

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Métodos para estimativa do fluxo e síntese de proteína
microbiana em bovinos nelore recebendo dietas de alto grão com
diferentes fontes de proteína**

Leticia Marra Campos

**Orientadora: Prof^a Dr^a Telma Teresinha Berchielli
Coorientadores: Dr^a Juliana Duarte Messana
Me. Vinícius Carneiro de Souza**

Jaboticabal – SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Métodos para estimativa do fluxo e síntese de proteína microbiana em bovinos
Nelore recebendo dietas de alto grão com diferentes fontes de proteína**

Letícia Marra Campos

Orientadora: Prof^a Dr^a Telma Teresinha Berchielli

**Coorientadores: Dr^a Juliana Duarte Messana
Me. Vinícius Carneiro de Souza**

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica)
apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal - SP
2º Semestre/2018

C198m Campos, Letícia Marra
Métodos para estimativa do fluxo e síntese de proteína microbiana em bovinos Nelore recebendo dietas de alto grão com diferentes fontes de proteína / Letícia Marra Campos. – Jaboticabal, 2018
vii, 63 f. : il. ; 29 cm

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal para graduação em Zootecnia, 2018

Orientadora: Telma Teresinha Berchielli

Banca examinadora: Juliana Duarte Messana, Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes, Yury Tatiana Granja Salcedo.

Bibliografia

1. AGCI. 2. Bases Púricas. 3. ¹⁵N. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084:636.2

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL



DEPARTAMENTO:

ZOOTECNIA

CERTIFICADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MÉTODOS PARA ESTIMATIVA DO FLUXO E SÍNTESE DE PROTEÍNA
TÍTULO: MICROBIANA EM BOVINOS NELORE RECEBENDO DIETAS DE ALTO GRÃO
COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA

ACADÊMICO: LETÍCIA MARRA CAMPOS

CURSO: ZOOTECNIA

ORIENTADOR (ES): PROFª DRª TELMA TERESINHA BERCHIELLI

COORIENTADOR: DRª JULIANA DUARTE MESSANA

PERÍODO: Semestre 10 Ano 2018

Aprovado com conceito: A B C

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados CAPELO. Sim Não

Reprovado:

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	DRª JULIANA D. MESSANA	<i>Juliana Duarte Messana</i>
Membro	DRª MÁRCIA H.M.R. FERNANDES	<i>[Signature]</i>
Membro	DRª YURY T.G. SALCEDO	<i>[Signature]</i>

Jaboticabal 05 / 09 / 2018

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 05 / 09 / 2018

Alex S. C. M.

Chefe do Departamento

Prof. Dr. ALEX SANDRO CAMPOS MAIA
Chefe do Departamento de Zootecnia
Matr. Nº 422565-0

Dedico esse Trabalho de Conclusão de Curso à minha família Ellen Campos, Getúlio Campos e Lucas Campos, que durante toda minha trajetória, acreditaram em meu potencial e me envolveram em um elo de amor incondicional, não medindo esforços para que eu chegasse até aqui.

À vocês, dedico!

Agradecimentos

À Deus pela da vida, saúde, por me conceder discernimento para traçar caminhos baseados em valores sólidos, e por caminhar ao meu lado guiando meus passos.

Agradeço á minha família Ellen e Getúlio, Lucas, e ao meu namorado Rildo Jr pela paciência, dedicação e auxílio imprescindível durante o desenvolvimento deste projeto. Agradeço aos meus avós Maria Stella & Sebastião e Maria de Lourdes & Osmar (*in memoriam*), e demais familiares pelo suporte e orações á mim direcionadas.

Agradeço à todos as meus grandes amigos de Jaboticabal e São Gotardo, por atravessarem comigo os desafios da vida acadêmica, e em especial Ana Veronica, Marina, Jayne, Paulinha, Gabriela e Raphael por todo acolhimento, irmandade e amor.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, “Júlio de Mesquita Filho”, pelas oportunidades a mim concedidas, e á todos os professores que a compõem por me enriquecerem com conhecimento de nível excepcional.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Estudos em Caprinocultura, em especial Prof^a Izabelle Molina, Dr. Bruno Biagioli, Dr^a Amélia Almeida, Me. Raiza Silveira e Me. Marina Elisabeth por me introduzirem na pesquisa, por confiarem a mim a responsabilidade de um projeto e por todo conhecimento transmitido.

Agradeço a todo Grupo de Pesquisas em Nutrição em Ruminantes, pela colaboração, experiências adquiridas e por confiarem em meu trabalho. Agradeço em especial Dr^a. Juliana Messana, Dr^a Yury Salcedo, Me. Vinicius Carneiro, os quais juntamente com a Prof^a Dr^a. Telma Teresinha Berchielli me deram todo encorajamento necessário para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço á FAPESP, pela concessão do auxílio financeiro que possibilitou a execução do projeto (Processo: 2017/08854-0).

Índice

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
2. CAPÍTULO 2 - MÉTODOS PARA A ESTIMATIVA DE FLUXO E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM BOVINOS NELORE RECEBENDO DIETAS DE ALTO GRÃO E DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA.....	12
2.1 RESUMO.....	12
2.2 ABSTRACT.....	13
3. INTRODUÇÃO	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Local, Animais e Dietas	16
4.2 Estimativa do Fluxo de Digesta Duodenal.....	17
4.3 Marcadores Microbianos.....	18
4.3.1 Bases Púricas - RNA	18
4.3.2 ¹⁵ N.....	18
4.3.3 Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar – AGCI.....	20
4.4 Cálculos.....	20
4.5 Análises Laboratoriais.....	22
4.6 Análises Estatísticas.....	23
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO	1
7. CONCLUSÃO	3
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Segundo a FAO (2017), até 2050 a população mundial crescerá em torno de 29%, sendo que este crescimento ocorrerá em maior proporção nos países em desenvolvimento. Acompanhando este crescimento, estima-se que a demanda por alimentos crescerá 70%, o que implicará em uma necessidade de aumento na oferta do mesmo via maiores produtores mundiais (Gerber et al., 2013). Neste cenário, um dos países com maior capacidade de expansão em terras agricultáveis é o Brasil, e segundo MAPA (2017), o país lidera o ranking de produtividade agropecuária mundial, com potencial para suprir as necessidades da crescente demanda por alimentos e, ocupando uma posição econômica e ambiental importante no cenário mundial (Palhares et al., 2016).

O país tem apresentado aumento nas exportações do setor agropecuário e vem consolidando novos mercados em diferentes partes do mundo (Alles, 2017). A crescente na oferta, principalmente produtos de origem animal como carnes, leite e ovos, está relacionada ao aumento das áreas cultivadas com as criações e as inovações tecnológicas que surgiram em vários elos da cadeia de produção (Scolari, 2012).

No mundo, a carne bovina se destaca em consumo per capita de 22,5kg/ano, sendo a terceira proteína de origem animal mais demandado pela população, estando atrás apenas do consumo de carne suína e de frango 42,9kg/ano e 34,6kg/ano respectivamente (USDA, 2017). Isto imprime uma necessidade de produção adicional até 2025 de 26,30 milhões de toneladas (Scolari, 2012). O Brasil representa uma importante parte desta produção, sendo um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo (Costa & Silva et al., 2015).

De 1994 a 2016 a produção de carne bovina brasileira cresceu 85,2%, com um aumento de 2,8% ao ano (Embrapa, 2017), sendo apoiado pelos menores custos de produção, visto a disponibilidade de terras, água e insumos (Alles, 2017). Durante o período de 1950 a 2006, os ganhos na produtividade explicaram 79% do crescimento da produção de carne bovina no Brasil (Martha Jr et al., 2012) e segundo a FAO (2017) de 2015 a 2024 este índice continuará fazendo a diferença para atingirmos melhores níveis de produção.

Contudo, com o aumento na produção brasileira de alimentos, justificado pelos ganhos na produtividade, os impactos ambientais deste processo apresentam-se de forma progressiva (Ornellas, 2017). A intensificação do sistema para bovinos de corte pode ser considerada um caminho pertinente visando reduzir os impactos ambientais negativos causados durante o processo de produção (Monteiro, 2009; Cabral et al., 2011), como o desmatamento. Isto se dá, pois, sistemas de confinamento aumentam o ganho de produtividade por área e reduzem as emissões de gases de efeito estufa por quilo de produto produzido (Barbero et al., 2015). Para tanto a estratégia nutricional possui grande relevância sob este sistema, uma vez que o fornecimento de dietas compostas por alto concentrado, estimulam a produção de propionato no rúmen, e por consequência, através da fermentação entérica, diminui-se as emissões de gases do efeito estufa como, por exemplo, o gás metano (Amaral et al., 2012).

Na formulação de dietas para bovinos de corte em crescimento, alimentos proteicos são apontados como fonte de maior custo na produção, pois a proteína exerce funções importantes para um ótimo desenvolvimento corporal animal, tais como: hormonais e enzimáticas no metabolismo de ruminantes, relacionada a componentes estruturais da célula, e deposição muscular (Berchielli et al., 2006). Em sistemas

nutricionais desbalanceados, ocorre a excreção de nitrogênio (N) em altas quantidades, o que constitui-se em prejuízos econômicos e ambientais devido ao seu alto custo, e excedendo a capacidade do solo de armazenar N, ocorrendo contaminação, pelo processo de lixiviação ou em forma de gases como o óxido nitroso (Palhares et al., 2016).

Como o consumo de proteína está diretamente relacionado aos níveis de excreção de N (Chizzotti et al., 2012), para maiores reduções deste impacto, é desejável o atendimento correto das exigências do animal em suas diferentes fases, com o ajuste dos níveis de proteína da dieta, utilização de ingredientes adequados e de forma discriminada, visando otimizar a estratégia nutricional (Arrigoni et al., 2013).

Durante muitos anos, a nutrição proteica foi baseada em estimativas realizadas por ensaios de digestibilidade e proteína bruta, até que foram substituídos pelo uso da exigência de proteína metabolizável (proteína de origem microbiana e proteína não degradada no rúmen) (Berchielli et al., 2006).

A proteína, representada pelos teores de N contido nos alimentos consumidos por ruminantes, é composta pela fração degradável no rúmen (PDR), onde os microorganismos a degradam e utilizam peptídeos, aminoácidos e amônia para a síntese de proteína microbiana, e pela fração não degradável no rúmen (PNDR) que resiste a degradação ruminal, no qual parte é degradada e absorvida nos intestinos (Sniffen et al., 1992).

Durante o processo da digestão da PDR, as bactérias realizam a deaminação dos aminoácidos livres em amônia e utilizam juntamente com esqueleto de carbono para síntese de proteína microbiana. A amônia excedida é absorvida pela parede ruminal e através da corrente sanguínea será transportada ao fígado, onde será convertida em ureia

a qual poderá retornar ao rúmen via saliva e parede ruminal, ou ser eliminada via urina (Berchielli et al., 2006).

Segundo Hutchings et al. (1996), a eficiência de uso do N em bovinos de corte é de cerca de 10%, podendo alcançar até 25%. Esta variação pode estar relacionada à degradação da proteína no rúmen, com diferentes taxas de produção e absorção de amônia, da interação do N com a fonte de carboidrato para um ótimo crescimento microbiano e do metabolismo pós-absortivo do animal.

O Nitrogênio microbiano (Nmic) é a principal fonte de proteína metabolizável para ruminantes (Poppi & McLennan, 1995), sendo que, a maioria dos micro-organismos que deslocam para o intestino é de origem bacteriana altamente degradáveis. Isto acontece, pois a Nmic possui um perfil aminoacídico semelhante aos tecidos do animal, tornando possível a sua deposição via sistema muscular (NRC, 2000). Junto a PDR que compõe a PB do alimento, há a proteína não degradada no rúmen (PNDR), que exerce papel fundamental para atingir as exigências de animais em crescimento (Sniffen, 1992).

Entretanto, o Nmic pode sofrer influência de diferentes fatores que reduzem sua síntese e seu fluxo para o duodeno, como por exemplo, à qualidade e a composição da fonte proteica fornecida, devido à diversidade de alimentos encontrados no mercado; a taxa de passagem do alimento, do qual quanto mais rápida ela for realizada, mais dificuldade as bactérias terão em degradar o que fora fornecido; e principalmente a energia metabolizável disponível para os micro-organismos, pois esta é proveniente dos alimentos, que em sincronismo com a proteína, fornecem recursos para que eles sejam capazes de se estabelecerem no ambiente ruminal (Davies et al., 2013; Santos et al., 2006).

Para a otimização na produção animal, recomenda-se o ajuste dos níveis de PDR e PNDR via balanceamento de dietas, fornecendo ao rúmen, substratos para que os micro-organismos sintetizem Nmic, e fonte de PNDR no duodeno, garantindo o suprimento das exigências em proteína metabolizável (Santos et al., 2016).

Assim, estudos *in vivo*, avaliando dietas com diferentes fontes de proteína vem sendo realizados, para quantificar o fluxo e a síntese de nitrogênio microbiano, por meio de marcadores (Stefanello, 2014).

Os marcadores microbianos não devem ser absorvidos pelo trato gastrintestinal, devem apresentar-se em uma proporção constante em todas as fases do crescimento microbiano sem afetá-lo, mas devem ser similares ao nutriente estudado, ou devem passar com a mesma velocidade no trato, sem migrar para as frações, sólida e líquida, do conteúdo ruminal (Dehority 1995; D'mello, 2000).

Mesmo com toda precisão que um marcador microbiano pode apresentar, nenhum atende em sua totalidade a todos os requisitos citados (Broderick & Merchen, 1992; Obispo & Dehority, 1999). Existem marcadores que apresentam resultados mais satisfatórios na fase líquida, pois muitos marcadores tendem a migrar para partículas não amostradas, sendo esta não relatada no componente originalmente marcado (D'mello, 2000); outros marcadores são parcialmente absorvidos, e para obtenção de dados mais confiáveis, é necessário à correção sob as excretas, principalmente fezes (Stefanello, 2014; Longo, 2015).

Marcadores microbianos podem ser classificados em internos, estando presentes diretamente na célula microbiana (Carro, 2001) e se aderindo a estrutura dos alimentos durante sua degradação no rúmen e externos, sendo estes adicionados ou ligados ao alimento ou a digesta, que são incorporados pelos micro-organismos ruminais e passam

a fazer parte da estrutura celular do mesmo. Marcadores internos, como as Bases Púricas e Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar, são conhecidos por apresentarem uma técnica menos invasiva, menos onerosa e de fácil manuseio. Enquanto, os externos, como o ^{15}N , são categorizados invasivos e laboriosos, pois necessitam de maior controle e cuidado na infusão, entretanto, possuem vantagens satisfatórias, apresentando resultados de grande confiabilidade e não poluindo o solo devido sua composição (Rotta et al., 2014).

As bases púricas estão contidas nos ácidos nucleicos em altas concentrações, especialmente no RNA dos micro-organismos, e por isso são considerados um marcador microbiano adequado para quantificação do fluxo de nitrogênio microbiano (D'mello, 2000). Sua determinação é feita por hidrólise e suspensão de bactérias na amostra, sendo analisadas pelo valor de absorbância em espectrometria ou HPLC, e posteriormente quantificada por meio de cálculos. As purinas que chegam ao duodeno são rapidamente absorvidas pela parede duodenal em forma de nucleosídeos, podendo ser utilizadas pelo animal em seu metabolismo, ou serem excretadas posteriormente. Em estudos avaliando diferentes marcadores microbianos, as bases púricas têm produzido boas estimativas de síntese microbiana em substituição ao ^{15}N (método de ouro) (Blümmel & Lebzien, 2001; Belenguer et al., 2002; Ma et al., 2014).

Outro possível marcador são os Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar (AGCI), que são raros nos tecidos da maioria dos mamíferos. Entretanto, em ruminantes, podem estar presentes em porcentagem considerável, derivada do metabolismo das bactérias no rúmen (Fagundes et al., 2012) que possuem majoritariamente, este ácido graxo na composição celular de suas membranas (Kim et al., 2005). Por este motivo, estudos principalmente com bovinos leiteiros, sugerem que os AGCI são potenciais ferramentas

de diagnóstico na composição e/ou avaliação das mudanças ocorridas na microbiota ruminal (Saluzzi et al., 1995; Logar et al., 2001; Vlaeminck et al., 2004).

Além dos marcadores internos acima referenciados, há o ^{15}N inorgânico, que é classificado como um isótopo estável, amplamente estudado em pesquisas para quantificação de síntese de proteína microbiana (N_{mic} multiplicado por 6,25), sem risco de contaminação ambiental e marcando diretamente o N microbiano que deseja ser estudado (Carro, 2001). Sua determinação é feita por espectrometria de massa, onde previamente se faz necessário a determinação de N na amostra. Sua administração é realizada pela infusão no animal por um determinado período, necessário para seu enriquecimento, podendo ser diretamente no rúmen ou na corrente sanguínea. Para utilização deste marcador, é necessário obter animais cateterizados via jugular para a infusão, e canulados para a obtenção de amostras no duodeno (D'mello, 2000). Contudo, a técnica se mostra invasiva, de alto custo e dependendo das condições experimentais podem-se ocorrer grandes variações nos resultados. Utilizando técnicas de marcadores microbianos, pesquisadores têm procurado alternativas para utilização na quantificação de N_{mic} , que sejam de fácil manuseio, mas que sejam acurados em seus resultados.

Portanto o objetivou-se com o presente estudo, comparar marcadores microbianos alternativos (Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar e Bases Púricas) ao método ouro (^{15}N) para quantificação do fluxo e síntese de nitrogênio microbiano em bovinos Nelore confinados, recebendo dietas ricas em concentrado com diferentes fontes de proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLES, T. E. T. O impacto dos custos de transação sobre as exportações do setor frigorífico brasileiro. Universidade do Vale do Rio dos Sinos. **Dissertação de Mestrado**, 2017.

AMARAL, G. F.; CARVALHO, F. A. A. D.; CAPANEMA, L. X. D. L.; CARVALHO, C. A. D. D. Panorama da pecuária sustentável. **BNDES Setorial**, n. 36, p. 249-288, 2012.

ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; SARTI, L. M. N., BARDUCCI, R. S.; FRANZÓI, M. C. D. S.; VIEIRA JÚNIOR, L. C.; E FACTORI, M. A. Níveis elevados de concentrado na dieta de bovinos em confinamento. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p. 539-551, 2013.

BARBERO, R.P.; MALHEIROS, E.B.; ARAÚJO, T.L.R.; NAVE. R.L.G.; MULLINIKS, J.T.; BERCHIELLI, T.T.; RUGGIERI, A.C.; REIS, R.A. Combining Marandu grass grazing height and supplementation level to optimize growth and productivity of yearling bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v.209, 110-118, 2015.

BELENGUER, A.; YANEZ,D.; BALCELLS,J.; OZDEMIR,N.H.B; GONZALEZ,R.M. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. **Livestock Production Science**, v.77, p.127-135, 2002.

BERCHIELLI, T. T; PIREZ, A.V; OLIVEIRA,S.G. **Livro Nutrição de Ruminantes**. FUNEP, 2006.

BLÜMMEL, M.; LEBZIEN, P. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. **Livestock Production Science**, v. 68, n. 2-3, p. 107-117, 2001.

BRODERICK, GLEN A.; MERCHEN, NEAL R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen1. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2618-2632, 1992.

CABRAL, L.S; TOLEDO, C.L.B; RODRIGUES, D.N; CABRAL, W.B; SILVA, I.M; GALATI, R.L; ANDRADE, K.M; CENI, I; CARVALHO, L.B; ALVES, A.O. Oportunidade e Entraves para a Pecuária de Corte Brasileira. **I SIMBOV- I Simpósio Mato-grossense de bovinocultura de corte**, 2011.

CARRO, M. D. La determinación de la síntesis de proteína micro-biana en el rumen: Comparación entre marcadores microbianos (Revisión). **Inv. Agr. Prod. Sanid. Anim**, v.16, p.1-27, 2001.

CHIZZOTTI, M. L.; LADEIRA, M. M.; MACHADO NETO, O. R.; LOPES, L. S. Estratégias para redução do impacto ambiental da atividade pecuária In: **Anais do II**

Congresso Brasileiro de Produção Animal Sustentável.1 ed.Concórdia : Embrapa Suínos e Aves, p.32-42, 2012

COSTA e SILVA, L.F.; VALADARES FILHO, S.C.; ENGLE, T.E.; ROTTA, P.P.; MARCONDES, M.I; SILVA, F.A.Z.; MARTINS, E.C.; TOKUNAGA, A.T. Macrominerals and Trace Element Requirements for Beef Cattle. **Plos One**, v.10, p.1-20, 2015.

DAVIES, K. L.; MCKINNON, J. J.; MUTSVANGWA, T. Effects of dietary ruminally degradable starch and ruminally degradable protein levels on urea recycling, microbial protein production, nitrogen balance, and duodenal nutrient flow in beef heifers fed low crude protein diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v.93, p.123-136, 2013.

DEHORITY B.A. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. **Simpósio Internacional Sobre Exigências Nutricionais De Ruminantes**, p. 121-138, 1995.

D'MELLO, J.F. **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Cabi, 2000.

EMBRAPA. **Qualidade da Carne/Carne em Números**, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-em-numeros>> Acesso em: 18/07/2018.

FAGUNDES, G. M.; MODESTO, E. C.; DE SOUZA, V. C. Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada do leite. **Revista de Ciências da Vida**, v. 32, p. 23-33, 2012.

FAO. **Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos**, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>> Acesso em: 17/07/2018.

GERBER, P.J.; STEINFELD, H.; HENDERSON, B.; MOTTET, A.; OPIO, C.; DIJKMAN, J.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, 2013.

HUTCHINGS, N. J.; SOMMER, S. G.; JARVIS, S. C. A model of ammonia volatilization from a grazing livestock farm. **Atmospheric Environment**, v.30, p.589-599, 1996.

KIM, E. J.; SANDERSON, R.; DHANOA, M. S.; DEWHURST, R. J. Fatty acid profiles associated with microbial colonization of freshly ingested grass and rumen biohydrogenation. **Journal Dairy Science**, v.88, p.3220-3230, 2005.

LOGAR, R. M.; ZOREC, M.; KOPEČNÝ, J. Reliable identification of *Prevotella* and

Butyrivibrio spp. from rumen by fatty acid methyl ester profiles. **Folia microbiologica**, v.46, p.57-59, 2001.

LONGO, T.R. Avaliação de marcadores externos e internos para estimar excreção fecal e consumo em ovinos alimentados com pastagem natural ou feno de Tifton 85. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria, p11, 2015.

MA,T.; DENG,K.D.; TU,Y.; ZHANG,N.F.; JIANG,C.G.; LIU,J.; ZHAO,Y.G.; DIAO,Q.Y. Effect of dietary forage-to-concentrate ratios on urinary excretion of purine derivatives and microbial nitrogen yields in the rumen of Dorper crossbred sheep. **Livestock Science**, v.160, p.37-44, 2014.

MAPA. **Brasil lidera produtividade agropecuária mundial**, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-lidera-productividade-agropecuaria-mundial>> Acesso em: 17/07/2018.

MARTHA JR, G. B.; ALVES, E.; CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**, v.110, p.173-177, 2012.

MONTEIRO, R. B. N. C. Desenvolvimento de um modelo para estimativas da produção de gases de efeito estufa em diferentes sistemas de produção de bovinos de corte. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2009.

NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle. Updated 7th. ed. **National Academic Press**, Whashington, DC, p. 242, 2000.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 3084-3095, 1999.

ORNELLAS, R. S. Almejando o mundo do futuro: a proposição de um modelo prospectivo global para produção e consumo sustentável de carne bovina. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2017

PALHARES, J. C. P.; MACKAY, A. D.; PEDROSO, A. M.; RODRIGUES, A. P. O.; NAVE, A. G.; DOMINATI, E. J.; DOS SANTOS, J. L. Produção animal e recursos hídricos. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2016.

POPPI, D.P.; MCLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.

ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F.; DETMANN, E.; VILLADIEGO, F.A.C.; ENGLE, T.E.; VALADARES, R.F.D.; SILVA, B.C.; PACHECO, M.V.C.; ZANETTI, D. Comparison of purine bases and 15 N for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu cross breed bulls. **Livestock Science**, v.167, p.144-153, 2014.

SALUZZI, L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; SMITH, A. Plasmalogens of microbial communities associated with barley straw and clover in the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v.17, p.47-56, 1995.

SANTOS, S.A; ROTTA, P.P; SILVA, L.F.C; MENEZES, A.C.B; PINA, D.S; FILHO, S.C.V. Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana. **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR-Corte**, v.1, p.142, 2006.

SCOLARI, D.D. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **Área de Informação da Sede - Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2012.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II – Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

STEFANELLO, C.M. Avaliação de marcadores internos para estimativa de fluxo de digesta e de proteína microbiana no duodeno de ruminantes. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

USDA. BRADESCO. **Carne Bovina**, 2017. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_carne_bovina.pdf> Acesso em: 31/08/2018.

VLAEMINCK, B.; DEWHURST, R. J.; DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Odd and branched chain fatty acids to estimate proportions of cellulolytic and amylolytic particle associated bacteria. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.13, p.235-238, 2004.

2. CAPÍTULO 2 - MÉTODOS PARA A ESTIMATIVA DE FLUXO E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM BOVINOS NELORE RECEBENDO DIETAS DE ALTO GRÃO E DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA

2.1 RESUMO

O objetivo deste estudo é comparar o uso de métodos alternativos (bases púricas - RNA e ácidos graxos de cadeia ímpar - AGCI) ao ^{15}N , como marcadores microbianos para quantificar o fluxo e eficiência de síntese de nitrogênio microbiano (N_{mic}). Foram utilizados seis novilhos Nelore, confinados, canulados no rúmen e duodeno (peso corporal médio de $354 \pm 26,4$ kg e idade média de 18 meses) dispostos em quadrado latino 6×6 em arranjo fatorial 3×3 (3 fontes proteicas e 3 marcadores), balanceado para efeitos residuais. Os animais foram alimentados com dietas contendo aproximadamente 80% de concentrado com diferentes fontes de N: Ureia (alta degradabilidade ruminal); grão de milho seco por destilação (DDG, degradabilidade intermediária); ou glúten de milho 60 (baixa degradabilidade). As equações geradas para expressar fluxo e síntese no ^{15}N e RNA através do AGCI são condizentes aos valores observados. O marcador RNA calculado através do AGCI subestimou a eficiência de síntese N_{mic} por kg de nutrientes digestíveis totais (NDT, $P = 0,003$), quando comparado ao ^{15}N calculado através do AGCI, e também subestimou o fluxo de N_{mic} ($P = 0,027$) quando comparado ao ^{15}N observado. Conclui-se que tanto o RNA quanto o AGCI são marcadores capazes de substituir o ^{15}N para quantificação do fluxo e eficiência de síntese microbiana expressa em relação aos carboidratos totais fermentados no rúmen (CT) e matéria orgânica verdadeiramente fermentada no rúmen (MOVFR).

Palavras-chave: AGCI, Bases Púricas, ^{15}N .

2.2 ABSTRACT

The aim of this study is to compare use of alternative methods (purine bases - RNA and odd-chain fatty acids - OCFA) to ^{15}N as microbial markers to quantify flow and efficiency of microbial nitrogen synthesis (N_{mic}). Six Nellore steers, in a feedlot, cannulated in the rumen and duodenum (mean body weight of 354 ± 26.4 kg and mean age of 18 months) were arranged in a 6×6 latin square in a 3×3 factorial arrangement (3 protein sources and 3 markers), balanced for residual effects. The animals were fed with diets containing approximately 80% concentrate with different N sources: Urea (high ruminal degradability); dry corn grain by distillation (DDG, intermediate degradability); or gluten corn 60 (low degradability). The developed equations to express flow and N_{mic} synthesis in RNA and ^{15}N through OCFA method are consistent with the observed values. The RNA marker calculated by OCFA underestimated the N_{mic} synthesis efficiency per kg of total digestible nutrients (TDN, $P = 0.003$) when compared to ^{15}N calculated through OCFA, and also underestimated the N_{mic} flow ($P = 0.027$) when compared to ^{15}N observed. It is concluded both RNA and OCFA are markers capable of replacing ^{15}N for flow quantification and expressed microbial efficiency in relation to total carbohydrates fermented in the rumen (TC) and organic material truly fermented in the rumen (OMTFR).

Key words: odd-chain fatty acids, purine bases, ^{15}N .

3. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (Nmic) sintetizado no rúmen é caracterizado como a principal fonte de proteína metabolizável (PM) para ruminantes (Poppi & McLennan, 1995), devido a sua alta digestibilidade no intestino. São estes em sua maioria que irão fornecer aminoácidos viáveis para o desenvolvimento dos tecidos, uma vez que seu perfil aminoacídico é semelhante à proteína dos tecidos do próprio animal (NRC, 2000). Contudo, a síntese de Nmic pode ser afetada pela composição da dieta sendo o teor de proteína degradável no rúmen (PDR) e a taxa de diluição, os fatores chave para incrementos na eficiência de síntese de Nmic (Firkins & Morrison, 2007), e o suprimento de N, o fator principal quando este nutriente é limitante em sua forma degradável (Poppi & McLennan, 1995).

Segundo Clark et al. (1992) outro fator que apresenta grande influência sobre a síntese de nitrogênio microbiano é o sincronismo entre energia e PDR disponível na dieta. Dessa forma, o desequilíbrio entre disponibilidade de energia e PDR podem afetar a produção e eficiência de síntese de Nmic no rúmen, podendo haver comprometimento da eficiência de uso da proteína metabolizável no intestino.

Por outro lado, dietas em que o Nmic é a principal fonte de proteína metabolizável (PM) para bovinos em crescimento, a metionina pode ser considerada como aminoácido limitante (Batista et al., 2016), e nestes casos a inclusão de fontes de PNDR pode ser uma estratégia para o suprimento de aminoácidos essenciais na PM. No entanto, o uso de fontes de PNDR pode limitar a disponibilidade de N prontamente disponível para ser utilizado para a síntese de Nmic no rúmen. Devido este grande número de fatores que

influenciam a PM que será absorvida pelo animal, é de suma importância à determinação das frações microbianas que farão parte da composição deste nitrogênio.

A mensuração de fluxo e/ou síntese de nitrogênio microbiano pode ser classificadas em três categorias: a determinação direta, por contagem de micro-organismos; a determinação indireta, sendo esta por incorporação de elementos externos como o ^{15}N ; o uso de indicadores presentes nos micro-organismos, como o RNA (Carro & Miller, 2002; Br-Corte, 2010; Ipharraguerre et al., 2007), os quais segundo Reynal et al. (2005), são métodos mais extensivamente utilizados para estimar a produção de Nmic. De acordo com Rotta et al. (2014), o ^{15}N e as bases púricas são indicadores microbianos apropriados para estimar a síntese de Nmic devido suas similaridades de resultados.

Os AGCI são componentes da membrana fosfolípídica dos micro-organismos, e podem ser utilizados como marcadores por serem considerados de origem microbiana (Castro-Montoya et al., 2016) e por não apresentarem síntese endógena (Vaz et al., 2006). Até o momento, poucos estudos têm avaliado este marcador para determinar fluxo duodenal de Nmic, sobretudo em bovinos de corte confinados recebendo dietas ricas em concentrado.

Castro-Montoya et al. (2016), avaliaram os AGCI do leite como marcador microbiano em vacas em lactação e não obtiveram resultados consistentes. Contudo, os autores relataram que as prováveis diferenças nas taxas de absorção de cada AGCI, o modo de transporte no sangue e a síntese *de novo* na glândula mamária podem explicar a inconsistência dos resultados. Assim, a quantificação dos AGCI na digesta duodenal e *pellet* microbiano pode ser uma alternativa mais adequada para a utilização deste marcador microbiano para as estimativas de produção e fluxo de Nmic.

Mediante o exposto, as hipóteses a serem testadas neste estudo são que o AGCI e as bases púricas podem ser utilizados como marcadores microbianos em substituição ao ^{15}N em dietas ricas em concentrado com diferentes fontes de proteína.

O objetivo deste estudo é comparar o uso de métodos alternativos (bases púricas e AGCI) ao ^{15}N , como marcadores microbianos para quantificar o fluxo e síntese de nitrogênio microbiano em bovinos Nelore confinados recebendo dietas ricas em concentrado com diferentes fontes de proteína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, Animais e Dietas

O estudo foi conduzido no setor de Avaliação de Alimentos e Digestibilidade do Departamento de Zootecnia da FCAV-UNESP, Campus Jaboticabal e todos os procedimentos experimentais aplicados neste projeto, seguiram os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da FCAV-UNESP (Protocolo 16.688/16).

Foram utilizados seis novilhos Nelore castrados, canulados no rúmen e duodeno (peso corporal médio de $354 \pm 26,4$ kg e idade média de 18 meses). Os animais utilizados foram alocados em baias individuais cobertas (12 m^2), com piso cimentado e equipadas com cochos e bebedouro individuais. O experimento teve duração de 138 dias, com seis períodos experimentais de 23 dias, sendo 14 dias para adaptação às dietas experimentais (Machado et al., 2016) e instalações e 9 dias para as coletas de dados.

As dietas experimentais utilizadas foram compostas por aproximadamente 80% de concentrado e formuladas para serem isoenergéticas de acordo com Br-Corte (2016)

para atender níveis de manutenção. O glúten de milho 60, e o DDG foram utilizados como fontes de PNDR nas dietas experimentais com baixa e intermediária degradabilidade ruminal, respectivamente. A ureia foi selecionada por ser uma fonte de N completamente disponível no rúmen. A fonte de volumoso utilizada foi cana de açúcar picada *in natura*. As dietas totais foram fornecidas às 6h e às 16h. Durante todo o experimento, as sobras dos alimentos deixadas por cada animal, foram retiradas e pesadas antes da próxima oferta matinal, para permitir uma sobra de 10% de matéria natural (MN). A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e bromatológica das dietas experimentais (%MS).

Ingredientes	Dietas		
	Ureia	Glúten	DDG
Cana	15,8	16,7	17,4
Milho	76,4	72,0	63,0
Farelo de Soja	4,12		
DDG			17,1
Glúten		8,81	
Ureia	1,12		
Premix	2,55	2,49	2,45
Composição bromatológica			
MS	78,0	78,6	78,9
MO	95,5	95,7	95,8
PB	13,3	12,8	12,5
FDN	23,1	25,9	30,0
EE	4,57	4,38	4,76

DDG = Grãos secos por destilação oriundos do processamento do milho; MS = Matéria Seca; MO = Matéria Orgânica; PB = Proteína Bruta; FDN = Fibra em Detergente Neutro; EE = extrato etéreo.

4.2 Estimativa do Fluxo de Digesta Duodenal

O fluxo de matéria seca (MS) duodenal foi estimado utilizando a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador da fase única (Udén et al., 1980).

Do 15º ao 17º dia de cada período experimental, amostras de digesta duodenal (250 mL/animal) foram obtidas em intervalos de 9 horas entre as coletas de cada dia. No 15º dia, coletas foram realizadas às 06h00 e 15h00, no 16º dia às 00h00, 09h00 e 18h00, no 17º dia às 03h00, 12h00 e 21h00 para representação do fluxo diário (Allen & Linton, 2007). Imediatamente após a coleta, as amostras de digesta duodenal foram divididas em duas partes: uma para estimar o fluxo de digesta, composta pela digesta duodenal não representativa (DNR) 375 mL e outra para o isolamento microbiano (425 mL).

4.3 Marcadores Microbianos

4.3.1 Bases Púricas - RNA

As análises das bases púricas foram realizadas nas fases isoladas das bactérias (bactérias associadas à fase sólida - BAS e bactérias associadas à fase líquida – BAL) e na DNR, de acordo com Ushida et al. (1985) adaptado para a hidrólise dos nucleotídeos pelo ácido perclórico (Makkar & Becker, 1999) e para a solução de precipitação de purinas livres com nitrato de prata (Obispo & Dehority, 1999) para a estimativa da fração de N microbiano que chega no intestino delgado para ser absorvido.

4.3.2 ¹⁵N

Para a estimativa do fluxo e síntese de nitrogênio microbiano, no 18º dia de cada período, um cateter temporário foi colocado na veia jugular direita de cada novilho para infusão de ¹⁵N-¹⁵N (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, EUA; 98% de pureza). O cateter (1,02 mm d.i., 1,78 mm d.e.; Tygon[®], S-54-HL), foi inserido 15 centímetros dentro da veia por punção venosa percutânea utilizando-se agulha

hipodérmica ($2,5 \times 110$ mm). Após a colocação do cateter, para evitar a perda de permeabilidade, foi infundida continuamente solução salina (0,9% NaCl e 10 UI heparina/mL) até as 06h00 do 19º dia, momento em que foi iniciada a infusão de ^{15}N - ^{15}N .

Antes da infusão, foram produzidos 410 mL de solução contendo 2,6 g de ^{15}N - ^{15}N /L, necessária para 82 horas de infusão para cada animal em cada período. A solução de ^{15}N - ^{15}N foi preparada utilizando técnicas estéreis em câmara de fluxo laminar, filtrada em filtro bacteriológico (0,22 μm ; Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em recipiente de vidro esterilizado, tampado com septo de borracha esterilizado e armazenado a 4°C até à sua utilização. A solução de ^{15}N - ^{15}N foi infundida continuamente com a taxa de infusão de 5,00 mL/h, permitindo liberar 0,610 mmol de N-ureia/h, utilizando-se bomba de infusão de seringa (BS-9000 Multi-Phaser, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) até o 22º dia às 16h00.

No 22º dia para mensurar o enriquecimento de ^{15}N na Nmic foram tomadas amostras de digesta duodenal (300 mL/coleta) 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas após a alimentação matinal (06h00), formando uma amostra única e adaptando aos horários das coletas efetuadas por Titgemeyer et al. (2012). O período de coleta compreende 72 a 82 horas de infusão, período no qual o enriquecimento isotópico de ^{15}N terá atingido o platô conforme protocolo de coleta validado por Wickersham et al. (2009). Ao final das coletas as amostras foram direcionadas ao isolamento microbiano, de acordo com Reynal et al. (2005) com modificações sugeridas por Kriszan et al. (2010), onde foram separadas em BAL e BAS e posteriormente foram congeladas para posterior liofilização (-20° C).

As análises de ^{15}N foram realizadas nas fases isoladas das bactérias (BAL e BAS) e na digesta duodenal (DNR), de acordo com Ushida et al. (1985) para a estimativa da fração de N microbiano que chega no intestino delgado para ser absorvido.

4.3.3 Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar – AGCI

Os AGCI foram analisados nas fases isoladas das bactérias (BAL e BAS) e posteriormente somadas, e nas amostras de DNR de acordo com a metodologia descrita por Palmquist & Jenkins (2003) com leitura realizada por cromatografia gasosa (CG Modelo Shimatzu 20-10, com injeção automática; Shimatzu Corporation, Kyoto, Japão) utilizando uma coluna SP-2560 (100 m \times 0.25 mm de diâmetro, 0.02 mm de espessura; Supelco, Bellefonte, PA, USA), padrão interno de Éster Metílico de Ácido Nonadecanoico, (C:19 SIGMA-ALDRICH) e hidrogênio como gás carreador. Regressões lineares foram desenvolvidas para cada ácido graxo estudado em questão (C₁₁; C₁₃; C₁₅; C_{15:1}; C₁₇; C_{17:1}; C₂₁) para estimar concentração. As concentrações de cada amostra foram somadas e ao final foi obtido AGCI em g/dia.

4.4 Cálculos

O fluxo ruminal foi avaliado e calculado baseado no sistema único de indicador (marcação na digesta total) considerando o FDNi como marcador da fase sólida.

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com Weiss (1999):

$$NDT = PBd + FDNd + CNFd + (2,25 \text{ EEd})$$

Onde: PBd = proteína bruta digestível; $FDNd$ = fibra em detergente neutro digestível; $CNFd$ = carboidratos não fibrosos digestíveis; EEd = extrato etéreo digestível, todos representados pelas frações digestíveis da dieta (kg/dia).

Os carboidratos totais fermentados no rúmen (CT) foram calculados pela seguinte fórmula:

$$CT = MO - (PB + EE)$$

Em que: MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta e EE = extrato etéreo, todas as composições advindas da dieta (kg/dia)

A matéria orgânica (MO) verdadeira fermentada no rúmen (MOVFR) foi calculada pela equação:

$$MOVFR = \text{ingestão de MO} \left(\frac{g}{dia} \right) - [MO \text{ duodenal} \left(\frac{g}{dia} \right) + MO \text{ microbiana} \left(\frac{g}{dia} \right)]$$

O fluxo de N_{mic} total (g/dia) foi calculado a partir de correlações entre BAL, BAS e DNR, e a eficiência microbiana foi calculada pela equação:

$$\text{Eficiência Microbiana} \left(\frac{gN_{mic}}{Kgbase} \right) = \frac{\text{Fluxo } N_{mic} \left(\frac{g}{dia} \right)}{\text{Base} \left(\frac{kg}{dia} \right)}$$

Onde a base representa NDT, CT ou MOVFR.

O fluxo de Nitrogênio microbiano (g/dia) e a eficiência microbiana (g N_{mic} /kgbase) pelos marcadores ^{15}N e RNA foram observados, por se tratarem de valores associativos a proteína bruta (PB) corrigida na matéria seca da amostra. Contudo, no AGCI, como os valores são expressos em extrato etéreo (EE) corrigidos na matéria seca, e por não existir na literatura um fator de correção para a transformação do EE para N ou PB, regressões foram desenvolvidas segundo Vlaeminck et al. (2005), para prever relação entre N microbiano pelo marcador ^{15}N e valores obtidos de AGCI g/dia, e relação N microbiano pelo marcador RNA-AGCI g/dia.

4.5 Análises Laboratoriais

Ao final dos períodos experimentais, amostras individuais das dietas, sobras e fezes enriquecidas com ^{15}N foram descongeladas e pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C , durante 72h, moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm. Amostras de digesta duodenal e *pellet* microbiano foram descongeladas e liofilizadas. Posteriormente análises bromatológicas foram realizadas: determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C por 24h; matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990). O nitrogênio total foi analisado pelo método de DUMAS utilizando o equipamento Leco-FP 528 LC (2013 LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA), de acordo com o protocolo descrito por Etheridge et al. (1998) e convertido para proteína bruta (PB) utilizando-se o fator de 6,25. A fibra em detergente neutro (FDN) foi estimada seguindo a metodologia descrita por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase termoestável, sem adição de sulfato de sódio e adaptado para o analisador de fibra ANKOM 200 (ANKOM Technology, Fairport, NY).

O enriquecimento de ^{15}N foi determinado em analisador elementar de isótopos estáveis (Thermo Finnigan Delta Plus, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

A FDN_i foi quantificada em triplicata nas amostras de digestas coletadas no duodeno, nas sobras e alimentos. As amostras utilizadas para a estimativa do FDN_i foram moídas em moinho com peneira de 2 mm e incubadas *in situ* por 288 horas, conforme recomendado por Valente et al. (2011).

4.6 Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi quadrado latino 6×6 balanceado para efeitos residuais, em um arranjo fatorial (3×3), sendo 3 dietas e 3 métodos de análises (AGCI, Bases púricas e ^{15}N). Os efeitos fixos foram considerados marcadores e fontes, e os efeitos aleatórios correspondem ao período, animal e resíduos correspondentes para o modelo. Os resultados foram avaliados quanto à homocedasticidade das variâncias a partir do Teste de Bartlett e normalidade dos dados a partir do Teste Shapiro-Wilk utilizando o Software R versão 3.5.0. Diferentes níveis de proteína contidos nas dietas, foram blocados estatisticamente. O pós-teste de Tukey foi aplicado quando a ANOVA indicasse diferença significativa para a comparação de médias. Em todos os testes, a significância foi declarada a $P \leq 0,05$.

Regressões lineares, quadráticas e cúbicas foram primeiramente testadas, e o modelo que melhor se encaixou aos dados observados foi à regressão linear simples, seguindo o modelo:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$$

Onde: Y_i = variável aleatória e representa o valor da variável resposta; x_i representa o valor da variável explicativa (variável independente, regressora); e_i variável aleatória que representa o erro experimental; β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo, que serão estimados, e que definem a reta de regressão.

5. RESULTADOS

Regressões lineares foram desenvolvidas segundo Vlaeminck et al. (2005) para prever relação entre fluxo de N microbiano (g/dia) pelo marcador ^{15}N e valores

obtidos de AGCI g/dia (Eq.[1]) e relação fluxo de N microbiano (g/dia) pelo marcador RNA-AGCI g/dia (Eq.[2]), respectivamente:

$$\text{Fluxo Nmic N15} \left(\frac{g}{\text{dia}}\right) = 22,27 + 0,257 \cdot \text{AGCI} \left(\frac{g}{\text{dia}}\right) \quad [1]$$

$$\text{Fluxo Nmic RNA} \left(\frac{g}{\text{dia}}\right) = 4,081 + 0,3341 \cdot \text{AGCI} \left(\frac{g}{\text{dia}}\right) \quad [2]$$

A Figura 1 demonstra a dispersão de dados, e linha de tendência [i.e linha contínua] frente ao intervalo de confiança de 95% [i.e linha pontilhada] nas duas relações testadas.

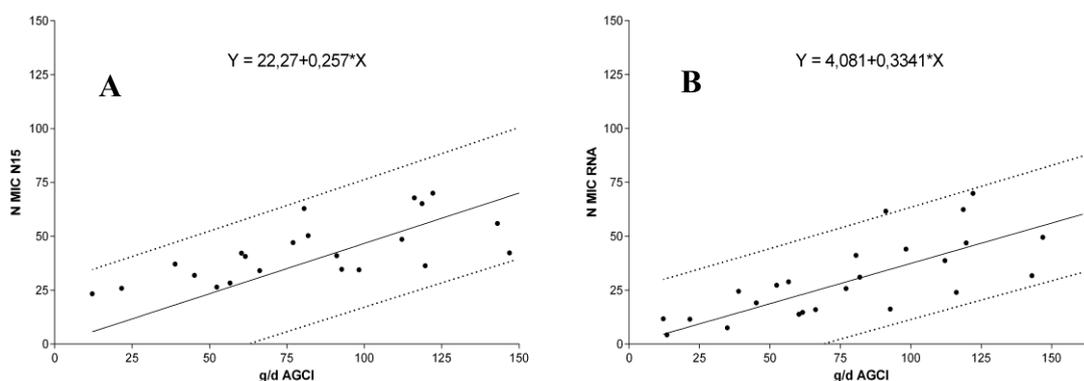


Figura 1. Gráfico da relação entre AGCI (g/dia) e N microbiano (g/dia) calculado sob o método ^{15}N (A) com $r^2 = 0,495$. Relação entre AGCI g/dia e N microbiano (g/dia) calculado sob o método RNA (B) $r^2 = 0,572$.

O teste de Bland-Altman foi realizado para validação metodológica com a análise de concordância entre métodos, a partir da disposição dos dados sob os valores observados e preditos, onde o erro representa a probabilidade dos valores obtidos estarem variando para mais ou para menos, sendo testada a confiabilidade das equações desenvolvidas no estudo (Figura 2).

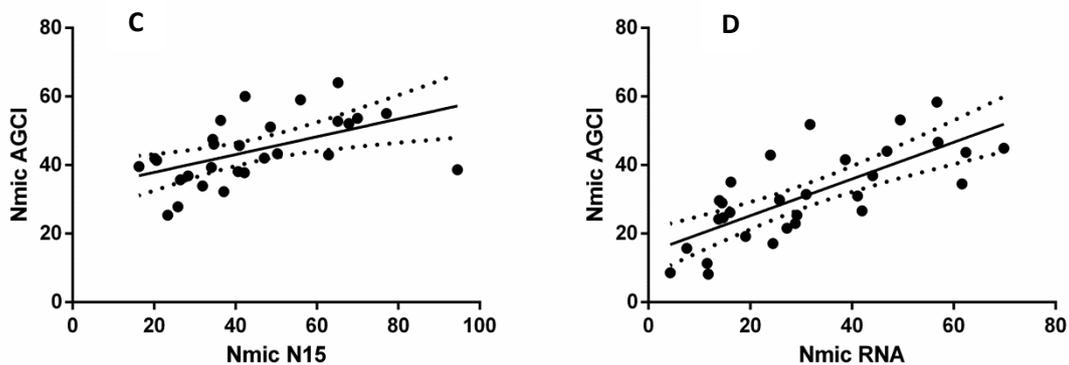


Figura 2. Relação entre fluxo de Nitrogênio Microbiano ^{15}N observado e Equação 1 (C). Relação entre Nitrogênio Microbiano RNA observado e Equação 2 (D).

O bias ou erro da metodologia testada para a Equação 1 foi de 6,29% e para a Equação 2 foi de 8,52%. Após o ajuste do AGCI, os resultados foram comparados entre os tratamentos propostos (Fonte e Marcadores, Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do fluxo e eficiência microbiana utilizando diferentes marcadores microbianos, em diferentes bases, de bovinos Nelore recebendo dietas de alto grão com diferentes fontes de proteína.

Item	Marcador/Dietas												P-Valor			
	¹⁵ N			¹⁵ N-AGCI			RNA			RNA-AGCI			EPM	M	F	M*F
	UR	DDG	GL	UR	DDG	GL	UR	DDG	GL	UR	DDG	GL				
Eficiência de Síntese Nmic																
Nmic NDT (gNmic/kgNDT)	7,11	10,4	9,91	9,15	10,69	10,22	8,00	7,79	8,01	6,27	7,55	6,38	0,528	0,003	0,180	0,783
Nmic CT (gNmic/kgCT)	16,2	17,5	17,2	14,5	18,8	17,6	12,9	14,8	15,3	10,0	14,4	11,0	1,009	0,039	0,208	0,989
Nmic MOVFR (gNmic/kgMOVFR)	9,40	9,17	11,2	10,7	11,3	11,7	12,8	11,0	10,9	7,49	8,60	8,27	0,783	0,126	0,831	0,999
Fluxo																
Nmic (g/dia)	43,1	48,6	44,1	41,4	44,4	40,4	37,4	37,7	36,6	29,0	32,9	27,7	2,501	0,027	0,728	0,981

UR = Ureia; DDG = Grãos secos por destilação oriundo do processamento do milho; GL = Glúten de milho 60; EPM = Erro padrão da média; M = marcador; F = fonte; M*F = interação entre marcador e fonte; NDT = Nutrientes Digestíveis Totais; CT = Carboidratos Totais Fermentados no Rúmen; MOVFR = Matéria Orgânica Verdadeiramente Fermentada no Rúmen.

Não houve interação entre fonte e marcador ($P > 0,05$) para nenhum parâmetro avaliado. A fonte de PB não afetou o fluxo de Nmic ($P = 0,728$) e eficiência de síntese N microbiano calculado nas diferentes bases (NDT, CT e MOVFR, $P = 0,180$; $P = 0,208$; $P = 0,831$, respectivamente, Tabela 2).

De uma maneira geral, observou-se valores de eficiência microbiana abaixo do esperado, onde a eficiência microbiana, base NDT, foi subestimada quando calculada através do marcador RNA-AGCI ($P = 0,003$) quando comparada a eficiência Nmic encontrada através do ^{15}N -AGCI ($\bar{X} = 6,73$; $\bar{X} = 10,02$). Este efeito se dá pela dificuldade de comparação entre duas relações preditas entre si, aplicada a diferentes métodos de estimativa de N microbiano, uma vez que só é possível fazer relação entre modelos, quando aplicado o contraste ortogonal. Adicionalmente, faz-se importante salientar que o modelo predito deve ser analisado somente ao método observado, para ser passível de comparação, uma vez ^{15}N e RNA foram calculados de maneiras distintas. Isso explica o efeito encontrado na relação entre o RNA-AGCI predito quando relacionado ao ^{15}N calculado, na variável fluxo de Nmic ($\bar{X} = 29,91$; $\bar{X} = 45,34$). Os demais marcadores não diferiram entre si ($P > 0,05$, Tabela 2).

6. DISCUSSÃO

Ingredientes com diferentes fontes de PNDR não afetaram o fluxo ($P = 0,728$) e a eficiência de síntese microbiana nas diferentes bases, NDT, CT, MOVFR ($P = 0,180$; $P = 0,208$; $P = 0,831$ respectivamente), pois com o fornecimento de uma dieta balanceada em níveis proteicos e energéticos, possibilitou o suprimento das exigências de proteína e energia metabolizável pelo animal, oferecendo recursos suficientes para que bactérias

mantivessem seu crescimento dentro do rúmen via fonte de PDR, além do suprimento de aminoácidos essenciais via fontes de PNDR (Santos et al, 2016; Wickersham et al., 2008).

Os baixos valores de eficiência microbiana encontrados no estudo, equiparados a resultados como BR- Corte (2016) e Rotta et al. (2014), podem estar relacionados à redução no consumo dos animais observado durante o período experimental. Estudos reportam à mudança de comportamento ingestivo, principalmente de bovinos da raça Nelore, quando métodos invasivos, como fístulas, são incorporados ao estudo (De Tonissi et al., 2003).

A ausência de efeito entre os marcadores ^{15}N e RNA na quantificação de fluxo de N_{mic} ($P = 0,05$) e eficiência de síntese nas bases, concordam com dados da literatura (Carro & Miller 2002; Rotta et al., 2014; Mariz et al., 2018), que também não encontraram efeito entre estes marcadores. Os resultados sugerem que as bases púricas podem ser utilizadas de forma eficaz em substituição ao marcador ^{15}N , apresentando resultados de confiabilidade e obtendo vantagens sobre o método, por ser um marcador interno, ser menos laborioso, e possuir um custo de utilização inferior.

Neste mesmo sentido, os AGCI demonstram bom potencial como marcador microbiano para estimar o fluxo e a eficiência microbiana, quando calculados pela relação de predição ^{15}N ou RNA-AGCI. Quando comparado com Vlaeminck et al. (2005) que predisseram RNA e Uracil pelo AGCI, encontramos valores de R^2 menores ($r^2 = 0,495$; $r^2 = 0,527$) se comparado ao estudo em questão ($r^2 = 0,716$; $r^2 = 0,780$; $r^2 = 0,780$; $r^2 = 0,828$). Além disso, podemos observar que os valores de erro (bias) quando realizado o teste para validar a metodologia, foram similares ($e = 6,29\%$; $e = 8,52\%$) aos

encontrados por Vlaeminck et al. 2005 ($e = 5,39\%$; $e = 7,28\%$), o que confere confiabilidade as equações propostas no presente estudo.

Suas vantagens em relação ao método ^{15}N abrangem, a não necessidade de infusão no animal, considerada uma técnica invasiva, a sua análise por cromatografia gasosa pode ser mais facilmente realizadas nos laboratórios brasileiros do que se comparado à análise minuciosa da espectrometria de massas (^{15}N), e principalmente o custo para sua determinação ser significativamente inferior. Poucos estudos com bovinos de corte utilizando AGCI como marcadores microbianos são encontrados na literatura e até o presente momento não foram reportados estudos que compararam o método ouro (^{15}N) à predição do AGCI, como este estudo promove.

Os benefícios de utilização do AGCI em comparação as bases púricas (RNA) incluem a maior facilidade de execução da metodologia, uma vez que respeitando os processos descritos por Palmquist & Jenkins (2003) é possível uma execução bem sucedida. Já com as bases púricas, destaca-se a sensibilidade do método e devido à instabilidade do RNA (Popova et al., 2010). A execução precisa ser realizada com cautela, onde um erro cometido te retorna ao primeiro passo da metodologia. A hidrólise dos nucleotídeos bem como a precipitação das purinas precisam de atenção, refletindo em variação das absorbâncias de uma mesma amostra caso realizadas erroneamente. Além disso, esta metodologia onera mais tempo, vidrarias e reagentes para ser realizada, se comparada à metodologia do AGCI.

7. CONCLUSÃO

Os marcadores alternativos RNA e AGCI são capazes de substituir o ^{15}N para quantificação do fluxo de N_{mic} e eficiência microbiana. As equações geradas para

expressar AGCI através dos métodos ^{15}N e RNA são condizentes com os valores observados e confiáveis frente aos valores calculados, justificados pelo baixo erro (bias) encontrado, e sendo a eficiência microbiana melhor expressa pela equação ^{15}N -AGCI tanto na base de MOVFR quanto na CT.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.S.; LINTON, J.A.V. In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: **Simpósio Internacional de Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. p.72–89, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists, **15th ed. Association of Official Analytical Methods Inc.**, Washington D.C., USA, 1990.

BATISTA, E.D.; HUSSEIN, A.H.; DETMANN, E.; MIESNER, M.D.; TITGEMEYER, E.C. Efficiency of lysine utilization by growing steers. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 648-655, 2016.

CARRO, M.D.; MILLER, E.L. Comparison of microbial markers (^{15}N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**, v. 75, p. 315-321, 2002.

CASTRO-MONTOYA, J.; HENKE, A.; MOLKENTIN, J.; KNAPPSTEIN, K.; SUSENBETH, A.; DICKHOEFER, U. Relationship between milk odd and branched-chain fatty acids and urinary purine derivatives in dairy cows supplemented with quebracho tannins - A study to test milk fatty acids as predictors of rumen microbial protein synthesis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 22-33, 2016.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy Cows¹. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

DE TONISSI, R. H.; DE GOES, B.; MANCIO, A. B.; DE PAULA, R.; QUEIROZ, A. M. L. Desempenho de novilhos Nelore em pastejo na época das águas: ganho de peso, consumo e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p. 214-221, 2003.

ETHERIDGE, R.D.; PESTI, G.M.; FOSTER, E.H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, p. 21-28, 1998.

FIRKINS, J. L.; YU, Z.; MORRISON, M. Ruminant Nitrogen Metabolism: Perspectives for Integration of Microbiology and Nutrition for Dairy 1, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E1-E16, 2007.

IPHARRAGUERRE, I.R.; REYNAL, S. M.; LINEIRO, M.; BRODERICK, G. A.; CLARK, J. H. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the post ruminal supply of nutrients in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1904-1919, 2007.

KRIZSAN, S.J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G.A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 1138-1147, 2010.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. **British Journal of Nutrition**, v.81, n.2, p. 107-112, 1999.

MARIZ, L. D. S.; AMARAL, P. M.; VALADARES FILHO, S. C.; SANTOS, S. A.; DETMANN, E.; MARCONDES, M. I.; FACIOLA, A. P. Dietary protein reduction on microbial protein, amino acid digestibility, and body retention in beef cattle: 2. Amino acid intestinal absorption and their efficiency for whole-body deposition. **Journal of Animal Science**, v.96, p. 670-683, 2018.

NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle. Updated 7th. ed. **National Academic Press**, Washington, DC, p. 242, 2000.

OBISPO N.E.; DEHORITY B.A. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 3084-3095, 1999.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 3250-3254, 2003.

PINA, D.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L. Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana. In: **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados – BR CORTE**. Suprema Gráfica Ltda, Viçosa, MG, Brasil, 2010.

PINA, D.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L. Síntese de proteína microbiana. In: **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados – BR CORTE**. Suprema Gráfica Ltda, Viçosa, MG, Brasil, 2016.

POPOVA, M.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P. Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. **Folia microbiologica**, v. 55, n. 4, p. 368-372, 2010.

POPPI, D.P.; MCLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.

REYNAL, S.M.; BRODERICK, G.A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4065-4082, 2005.

ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F.; DETMANN, E.; VILLADIEGO, F.A.C.; ENGLE, T.E.; VALADARES, R.F.D.; SILVA, B.C.; PACHECO, M.V.C.; ZANETTI, D. Comparison of purine bases and 15 N for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu cross breed bulls. **Livestock Science**, v.167, p. 144-153, 2014.

TITGEMEYER, E.C.; SPIVEY, K.S.; PARR, S.L.; BRAKE, D.W.; JONES, M.L. Relationship of whole body nitrogen utilization to urea kinetics in growing steers. **Journal of Animal Science**, v.90, p.3515–3526, 2012.

ÚDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal Science Food Agricultural**, v.31, p. 625-632, 1980.

USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. **Reproduction Nutrition Development**, v.25, p. 1037-1046, 1985.

VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; VALADARES FILHO, S. C.; GOMES, D. I.; FIGUEIRAS, J.F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from diferente textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p. 2565-2573, 2011.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583–3597, 1991.

VAZ, J. D. S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M. J. D.; GROSS, J. L.; ZELMANOVITZ, T. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição. Campinas**. v. 19, n. 4, p. 489-500, 2006.

VLAEMINCK, B.; DUFOUR, C.; VAN VUUREN, A. M.; CABRITA, A. R. J.; DEWHURST, R. J.; DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Use of odd and branched-chain fatty acids in rumen contents and milk as a potential microbial marker. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.1031-1042, 2005.

WICKERSHAM, T.A.; TITGEMEYER, E.C.; COCHRAN, R.C. Methodology for concurrent determination of urea kinetics and the capture of recycled urea nitrogen by ruminal microbes in cattle. **Animal**, v.3, p.372-379, 2009.