADARES FILHO, S. C; COELHO DA SILVA, J. F. et al. Eficiência de síntese microbiana, pH e concentrações ruminiais de amônia em novilhos F1 Limousin x Nelore Alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, p. 555-563, 2000.
- DJOUVINOV, D. S. and TODOROV, N. A. Influence of dry matter intake and passage rate on microbial protein synthesis in the rumen of sheep and its estimation by cannulation and a non-invasive method. **Animal Feed Science and Technology**. v. 48, p. 289-304, 1994.

- DOREAU, M. and CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**. v. 43, 97-110, 1995. v.78, p. 15-35, 1997.
- DOREAU, M. and FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**. 43, 97-110, 1995.
- DOREAU, M.; LEGAY, F. and BAUCHART, D. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 74, p. 2233-2242, 1991.
- EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LEÃO, M. I.; ARCURI, P. B. et al. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão em vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.1, p.297-308, 2005.
- ELLIOT, R. C. and TOPPS, J. H. Effects of various low protein diets in the distribution of ruminal nitrogen and on the nitrogen required for maintenance of African sheep. **Animal Production**. v. 6, p. 345-355, 1964.
- EVANS, E. An evaluation of the relationships between dietary parameters and rumen solid turnover rate. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 61, p. 91-96, 1981.
- FAICHNEY, G. J. WELCH, R. J. and BROWN, G. H. Prediction of the excretion of allantoin and total purine derivatives by sheep from the 'creatinine coefficient'. **Journal of Agricultural Science**. v. 125, p. 425-428, 1995.
- FERLAY, A. and DOREAU, M. Influence of method of administration of rapeseed oil in dairy cows. 1. digestion of nonlipid components. **Journal Dairy Science**. v. 75, p. 3020-3027, 1992.
- FERLAY, A.; LEGAY, F.; BAUCHART, D.; PONCET, C. and DOREAU, M. Effect of a supply of raw or extruded rapeseeds on digestion in dairy cows. **Journal Animal Science**. v. 70, p. 915-923, 1992.
- FUJIHARA, T.; ORSKOV, E. R.; REEDS, P. J. and KYLE, D. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**. v. 109, p. 7-12, 1987.
- GARTON, G. A., A. K. LOUGH, AND E. VIOQUE. 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. **J. Gen. Microbiol.** v. 25, p.215-225, 1961.
- GEIRGE, S. K.; VERMA, A. K.; MEHRA, U. R.; DIPU, M. T. and SINGH, P. Evaluation of purine metabolites - creatinine index to predict the rumen microbial protein synthesis from urinary spot samples in Barbari goats. **Journal of Animal and Feed Science**. v. 20, p. 509-525, 2011.
- GONZA'LEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; BELENGUER, A.; CASTRILLO, C. and MOTA, M. A comparison of purine derivatives excretion with conventional

- methods as indices of microbial yield in dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 87, p. 2211-2221, 2004.
- HALL, M. B. and HEREJK, C. Different in yields of microbial crude protein form in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal Dairy Science**. v. 84, p. 2486-2493, 2001.
- HAALAND, G. L.; TYRELL, H. F.; MOE, P. W. and WHEELER, W. E. Effect of crude protein level and limestone buffer in diets fed at two levels of intake on rumen pH, ammonia-nitrogen, buffering capacity and volatile fatty acid concentration. **Journal Animal Science**. v. 55, p 943-950, 1982.
- HARFOOT, C. G. & HAZLEWOOD, G. P. (1997) Lipid metabolism in the rumen. In **The Rumen Microbial Ecosystem**, pp. 382–426 [PN Hobson and CS Stewart, editors]. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- HARFOOT, G. C.; NOBLE, R. C. and MOORE, J. H. Food particles as a site for biohidrogenação of unsaturated fatty acids in the rumen. **Biochemical Journal**. v. 132, p.829-832, 1973.
- HARPER H.A.; RODWELL V.W.; MAYES P.A. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p.736, 1982.
- HARVATINE, K. J. and ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Ruminant and Total Tract Nutrient Digestion in Lactating Dairy Cows. **Journal Dairy Science**. v. 89, p. 1092-1103, 2006
- HESPELL, R. B. and BRYANT, M. P. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on Y_{ATP} . **Journal Animal Science**. v. 49, p. 1640-1659, 1979.
- HOOVER, W. S. and STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal Dairy Science**. v. 74, p. 3630-3644, 1991.
- HRISTOV, A. N.; IVAN, M. and McALLISTER, T. A. In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. **Journal Animal Science**. v. 82, p-2693-2704, 2004.
- ÍTAVO, L. C. V.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F. et al. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos nelore alimentados com vários níveis de concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2004. (CD-ROM).
- ISAACSON, H. R.; HINDS, F. C.; BRYANT, M. P. and OWENS, F. N. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. **Journal Dairy Science**. 58:1645, 1975.

- IKWUEGBU, O. A. and SUTTON, J. D. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. **British Journal Nutrition.** v. 48, p. 365-375, 1982.
- JENKINS, T. C. Effect of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous in vitro cultures. **Journal Animal Science.** v. 64, p. 1526-1532, 1987.
- JENKINS, T.C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism – Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science,** v.76, p.3851-3863, 1993.
- JENKINS, T. C. and FOTOUHI, N. Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep. **Journal Animal Science.** v. 68, p. 460-466, 1990.
- KEMP, P.; AND D. J. LANDER. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **J. Gen. Microbiol.** v. 130, p. 527-533, 1984.
- KEPLER, C. K.; TUCKER, W. P. and TOVE, S. B. Biohydrogenation of insaturated fatty acids: IV Substrate specificity and inhibition of linoleate 12-cis, 11-trans-isomerase from butyvirbio fibrisolvens. **Journal of Biological Chemistry.** v. 245, p. 3612-3620. 1970.
- KIRAN, D. and MUTSVANGWA, T. Effects of partial ruminal defaunation on urea-nitrogen recycling, nitrogen metabolism, and microbial nitrogen supply in growing lambs fed low or high dietary crude protein concentrations. **Journal Animal Science.** v. 88, p.1034-1047, 2010.
- KOENG, K. M.; NEWBOLD, C. J.; McINTOSH, F. M. and RODE, L. M. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. **Journal Animal Science.** v. 78, p. 1431-2445, 2000.
- KOHN, R. A.; DINNEEN, M. M. and RUSSEK-COHEN, E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal Animal Science.** v. 83, p. 879-889, 2005.
- KOZLOSKI, G. V.; FIORENTINI, G. HARTER, C. J. and SANCHES, L. M. B. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural.** v. 35, n. 1, p. 98-102, 2005.
- KRYSL, L. J.; JUDKINS, M. B. and BOHMAN, V. R. Influence of ruminal or duodenal soybean oil infusion on intake, ruminal fermentation, site and extent of digestion, and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. **Journal Animal Science.** v. 69, p. 2585-2590, 1991.
- LADEIRA, M. M.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I. DA SILVA, J. F.C. SILVA, R. B. Eficiência microbiana, concentração de cmônia e pH ruminal e perdas nitrogenadas endógenas, em novilhos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.28, p. 404-411, 1999.

- LEAL, T. L.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. LEÃO M. I. et al. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.4, p.896-904, 2007.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 1917 Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 2ª edição. São Paulo: SARVIER, 1995.
- LENG, R. A. & NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal Dairy Science**. 67: 1072-1089. 1984.
- LOCK, A.L.; HARVATINE, K.J.; DRACKLEY, J.K.; BAUMAN, D.E. Concepts infat and fatty acid digestion in ruminants, 2006, Utah. **Proceedings...Utah: Intermountain Nutrition Conference, 2006**. p. 85-100.
- LUNA, L.; BACH, A.; JUÁREZ, M. and LA FUENTE, M. A. Effect of a diet enriched in whole linseed and sunflower oil on goat milk fatty acid composition and conjugated linoleic acid isomer profile. **Journal Dairy Science**. v. 91, p. 20-28, 2008.
- MAENG, W. J. and BALDWIN, R. L. Factors influencing rumen microbial growth Rates and yields: Effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. **Journal Dairy Science**. v. 59, p. 648-655, 1975.
- MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M.; COELHO DA SILVA, J. F.; PEREIRA, J. C. Determinação e cinética ruminal das frações proteicas de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 20, n. 6, p. 1243-1251, 1997.
- MENG, Q.; KERLEY, M. S.; LUDDEN, P. A. and BELYEA, R. L. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. **Journal Animal Science**. v. 77, p. 206-214, 1999.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of Official Analytical Chemists**. v.85, p.1217-1240, 2002.
- MESSANA, J. D.; BERCHIELLI, T. T.; ARCURI, P. B.; RIBEIRO, A. F. et al. Effects of different lipid levels on protozoa population, microbial protein synthesis and rumen degradability in cattle. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 34, n.3, p. 279-285, 2012.
- MURPHY, M. UDÉN, P.; PALMQUIST, D. L. and WIKTORSSON, H. Rumen and total diet digestibilities in lactating cows fed diets containing full-fat rapeseed. **Journal Dairy Science**. v. 70, p. 1572-1582, 1987.
- NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), **The**

- Rumen Microbial Ecosystem.** Blackie Academic & Professional, London, p. 523–632, 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle.** Washington, D.C.: National academy of Science. 242p, 1996.
- NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal Dairy Science.** v. 71, n. 8, p. 2070-2107, 1988.
- NSAHLAI, I. V.; OSUJI, P. O. and UMUNNA, N. N. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. **Animal Feed Science and Technology.** v. 85, p. 223-238, 2000.
- OBA, M. and ALLEN, M. S. Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science.** v. 86, p. 195-207, 2003.
- OFFER, N. W.; AXFORD, F. E. and EVANS, R. A. The effect of dietary energy source on nitrogen metabolism in the rumen of sheep. **British Journal Nutrition.** v. 40, p. 35-44, 1978.
- 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,** v. 70, n.10, p.3562-3577, 1992.
- SNIFFEN, C. J. and ROBINSON, P. H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal Dairy Science.** v. 70, p.425-441, 1987.
- SHINGFIELD, K. J. and OFFER, N. W. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. **Animal Science.** v. 66, p. 557-568, 1999.
- STOOKES, S. R.; HOOVER, W. H.; MILLER, T. K. and MANSKI, R. P. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. **Journal Dairy Science.** v. 74, p. 860-870, 1991.
- OHAJURUKA, A. O.; WU, Z. and PALMQUIST, D. L. Ruminal metabolism, fiber, and protein digestion by lactating cows fed calcium soap or animal-vegetable fat. **Journal Dairy Science.** v. 74, p. 2601-2609, 1991.
- OLDICK, B. S.; FIRKINS, J. L. and KOHN, R. A. Compartmental modeling with nitrogen-15 to determine effects of degree of fat saturation on intraruminal N recycling. **Journal Animal Science.** v. 78, p. 2421-2430, 2000.
- OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.

- OWENS, F. N. and BERGEN, W. G. Nitrogen metabolism of ruminant animals. Historical perspective, current understanding and future implicações. **Journal of Animal Science**. 57 (suppl.2):498, 1983.
- OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed). **The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition**. p. 145-171, 1993.
- PALMQUIST, D. L.; WEISBJERG, M. R. and HVELPLUND, T. Ruminal, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. *Journal Dairy Science*. v. 76, p. 1353-1364, 1993.
- PALMQUIST, D.L. and JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.1, p.1-14, 1980.
- PEREZ, J. F.; BALCELLS, J.; GUADA and CASTRILLHO, C. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of ¹⁵N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. **Animal Science**. v. 65, p. 225-236, 1997.
- PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proc. Royal Soc. London**, Series B, v.163, p.224-231, 1965.
- RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I. et al. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, p. 1223-1234, 2000.
- RENNÓ, L. N.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D et al. Níveis de uréia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: estimativa da produção de proteína microbiana por meio dos derivados de purinas na urina utilizando duas metodologias de coleta. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37, n.3, p.546-555, 2008.
- ROBINSON, P. H.; SNIFFEN, C. J. and VAN SOEST, P. J.. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the forestomachs of dairy cattle. **Can. J. Anim. Sci.** v. 65, p.437-444, 1985.
- ROOKE, J. A.; BRETT, P. A.; OVEREND, M. A. and ARMSTRONG, D. G. The energetic efficiency of rumen microbial protein synthesis in cattle given silage based diets. **Animal Feed Science and Technology**. v. 13, p. 255-267, 1985.
- RUSSELL, J. B. and COOK, G. M.. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. **Microbiological Reviews**. v. 59, p. 48-62, 1995.
- RUSSELL, J. B. and DOMBROWSKI, D. B. Effect of ph on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 39, p. 604-610, 1980.

- RUSSEL, J. B.; SNIFFEN, C. J, and VAN SOEST, P. J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal Dairy Science**. v. 66, p. 763 -775, 1983.
- SATTER, L. D. and SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal Nutrition**. v. 32, p. 199-208, 1974.
- SCHUTTE, J.E.; LONGHURST, J. C.; GAFFNEY, F. A.; BASTIAN, B. C.; BLOMQUIST, C. G. Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. **Journal of Applied Physiology**, v.51, p.762-766, 1981.
- SIDDONS, R. C. and PARADINE, J. Effect of diet on protein degrading activity in the sheep rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 32, p. 973-981, 1981.
- SILVA, L.F. C. VALADARES FILHO, S. C. CHIZZOTTI, M. L. ROTTA, P. P. PRADO, L. F. et al. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nelore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 41, p. 807-810, 2012.
- SILVA, R. M. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. et al., Uréia para vacas em lactação. 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n.6, p. 1948-1957, 2001.
- SHEU, C., W. and FREESE, E. Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. **Journal of Bacteriology**. v. 115, n. 3, p. 869-875, 1973.
- SNIFFEN, C. J. and ROBINSON, P. H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal Dairy Science**. v. 70, p.425-441, 1987.
- SOUZA, D. P.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; SEDIYAMA, C. A. Z. et al. Parâmetros fermentativos, produção de proteína microbiana, concentrações de ureia no leite e no plasma e balanço de nitrogênio de vacas alimentadas com silagem de milho ou cana-de-açúcar com caroço de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, n.10, p.2063-2071, 2009.
- STERN, M. D.; BACH, A. and CALSAMIGLIA, S. New concepts in protein nutrition of ruminants. **21^a Annual South Nutrition & Management Conference**. Tempe. AZ-46, 2006.
- STERN, M. D. and HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. **Journal Animal Science**. v. 49, p. 1590-1603, 1979.
- STERN, M. D.; VARGA, G. A.; CLARK, J. H.; FIRKINS, J. L. et al. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal Dairy Science**. v. 77, p. 2762-2786. 1994.

- STROBEL, H. J. and RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal Dairy Science**. v. 69, p. 2941-2947, 1986.
- SUSMEL, P., STEFANON, B., PLAZZOTA, E. et al. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**. v.123, p.257-266, 1994
- SUTTON, J. D.; KNIGHT, R.; McALLAN, A. B. and SMITH, R. H. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. **British Journal Nutrition**. v. 49, p. 419-432, 1983.
- THIEX, N.J., MANSON, H., ANDERSON, S., PERSSON, J.-Å., Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: collaborative study. **Journal of Official Analytical Chemists**. 85, 309-317, 2002.
- THIEX, N.J., ANDERSON, S., GILDEMEISTER, B., Crude, fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall, Soxhlet/Submersion Method): collaborative study. **Journal of Official Analytical Chemists**. v.86, p.899-908, 2003.
- THOMAS, P. C.; CHAMBERLAIN, D. G.; VELLY, N. C. and WAIT, M. K. The nutritive value of silages digestion of nitrogenous constituents in sheep receiving diets of grass silage and grass silage and barley. **British Journal Nutrition**. v. 43, 469-479, 1980.
- TIBO, G. C.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F. et al. Níveis de Concentrado em Dietas de Novilhos Mestiços F1 Simental x Nelore. 2. Balanço Nitrogenado, Eficiência Microbiana e Parâmetros Ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, p. 921-929, 2000.
- TOPPS, J. H., ELLIOTT, R. C., Relationships between concentrations of ruminal nucleic acid and excretion of purine derivative by sheep. **Nature**. v.205, p. 498-499, 1965.
- UEDA, K., FERLAY, A., CHABROT, J., LOOR, J. J., CHILLIARD, Y. and DOREAU, M. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, 86(12), 3999-4007, 2003.
- VAGNONI, D. B; BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. and HATFIELD, R. D. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. **Journal Dairy Science**. v. 80, p. 1695-1702, 1997.
- VALADARES, R.F.D., GONÇALVES, L.C., SAMPAIO, I.B. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 2. Consumo, digestibilidades e balanço de compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p.1259-1263, 1997.

- VAN KESSEL, J. S. and RUSSEL, J. B. The Effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. **Journal Dairy Science**. v. 79, p. 1237-1243, 1996
- Van NEVEL, C. J. and DEMEYER, D. I. Effect of methane inhibitors on the metabolism of rumen microbes *in vitro*. **Arch Tierernahr.** v. 31, p. 141-151, 1981.
- VAN NEVEL, C. and DEMEYER, D., I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen *in vitro*: Inhibition by antimicrobials. **Journal Dairy Science**. v.78, p. 2797-2806, 1995.
- VAN NEVEL, C. J. & DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**. v.36, p. 53-63, 1996.
- VAN NEVEL, C. J.; DE SEMET, S. and DEMEYER, D. I. Digestion in defaunated and refaunated sheep fed soybean oil hydrolysate or crushed toasted soybeans. **Netherland Journal of Agricultural Science**. v. 41, p. 205-219, 1993.
- VAN SOEST, P.J. 1994. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed., Ithaca: Cornell University. 476p.
- VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A. and ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants:Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers **Journal of Agricultural Science**. v. 114, p. 243-248, 1990.
- VERBIC, J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. **Viehwirtschaftliche Fachtagung**, 24-25. Abril, 2002.
- VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa,1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- WOHLT, J. E.; CLARK, J. H. and BLAISDELL, F. S. Effect of sampling location, time and method of sampling on concentration of ammonia nitrogen in rumen fluid. **Journal Dairy Science**. v. 59, p.459-464, 1976.
- ZINN, R. A. and OWENS, F. N. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. **Journal Animal Science**. v. 56, p. 471-475, 1983.
- ZINN, R. A. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for feedlot steers: metabolismo. **Journal Animal Science**. v. 67, p. 1038-1048,1989.

YAN, T. FROST, J. P.; KEADY, T. W. J.; AGNEW, R. E. and MAYNE, C. S.
Prediction of nitrogen excretion in feces and urine of beef cattle offered diets
containing grass silage. **Journal Animal Science**. v. 85, p. 1982-1989, 2007.