

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

ROSANA RUEGGER PEREIRA DA SILVA CORTE

**Substituição do Farelo de Soja por Fontes de
Nitrogênio Não-Protéico em Bovinos Nelore**

Pirassununga, SP

2012

ROSANA RUEGGER PEREIRA DA SILVA CORTE

**Substituição do Farelo de Soja por Fontes de
Nitrogênio Não-Protéico em Bovinos Nelore**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia
Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Zootecnia

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador: Pr. Dr. José Carlos Machado Nogueira
Filho

Pirassununga, SP

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Corte, Rosana Ruegger Pereira da Silva
C827s Substituição do farelo de soja por fontes de nitrogênio não-protéico em bovinos Nelore / Rosana Ruegger Pereira da Silva Corte. -- Pirassununga, 2012.
126 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho.

1. Bovinos 2. Confinamento 3. Nitrogênio não protéico
4. Optigen 5. Uréia. I. Título.

Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho.

1. Bovinos 2. Confinamento 3. Nitrogênio não protéico
4. Optigen 5. Uréia. I. Título.

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais Rosa e Ernando, pela dedicação e amor
incondicionais dispensados a mim.*

Ao amor da minha vida, meu marido Ruy.

A razão da minha vida, meu filho Jorginho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sem o qual minha vida não existiria e sem o qual não me imagino viver.

Aos animais, os quais foram utilizados na condução dos estudos, para a conclusão do doutorado.

A todos aos meus professores da faculdade, os quais me transmitiram conhecimento suficiente para chegar até aqui.

A minha segunda mãe, a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, a qual me acolheu como aluna desde a graduação e me proporcionou muitas oportunidades, através das quais me permitiu crescer profissionalmente, pessoalmente e principalmente fazer muitos amigos.

Ao meu orientador o Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho, o qual me orientou e auxiliou em todos os momentos e principalmente nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leme, o qual sempre me apoiou, auxiliou, ensinou e, sobretudo me incentivou.

A CAPES pela minha bolsa de doutorado e minha bolsa de doutorado PDEE, a qual me proporcionou realizar parte do meu doutorado na Texas A&M University.

Ao Prof. Dr. Luís Orlindo Tedeschi por me orientar durante meu estágio no exterior.

A FAPESP pelo auxílio financeiro, o qual permitiu a realização destes estudos.

A Empresa Alltech, em especial ao Dr Marcelo Manella, pelo apoio financeiro do projeto e congressos, que me permitiu conhecer muitos pesquisadores e inovações em minha área de atuação e principalmente crescer profissionalmente.

Ao meu colega de pós-graduação Fernando de Oliveira Brito, o qual me auxiliou e apoiou na execução dos projetos.

A minha amiga Prof. Dr. Angelica Simone Cravo Pereira, por sempre me apoiar e me auxiliar nos momentos de alegria, mas principalmente nos momentos de dificuldade.

A minha mais recente amiga e companheira Prof. Dr. Roberta Ariboni Brandi, a qual não mediu esforços para me auxiliar na conclusão da minha Tese .

Aos meus amigos Dra. Luciane Martello e Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, os quais também sempre me auxiliaram e me aconselharam.

Aos meus colegas de pós-graduação, Amoracyr, Letícia Zopa, Letícia, Madeline, Claiton, Ana Karina e Thais, pelos momentos de descontração e ajuda.

Aos meus amigos Mateus e Cristiane, por me apoiarem e tornarem os momentos no estágio na Texas A&M mais descontraídos.

Aos Professores Francisco de Palma Rennó e Luiz Felipe Prada e Silva e ao colega e doutorando José Esler de Freitas Júnior, no auxílio e execução de algumas análises.

Aos Professores Evaldo Lecione Titto, Júlio Balieiro, Jose Bento Sterman Ferraz, pelos auxílios, conselhos e momentos de descontração.

A todos os estagiários que me auxiliaram neste projeto: Dayane Macedo, Fernando Mercado, Felipe Calochi, Bruno Lapo Utembergue, Rodolfo, Viviam Biglia e Zoinho.

Aos funcionários da USP, Mané, Ricardinho, Zanca, João, Elso, Mario, Beloni, Seu Dito, Seu Dorival, Rose, Rosilda, Rafael.

Aos funcionários da Pós-graduação, pela paciência e suporte durante estes anos de doutorado.

Ao meu grande incentivador e companheiro tanto profissionalmente, quanto pessoalmente, meu grande amor, meu marido Ruy, sem o qual, não seria possível eu chegar até aqui. Não seria plausível expressar em palavras tudo o que fez por mim.

Ao meu filho Jorginho, a razão da minha vida e meu amor, pelos momentos de alegria e amor.

Aos meus queridos pais Ernando e Rosa, os quais sempre me educaram com carinho e amor, me ensinando com humildade e sabedoria os conceitos fundamentais e me preparando para se tentar vencer na vida e principalmente me mostrando princípios.

Em especial a minha mãe e ao Ruy, por me apoiarem e me acompanharem física e psicologicamente durante meu estagio no exterior. Sem o apoio de vocês não seria possível!

Aos meus irmãos Rachel e Jorge, pela convivência, carinho e conselhos. Não imagino minha vida sem vocês!

Aos meus avós maternos Dalva e Jorge, os quais sempre me incentivaram ao estudo.

A minha família “adquirida”, Dirceu, Ana Luiza, Nelyanna, Anna Lara, Felipe e Eloah, os quais sempre me apoiaram e auxiliaram.

A todos aqui mencionados, meus sinceros agradecimentos!

Minha obrigação como cidadã e futura pesquisadora é retribuir ao meu país todo o investimento em mim depositado, aplicando meus conhecimentos com respeito e sabedoria.

Nada é mais prazeroso que adquirir conhecimento e aplica-lo através da ciência. O conhecimento nos torna seres diferenciados, críticos, engajados.

Aprendi nestes anos de doutorado que trabalhar com humildade, respeito e dedicação leva-nos a vencer desafios e abrir novas fronteiras, as quais nos direcionam para vencer.

Rosana R.P.S.Corte

"Os conceitos e princípios fundamentais da ciência são invenções livres do espírito humano." (Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Representação esquemática da degradação protéica e dos produtos finais no rumen (Bach et al., 2005)	24
Figura 2.Metabolismo do Nitrogênio no rúmen (Cherdthong, 2010).....	26
Figura 3.Esquema dos Períodos Experimentais.....	71
Figura 4.Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, no tempo após a alimentação em função das dietas experimentais.....	87
Figura 5.Expressão relativa da bactéria Streptococcus Bovis do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais	91
Figura 6.Expressão relativa da bactéria Fibrobacter succinogenes do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais	93
Figura 7.Expressão relativa da bactéria Ruminococcus albus do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Composição Percentual dos ingredientes e composição química das dietas experimentais	48
Tabela 2.Composição Percentual dos ingredientes e composição química das dietas experimentais	49
Tabela 3.Composição Química dos Ingredientes das Dietas Experimentais.....	50
Tabela 4. Análise de variância Experimento.....	55
Tabela 5.Médias, erros-padrões da média e valores de P das características peso vivo inicial, peso vivo final, ganho médio diário, ingestão de matéria seca, eficiência alimentar em função das dietas experimentais.	56
Tabela 6. Médias, erros-padrões da média e valores de P das características peso de carcaça quente (PCQ), rendimento de carcaça quente (RCQ), área do olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) em função das dietas experimentais	59
Tabela7.Médias, erros-padrões e probabilidades (P) das características pH, Temperatura, L*, a* e b*, força de cisalhamento (kg), perdas por cocção(%), índice de marmorização e extrato etéreo para as dietas experimentais	61
Tabela 8.Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo	76
Tabela 9.Análise de variância do Experimento	79

Tabela 10. Médias, erros padrões da média e valores de P dos consumos de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), carboidratos totais (CT), fibra em detergente neutro (CFDN), carboidratos não fibrosos (CCN) e nutrientes digestíveis totais (CNDT) obtidos para as dietas experimentais.....	81
Tabela 11. Médias, erros padrões da média e valores de P para os coeficientes de digestibilidade aparentes totais da matéria seca (CDMS), matéria orgânica (CDMO), proteína bruta (CDPB), extrato etéreo (CDEE), carboidratos totais (CDCT), fibra em detergente neutro (CDFDN), e carboidratos não fibrosos (CDCNF) obtidos para as dietas experimentais.....	82
Tabela 12. Médias, coeficientes de variação (CV), valores de P e contrastes para pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃), proporção molar, porcentagem e total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no líquido ruminal, segundo as dietas experimentais	84
Tabela 13. Médias e erros-padrões do número dos protozoários ciliados (x10 ⁴ /mL) do conteúdo ruminal de novilhos Nelore em diferentes tempos de alimentação	88
Tabela 14. Médias e erros-padrões do número dos protozoários ciliados (x10 ⁴ /mL) do conteúdo ruminal de novilhos Nelore recebendo diferentes fontes de proteína.	89
Tabela 15. Médias, coeficientes de variação (CV) e valores de P dos contrastes da excreção total de urina (ETU), das concentrações de alantoína (AL), do ácido úrico (AU), da alantoína em % de purinas totais (AL %), das purinas totais (PT), purinas microbianas absorvidas (Pabs), do nitrogênio microbiano (Nmic), da proteína bruta microbiana (Pmic) na urina e da uréia (URE) na urina função das dietas experimentais.....	95

Tabela 16.Médias, coeficientes de variação (CV) e valores de P dos contrastes das concentrações sanguíneas das proteínas totais (PT), albumina (ALB), glicose (GLI), uréia (URE), nitrogênio uréico no soro (NUS), gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) em função das dietas experimentais.....	98
--	----

SUMÁRIO

1. <u>CAPÍTULO 1</u>	18
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
REVISÃO DE LITERATURA	22
PROTEÍNAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES.....	22
FONTES DE NITROGÊNIO NÃO PROTEICO	25
URÉIA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES	27
URÉIA DE LIBERAÇÃO LENTA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES.....	28
DESEMPENHO, QUALIDADE DA CARÇAÇA E DA CARNE.....	30
DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	33
FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	34
PROTEÍNA MICROBIANA.....	37
MICROORGANISMOS	39
PARÂMETROS SANGUÍNEOS.....	41
2. <u>CAPÍTULO 2</u>	42
SUBSTITUIÇÃO DO FARELO DE SOJA POR URÉIA OU URÉIA DE LIBERAÇÃO LENTA SOBRE OS PARÂMETROS DE DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA E NA QUALIDADE DA CARNE DE NOVILHOS NELORE EM TERMINAÇÃO	43
RESUMO	43

ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	63
IMPLICAÇÕES	63
3. <u>CAP 3</u>	64
<p style="text-align: center;">EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DO FARELO DE SOJA POR URÉIA OU URÉIA DE LIBERAÇÃO LENTA NA DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL, PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA, QUANTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS RUMINAIS E PARÂMETROS RUMINAIS E SANGUÍNEOS DE NOVILHOS NELORE.....</p>	
RESUMO	65
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	101
IMPLICAÇÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Atualmente o grande desafio é produzir alimentos para um mundo em constante crescimento, preservando o meio ambiente e os recursos naturais. aplicando estes conceitos na produção animal, seria criar maior número de animais em menor espaço físico e com ciclos de produção cada vez mais curtos, consumindo menos recursos naturais e gerando menos resíduos para o meio ambiente.

Algumas cadeias de produção animal tiveram grande sucesso empregando alto grau de tecnificação, como a avicultura e a suinocultura, que hoje apresentam sistema de integração na criação, ciclos curtos de produção, frigoríficos de alta capacidade de abate, fatores que possibilitam manter a atratividade comercial para o negócio (Silveira, 2011). Baseado nestes fatos das cadeias produtoras de carne avícola e suínica, a tendência mundial é crescer com tecnologia e sustentabilidade.

O papel principal dos nutricionistas na formulação de dietas para maximizar a produção de ruminantes será aumentar a capacidade de conversão de nutrientes de origem vegetal em proteína animal para consumo humano, reduzir os custos na produção e diminuir a produção de detritos na atmosfera.

Sobre a capacidade de produção de alimentos, o Brasil vem se destacando mundialmente, atualmente possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com 190.925 milhões de cabeças e exportação de 9,030 milhões de toneladas de carcaças em 2011, sendo o maior exportador de carne bovina do mundo (USDA, 2011).

De acordo com o relatório emitido pela USDA (2011), o apoio do governo brasileiro no financiamento para a reconstrução do rebanho, bem como genética e melhorias nas pastagens determinarão um aumento nos estoques de gado no Brasil. Parcerias com fazendeiros, para aumentar a produção em confinamentos, gerarão fluxo de gado terminado durante todo o ano de modo a evitar quebras durante a estação seca, principalmente no centro oeste. Esses fatores, deverão impulsionar a produção para 9,2 milhões de toneladas de carcaças no Brasil em 2012, contribuindo para um aumento de dois por cento em relação a 2011 (USDA, 2011).

Millen et al. (2011) relataram num panorama atual e perspectivas futuras da produção de carne no Brasil que a indústria de confinamentos tem crescido

substancialmente nos últimos oito anos assim como a demanda do mercado externo. De acordo com a ANUALPEC (2011) *apud* Millen et al. (2011), 3.047.717 milhões de animais foram alimentados em confinamento brasileiro em 2010.

Considerando-se o aumento dos confinamentos no Brasil e a necessidade de incremento na eficiência de produção, com redução de custos e resíduos para o meio ambiente, a escolha da dieta é fundamental.

Sabe-se que, dos ingredientes de um concentrado para bovinos ou ruminantes, os protéicos são os mais onerosos e sua utilização implica em maior custo por arroba na terminação de bovinos em confinamento

Com o crescimento do interesse em biocombustíveis, alguns alimentos utilizados nas dietas de ruminantes, antes utilizados na alimentação de não ruminantes e humana, agora também são empregados na indústria energética. O farelo de soja, um dos principais ingredientes proteicos de origem vegetal é um dos que se enquadra nesta realidade.

Com base nestas suposições, faz-se necessário otimizar o uso de proteína pelo ruminante, através da substituição de fontes de proteína vegetal por fontes de nitrogênio não protéico (NNP).

Uma fonte de NNP tem a vantagem de geralmente ser mais barata que uma fonte de proteína verdadeira na mesma quantidade de nitrogênio (Oliveira Junior, 2002).

Uréia é a fonte de NNP mais comumente utilizada em dietas de ruminantes devido a sua disponibilidade e baixo custo. Entretanto, a uréia se dissolve rapidamente na água e é hidrolisada em amônia devido a atividade da urease microbiana (Helmer e Bartley, 1971). Conseqüentemente, a assincronia entre o nitrogênio e energia digestível (proveniente da dieta) ocorre devido a liberação rápida de nitrogênio pela uréia e a amônia em excesso não será utilizada de forma eficiente (Chizzotti et al., 2008), podendo acarretar em sobrecarga de N amoniacal no fígado e gasto maior de energia para a excreção da uréia, além do risco de intoxicação.

Esse problema de utilização da uréia tem levado a busca por formas de utilização de NNP com reduzida taxa de liberação de amônia (Van Soest, 1994).

A utilização do nitrogênio não proteico de liberação gradativa no rúmen pode ser uma estratégia para diminuir a utilização das fontes de proteína verdadeira e da uréia pecuária em dietas para ruminantes, com vantagens de diminuir os riscos de intoxicação por ureia, aumentar o espaço para inclusão de ingredientes na dieta, substituir fontes de proteína verdadeira de alto custo e/ou disponibilidade limitada, podendo ainda melhorar o sincronismo de nutrientes no rúmen, sem comprometer o desempenho produtivo dos animais (Souza et al., 2010).

A fim de investigar a melhor fonte de NNP (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação de uréia e uréia de liberação lenta) na substituição parcial do farelo de soja em bovinos Nelore, o presente trabalho foi desenvolvido primeiramente para avaliar a substituição parcial do farelo de soja por: uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas sobre características de desempenho, carcaça e na qualidade da carne de bovinos Nelore confinados, (Capítulo 2) e em seguida verificar o efeito destas dietas na digestibilidade, produção de proteína microbiana, na população microbiana e nos parâmetros ruminais e sanguíneos de bovinos Nelore, (Capítulo 3).

REVISÃO DE LITERATURA

Proteínas na alimentação de ruminantes

A proteína é um dos ingredientes de custo mais elevado na dieta de ruminantes e a economia na produção é altamente dependente da eficiência de utilização da deste nutriente (Santos et al., 2001).

De acordo com Van Soest (1994), as interações entre dieta, microrganismo e o hospedeiro animal que determinam a energia líquida de proteína do hospedeiro são complexas.

A proteína tem um papel fundamental na nutrição de ruminantes, sendo sua essencialidade não apenas pelo fornecimento de aminoácidos para o animal, mas também como fonte de nitrogênio para síntese de proteína microbiana (Oliveira Junior, 2002).

Hungtinton e Archibeque (1999) em revisão descreveram as fontes dietéticas e endógenas de nitrogênio (N), incluindo os ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, peptídeos, aminas, amidas, nitratos, nitritos, uréia e amônia como dietéticas e as células descamadas e a uréia que retorna ao rúmen através do epitélio ruminal ou na saliva como endógenas.

O NRC (1996) considera o sistema de proteína metabolizável (PM) para calcular os requerimentos protéicos. PM é a quantidade de proteína que é digerida e absorvida e que pode ser utilizada para manutenção e produção do animal (Vasconcelos et al., 2007).

O sistema de PM do NRC (1996) divide os requerimentos protéicos em proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). A PDR é, necessária aos microrganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana . Já a proteína dietética que escapa da fermentação ruminal e vai para o abomaso é a PNDR. Em adição, os microrganismos que escapam do rúmen, fornecem proteína ao hospedeiro (ruminante) na forma de proteína bruta microbiana (PBMic) (NRC, 1985). A soma da PBMic e da PNDR que é digerível no intestino é utilizada para calcular a PM (Vasconcelos et al., 2007).

O suprimento de quantidades adequadas de PDR e PNDR é fundamental para otimizar a produção de proteína microbiana, e assim, suprir as exigências em PM dos animais (Berchielli, Pires e Oliveira, 2006).

O ideal é que o consumo de proteína dietética seja próximo às exigências de PM do animal, já que o consumo excessivo de proteína pode afetar o desempenho reprodutivo do animal, aumentando sua exigência em energia, o custo da ração (Broderick e Clayton, 1997) e a produção de resíduos para o meio ambiente (Tamminga, 1996). A preocupação ambiental com N se deve às perdas por volatilização como amônia e também ao seu potencial de contaminação da água de superfície e do subsolo pelo nitrato (Tamminga, 1996).

Grandes quantidades de N são trazidas para os sistemas de produção de carne, principalmente nos confinamentos. No esterco, o N está presente principalmente na forma de amônia ou de N orgânico. Este N é oriundo de alimentos não digeridos no trato digestivo, proteína microbiana, N endógeno, uréia e também N amoniacal excretado na urina. Cerca de 40 a 50 % do total de N excretado no esterco corresponde ao N amoniacal excretado na urina. Grande parte deste N excretado entra na atmosfera e na água, tornando-se desta maneira um potencial poluente (Hutington e Archibeque, 1999).

Dietas de terminação ricas em alto concentrado, baseadas em milho e silagem de milho, fornecem PM além dos requerimentos do animal e, além disso, são deficientes em PDR, podendo reduzir o crescimento bacteriano e causar redução na fermentação ruminal e eficiência alimentar (Shain et al., 1998). Segundo estes autores, a utilização de fontes de PDR poderia atender os requerimentos microbianos de N.

Um dos fatores limitantes para o crescimento microbiano não é a digestibilidade da matéria orgânica, mas a viabilidade de PDR, entretanto, não é possível determinar qual fonte ou fontes de PDR são necessárias para estimular o crescimento microbiano (Ferrel et al., 2001).

Segundo Bach et al. (2005) o metabolismo do N pode ser dividido em dois eventos distintos: a degradação da proteína e a produção de proteína microbiana. A

taxa e extensão na qual a degradação protéica ocorre dependerá da atividade proteolítica dos microrganismos ruminais e do tipo de proteína.

Os peptídeos e aminoácidos resultantes da atividade proteolítica extracelular do rúmen são transportados para dentro das células microbianas. Os peptídeos podem ser degradados por peptidases em aminoácidos, ser incorporados na proteína microbiana ou desaminados em ácidos graxos de cadeia curta, CO₂ e amônia (Tamminga, 1979).

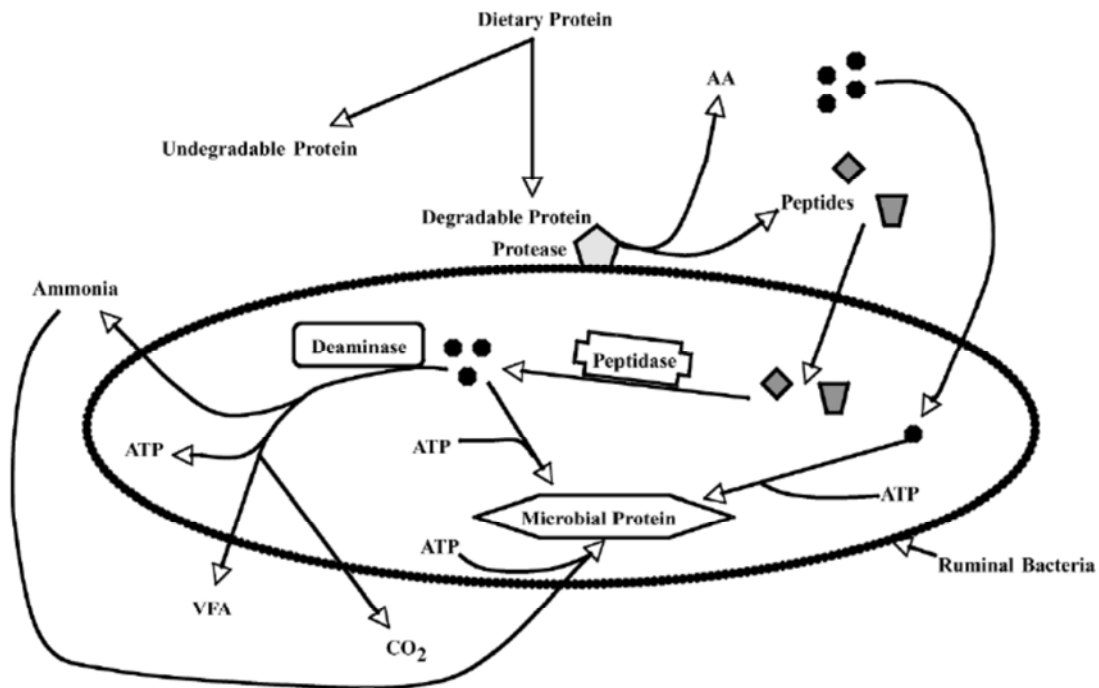


Figura 1. Representação esquemática da degradação protéica e dos produtos finais no rumen (Bach et al., 2005)

A taxa de absorção de aminoácidos e peptídeos pela célula microbiana dependerá da disponibilidade de energia (Bach et al., 2005). Com a disponibilidade de energia, os aminoácidos são transaminados ou usados diretamente na síntese de proteína microbiana. Entretanto, se a energia é limitante, os aminoácidos serão desaminados e seus esqueletos de carbono utilizados na produção de ácidos graxos de cadeia curta (Figura 1).

Ainda de acordo com Bach et al. (2005), os fatores mais importantes que afetam a degradação de proteína no rúmen incluem o tipo de proteína, a interação

com outros nutrientes (principalmente carboidratos) e a população microbiana que é dependente do tipo de dieta, da taxa de passagem e do pH ruminal.

A degradação protéica é inversamente relacionada à taxa de passagem ruminal (Orskov e Mc Donald, 1979). Já o pH ótimo para a ação das enzimas proteolítica varia de 5,5 a 7,0 de acordo com Konopec e Wallace (1982).

Segundo Russel et al. (1992) quanto maior for a degradabilidade da proteína do concentrado, maior será a produção de amônia e possivelmente, maiores serão as perdas urinárias de compostos nitrogenados na forma de uréia.

Fontes de Nitrogênio Não Proteico

A função do nitrogênio não protéico (NNP) na alimentação de ruminantes foi identificado por Zuntz em 1891, o qual foi o primeiro a reconhecer a importante função que a microflora do rúmen tem na utilização de NNP (Hungtinton e Archibeque, 1999).

A suplementação com NNP, além de fornecer amônia para síntese de proteína microbiana (principalmente em bactérias, mas também de maneira mais reduzida em protozoários e fungos) e a menor custo (kg de N), apresenta outras vantagens: 1) criação tamponante no rúmen, de modo a manter o pH em uma faixa mais adequada para a digestão da celulose, 2) altera o hábito alimentar no sentido de refeições mais frequentes, resultando em um possível incremento na eficiência energética da dieta (Huber, 1994), 3) diminui a excreção de resíduos nitrogenados para o meio ambiente (Tamminga, 1996).

A fonte de NNP mais utilizada, a uréia, apresenta rápida liberação de amônia no rúmen, acima da capacidade dos microrganismos em utilizá-la (Golombeski et al., 2006). Os microrganismos utilizarão corretamente amônia quando houver aporte adequado de energia. Portanto, devem-se fornecer fontes (protéicas e energéticas) que tenham sincronia na degradação, pois, caso contrário, além de ocorrerem perdas de nitrogênio amoniacal pelo excesso de sua liberação, a produção microbiana será reduzida e a degradação do alimento diminuirá (Russell et al., 1992).

Isto irá acarretar sobrecarga de N amoniacal no fígado e gasto maior de energia para a excreção da uréia, além de risco de intoxicação (Newbold e Rust, 1992).

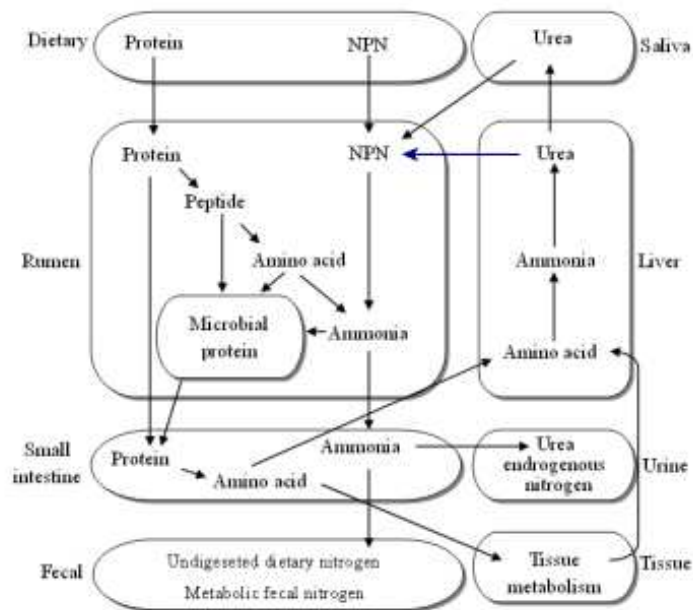


Figura 2.Metabolismo do Nitrogênio no rúmen (Cherdthong, 2010)

Este processo metabólico é indesejável, pois exige o uso de energia que poderia ser utilizada para a produção microbiana, uma vez que a síntese de uma molécula de uréia apresenta balanço negativo de 1 ATP (Brody, 1993) o qual pode ser evitado caso toda amônia seja utilizada pelos microrganismos ruminais.

A uréia permanece na circulação e retorna ao trato digestivo pela saliva ou diretamente através da parede do intestino (Figura 2). Uma parte do nitrogênio absorvido que não é reciclado, será excretado na forma de uréia através da urina pelo animal.

A uréia excretada na urina representa de 25 a 60% da produção de uréia endógena em novilhos (Huntington, 1989).

A produção, excreção e reciclagem de uréia para o intestino esta relacionada com a composição da dieta, consumo e com a eficiência do animal. Dependendo destes fatores, 19 a 96% da produção de uréia endógena pode ser reciclada para o intestino, 15 a 94% do reciclado pode ser transferido a saliva e 25 a 90% da uréia

degradada no intestino pode ser degradada no trato digestivo pós-ruminal (Hungtinton e Archibeque, 1999).

De acordo com (Ferrel et al., 2001) a reciclagem de N desempenha um papel importante no total da economia de N em ruminantes alimentados com dietas de alto concentrado. Porém, a reciclagem de N não proporciona N solúvel para o máximo crescimento microbiano no rúmen em animais alimentados com dietas de alto concentrado segundo os autores.

De acordo com o NRC (1985), a quantidade de nitrogênio reciclado na forma de uréia para o rúmen é função do animal e das condições dietéticas. Todavia, Van Soest (1994) considera que a quantidade de uréia reciclada é relativamente independente do N dietético, uma vez que o pool corporal de uréia está sob controle fisiológico homeostático, esta tenderia a ser constante, desta forma, o que variaria seria a quantidade relativa ou eficiência de reciclagem do nitrogênio. Segundo Van Soest (1994), em condições de baixo plano nutricional protéico, as perdas na urina seriam relativamente menores, aumentando a proporção reciclada de N, situação inversa em uma nutrição protéica mais elevada.

Uréia na alimentação de Ruminantes

No período de 1914 a 1918, devido à escassez de alimentos ocasionada pela primeira guerra mundial, a Alemanha intensificou a utilização da uréia (fonte de NNP) como fonte protéica na alimentação de ruminantes com o intuito de se intensificar a produção de carne e de leite com baixo custo (Santos et al., 2001)..

A uréia é um produto químico que se apresenta em estado sólido, na cor branca, sendo higroscópica e solúvel em água, álcool e benzina, tendo sua forma química como NH_2CONH_2 (Petrobras, 1997).

Após a ingestão pela ruminante, a uréia é hidrolisada pela ação da urease sintetizada pelas bactérias do rúmen, produzindo amônia e dióxido de carbono. (Santos et al., 2001). A amônia é o composto central para a síntese de proteína no rúmen, sendo esta incorporada na proteína microbiana.

Uréia suplementar proporciona N solúvel para prover o crescimento microbiano, aumentando assim o fornecimento de aminoácidos para o animal (Ferrel et al., 2001).

Reverendo dados da literatura, Chalupa (1968) sugeriu que a suplementação com uréia é consistentemente eficiente quando não ultrapassa 1/3 do nitrogênio total ou 1% da matéria seca total da dieta. Devant et al. (2001) compararam dietas isonitrogenadas (13,7%) com farelo de soja e uma mistura de resíduo proteínoso do processamento do milho (corn gluten meal) mais farinha de peixe, com e sem uréia. Quando foi adicionado uréia, a eficiência (g/kg de matéria original verdadeiramente digerida) e a produção de proteína microbiana aumentaram, independente das fontes de proteína verdadeira. Com isso, pode-se verificar que a utilização de uréia é benéfica, principalmente quando associada a uma fonte de proteína verdadeira, aumentando a eficiência da síntese microbiana em dietas com alto teor de concentrado. Teores de substituição da proteína verdadeira pelo NNP (uréia) em até 40% da necessidade de PDR, aparentemente, não afetam o desempenho animal (Devant et al., 2001).

Uréia de Liberação Lenta na alimentação de ruminantes

Compostos de NNP, como a uréia, são convertidos em amônia no rúmen que pode ser utilizada ou absorvida através da parede ruminal (Van Soest, 1994). Entretanto, a quantidade de NNP que pode ser usada é limitada por causa da rápida hidrólise do nitrogênio das fontes de NNP em amônia no rúmen. Esta rápida taxa de quebra da amônia pode ocorrer muito mais rápido que a utilização de amônia pelas bactérias ruminais, resultando em acumulação e escape de amônia do rúmen (Satter Roffler, 1975). Conseqüentemente, o excesso de amônia é absorvido pela parede ruminal e, uma vez na corrente sanguínea, a amônia pode ser tóxica para o animal (Blaxter, 1962).

Talvez uma maneira de melhorar esse problema seja o emprego de complexos de liberação lenta de uréia (Owens e Zinn, 1988).

Os compostos de uréia de liberação lenta que tem sido utilizados em dieta de ruminantes incluem biureto, amiréia, uréia fosfato e uréia com revestimentos a base de óleos, formaldeído e polímeros (Taylor-Edwards et al., 2009).

A utilização de uréia de liberação lenta *in vivo* apresenta uma taxa mais lenta de liberação de nitrogênio amoniacal do que a uréia e pode efetivamente modular as concentrações de nitrogênio amoniacal quando substituído por uréia (Huntington et al., 2006; Golomeski et al., 2006; Taylor-Edwards et al., 2009; Cherdthong et al., 2010; Highstreet et al., 2010; Inostroza et al., 2010; Pinos-Rodríguez et al., 2010; Xin et al., 2010).

A suplementação com uréia de liberação lenta em dietas para ruminantes alimentados com altos níveis de carboidratos rapidamente fermentescíveis pode melhorar a síntese de proteína microbiana (Galo et al., 2003; Broderick et al., 2009) devido a liberação mais lenta de amônia que pode ser utilizada mais eficientemente pelos microrganismos (Galo et al., 2003).

Segundo Akay et al. (2004), a uréia encapsulada com polímero confere tempo de degradação da uréia de até 16 h, sendo a sua solubilização lenta e constante. Os autores avaliaram a utilização *in situ* do nitrogênio da uréia encapsulada (Optigen) comparando com a uréia comum e com a soja em grão. A degradação *in situ* da ULL seguiu padrão mais semelhante ao da soja do que ao da uréia. A uréia de liberação lenta teve velocidade intermediária de utilização durante as primeiras 16 h de fermentação ruminal, seguida de velocidade mais lenta de utilização de 16 a 30 h. Esse padrão de utilização em duas fases assemelhou-se ao observado para a soja. Em avaliações com fermentadores *in vitro*, o uso de uréia encapsulada permitiu maior síntese de proteína bacteriana e utilização mais rápida de nutrientes em relação à dieta controle (Akay et al., 2004).

Owens et al. (1980) comparando duas fontes de N, uréia e uréia de liberação lenta em um teste de toxicidade em novilhos, observaram sintomas de intoxicação em animais suplementados com uréia quando fornecidas ao mesmo nível de suplementação com uréia de liberação lenta, que não foi tóxica aos animais. Em outro experimento, Owens e Zinn (1988) relataram que compostos com liberação controlada de nitrogênio, tais como amiréia, biureto, certos materiais de cobertura e a maioria dos complexos de uréia com formaldeído ou melaço, auxiliaram a evitar a toxicidade do nitrogênio amoniacal, mas não afetaram a utilização de nutrientes.

Segundo Bartley e Deyoe (1975) o fornecimento gradual de amônia no rúmen pela suplementação com uréia de liberação lenta poderia aumentar a síntese de proteína microbiana, o consumo de matéria seca, a digestibilidade da fibra e proporcionar um maior consumo de energia pelo animal, além de reduzir problemas com toxidez.

Em revisão, Cherdthong et al. (2010), concluiu que a uréia de liberação lenta foi mais eficiente na fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e produção de leite em detrimento da uréia na alimentação de ruminantes.

Desempenho, Qualidade da Carcaça e da Carne

Para se intensificar a produção, há necessidade de abater animais jovens, confinados com dietas com elevado teor de energia e quantidades adequadas de proteína degradável e não degradável no rúmen, para que as carcaças tenham o grau de acabamento que o mercado exige.

A determinação da qualidade de carcaças e carne é feita através de análises e medições que se correlacionam entre si. A área de olho de lombo (AOL), avaliada entre a 12ª e 13ª costelas é um desses indicadores. Essa medida está diretamente relacionada à quantidade de músculos da carcaça e deve ser considerada no estudo das características de carcaça como indicador do desenvolvimento muscular e do rendimento de cortes de alto valor comercial. (Willians, 2006 *apud* Andrighetto, 2009).

Outro eficiente indicador de acabamento da carcaça segundo Hedrick (1983) é a avaliação da espessura de gordura subcutânea (EGS) no m. *Longissimus dorsi*.

O índice de marmorização segundo Thompson et al. (2004) é um indicador da gordura intramuscular sendo diretamente relacionada à palatabilidade e suculência da carne, afirmam Strong (2004) e Plater et al. (2003). Já a maciez é sem dúvida uma das mais importantes qualidades atribuídas a carne bovina pelo consumidor (Soria, 2004). Outro fator importante no produto carne é a sua coloração.

Na literatura resultados variados quanto à utilização uréia ou uréia de liberação lenta em substituição a proteína verdadeira nas características de desempenho e carcaça tem sido observados.

Milton et al. (1997) observaram que a suplementação com apenas uréia na dieta como fonte de N, não maximizou o desempenho em relação a outras fontes como farelo de soja e farelo de algodão. Os autores verificaram que os animais alimentados com farelo de soja ganharam 13% de peso a mais e foram 9% mais eficientes que os alimentados apenas com uréia como fonte de N. Contudo, a utilização do farelo de soja em detrimento da uréia pode melhorar o desempenho, entretanto, o farelo de soja contém PDR e PNDR, tornando difícil determinar se as respostas resultaram do aumento de proteína microbiana ou pela melhora na qualidade da fermentação ruminal (Milton et al., 1997).

Já Fernandes et al. (2009) avaliaram a substituição de uréia por farelo de soja para novilhos com dietas de elevado teor de concentrado (90%) e verificaram menor GMD para a dieta com maior porcentagem de uréia como fonte protéica.

Seixas et al. (1999), não verificaram diferenças no GMD em novilhos alimentados com amiréia 30, uréia ou farelo de algodão. No mesmo sentido, Gleghorn et al. (2004) alimentaram novilhos com 100% de uréia, 50% uréia+ 50% farelo de algodão e 100% de farelo de algodão e também não verificaram efeito no GMD.

Por outro lado, Pirez et al. (2004) observaram maior GMD para os animais alimentados com uréia e amiréia em substituição ao farelo de soja. Os autores atribuíram essa diferença aos diferentes níveis de PDR entre os tratamentos farelo de soja (58,4% da PB), uréia e amiréia (75,3% PB).

Tedeschi et al. (2002), suplementaram bovinos de corte com uréia e uréia de liberação lenta (Optigen) ou combinações de ambas, em uma dieta com alto teor de forragem (mais de 95% de silagem de milho) na fase de crescimento e outra com 85% de silagem na fase de terminação, em dois experimentos variando quanto ao suprimento de N ruminal e fonte de NNP. Os autores não observaram alterações no desempenho e nas características de carcaça de bovinos de corte confinados em crescimento ou terminação quando as dietas supriram o N ruminal.

Taylor Edwards et al. (2008) realizaram dois experimentos para 1) avaliar o efeito da suplementação com uréia e uréia de liberação lenta em bovinos alimentados com 85% de silagem e 2) avaliar vários níveis de suplementação de uréia ou uréia de

liberação lenta (0; 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6) na terminação de bovinos. De acordo com os autores a uréia de liberação lenta não influenciou o ganho médio diário, a ingestão de matéria seca e a eficiência alimentar quando suplementadas aos níveis de 0,8 ou 1,2% da matéria seca, mas nos níveis de 0,4 (mínimo) e 1,6 (máximo) diminuiu o ganho de peso e a eficiência alimentar, sem a ingestão de matéria seca. Os autores concluíram que nos níveis intermediários de suplementação a uréia de liberação lenta afetou o desempenho dos animais similarmente a uréia.

A ausência de uma resposta no desempenho quando a uréia é substituída por uréia de liberação lenta pode ser explicada por alguns fatores como :

1) A reciclagem de N mantém a concentração de N constante no rúmen (Smith et al., 1975), o que pode ter contribuído para mascarar os efeitos das fontes de NNP. 2) É possível que os compostos de uréia de liberação lenta são removidos do rúmen antes que ocorra a adaptação destes compostos (Johnson e Clemens 1973) devido à rápida taxa de passagem.

3) Segundo Smith (1975), depois que os microrganismos ruminais são adaptados aos compostos de liberação lenta, nenhum efeito deste produto é observado, pois a uréia de liberação lenta pode ser degradada na mesma intensidade que a uréia convencional.

Segundo Gleghorn et al. (2004), têm sido demonstrados diferentes efeitos da influência de fontes suplementares de proteína bruta nas características avaliadas na carcaça.

Milton et al. (1997), verificaram efeito quadrático no PCQ com o aumento da concentração de uréia na dieta.

Tedeschi et al. (2002) não observaram efeitos nas características de carcaça suplementando novilhos em terminação com Uréia, Optigen ou a combinação destes. No mesmo sentido, Gleghorn et al. (2004) não observaram efeito no PCQ, trabalhando com uréia em substituição ao farelo de algodão.

Digestibilidade Aparente Total

A digestibilidade é um dos parâmetros mais importantes na avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos por ruminantes, entretanto, a determinação pela coleta total de fezes requer rigoroso controle da ingestão e excreção, o que torna esse método tradicional trabalhoso e oneroso (Berchielli et al., 2000).

A técnica dos indicadores consiste no emprego de uma substância de referência (indicador), que, depois de ingerida, é totalmente recuperada nas fezes (Coelho da Silva et al., 1979).

Recentemente, a porção fibrosa indigestível tem sido utilizada como indicador interno. Os métodos de incubação utilizados são *in situ* e *in vitro* e as frações que têm demonstrado potencial como indicador são as fibras indigestíveis em detergente neutro (FDNi) e em detergente ácido (FDAi), obtidas após 144 horas de incubação ruminal (Paixao et al., 2007)

De acordo com a literatura recomendam-se três dias de coleta de amostras de fezes para estimativa da digestibilidade (Pina et al., 2006, Paixao et al., 2007, Ferreira et al., 2009). Segundo Pina et al. (2006) a alternativa de se empregar três dias de coleta de fezes mostra-se viável, pois poderia reduzir o estresse dos animais e em adição, menores quantidades de amostras seriam manuseadas e analisadas, o que tornaria os ensaios desta natureza, menos onerosos e trabalhosos

Resultados variados na literatura tem sido verificados quanto a utilização de diferentes fontes protéicas na digestibilidade aparente total. Todavia, são raros os trabalhos que avaliam a digestibilidade aparente total em bovinos de corte suplementados com farelo de soja, uréia e uréia de liberação lenta.

Paixão et al. (2007) não verificaram efeito da uréia sobre a digestibilidade da matéria seca e demais nutrientes, quando substituíram o farelo de soja por uréia em dois níveis de concentrado (0.75 or 1.25% do PV).

Ferrel et al. (2001) não verificaram diferenças na digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e energia para a dieta com uréia (11,4% PB) quando comparada a dieta com farelo de soja (11,2%PB) em carneiros alimentados com 95% de concentrado.

Chizzotti et al. (2008), avaliaram níveis crescentes de uréia (0, 15,5, 21,5 e 46,5%) na dieta de novilhos e observaram aumento linear no consumo da digestibilidade aparente da matéria seca com o aumento dos níveis de uréia na dieta, entretanto, os demais coeficientes de digestibilidade não foram influenciados. Os autores atribuíram o aumento da digestibilidade aparente da PB à maior absorção de amônia dos tratamentos com NNP do que do tratamento com farelo de algodão (sem uréia).

Galina et al. (2003) alimentaram novilhos zebuínos com 100% de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e cana-de-açúcar: milho (40:60%) suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e verificaram melhor digestibilidade de FDN para as dietas com ureia de liberação lenta

Oliveira Júnior et al. (2004a), constataram maior digestibilidade FDN e FDA em novilhos canulados alimentados com a substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia (uréia de liberação lenta), entretanto, os demais coeficientes de digestibilidade (MS, MO, PB, EE, CNF) foram semelhantes entre os tratamentos.

Já Highstreet et al. (2010), verificaram digestibilidade aparente total da proteína bruta e fibra em detergente neutro semelhantes com a inclusão de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vacas em lactação.

Fermentação Ruminal

Nos ruminantes a fermentação ruminal é o resultado da atividade física e microbiológica, que converte os componentes dietéticos a ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato entre outros (Owens e Goetsch, 1993).

De acordo com Van Soest (1994) o fator mais importante que determina a quantidade de proteína metabolizável disponível para o animal é o incremento da fermentação ruminal.

A fermentação ruminal pode ser avaliada através das análises de pH ruminal, concentração de nitrogênio amoniacal e produção de ácidos graxos de cadeia curta.

O pH do conteúdo ruminal reflete o balanço entre as taxas de produção de ácidos graxos de cadeia curta, o influxo de tampões por meio da saliva e a presença ou liberação de tampões ou bases dos alimentos (Burger et al., 2000).

O valor de pH entre 5,5 a 7,0 é considerado ótimo para ação das enzimas proteolíticas ruminais (Kopečný e Wallace, 1982).

Oliveira Júnior et al. (2004b) não observaram diferenças no pH ruminal na substituição de farelo de soja por uréia ou amiréia em novilhos.

O nitrogênio amoniacal ruminal é um eficiente indicador da utilização de amônia pelos microrganismos.

De acordo com Satter and Slyter 1974, a máxima taxa de crescimento microbiano ocorre com as concentrações de N-NH₃ entre 5 e 8 mg/dl. Entretanto, estudos sugerem valores entre 15 e 20 mg/dl dependendo da dieta (Leng e Nolan, 1984). Estimativas mais altas de concentração de amônia ruminal obtidos in vivo, em comparação com os estudos in vitro como o exemplo clássico dos autores Satter e Slyter 1974, ocorrem devido a diferenças nas concentrações de nutrientes entre os microambiente, como a colonização microbiana na superfície das partículas do alimento e em torno do ambiente (Odle e Schaefer, 1987).

De acordo com Van Soest (1994) o nível ótimo de concentração de amônia ruminal seria 10 mg N/dL, entretanto afirmou que esse valor não deve ser considerado como um número fixo, pois a capacidade de síntese microbiana e de captação de amônia pelas bactérias depende da taxa de fermentação de carboidratos.

Espera-se que a concentração de N-NH₃ ruminal aumente com a inclusão de compostos nitrogenados mais degradáveis, como a uréia (Paixão et al., 2007).

Segundo Chizzotti et al. (2008) o aumento da suplementação com NNP resulta em um acúmulo ruminal de NH₃, indicando, que os requerimentos microbianos de NH₃ foram excedidos, ou que os microrganismos ruminais não foram capazes de utilizar o N seja porque a energia foi limitante ou que o crescimento microbiano foi mais lento do que a solubilização de N.

Chizzotti et al. (2008) e Paixão et al. (2007) verificaram aumento na concentração ruminal de NH₃ com níveis crescentes de uréia e com a substituição de farelo de soja por uréia, respectivamente.

Taylor-Edwards et al. (2008) verificaram menor concentração ruminal de NH₃ para os novilhos suplementados com uréia de liberação lenta em relação aos novilhos com uréia e 85% de silagem de milho. Os autores concluíram a utilização de compostos de uréia de liberação lenta *in vivo*, de fato, têm uma taxa de liberação mais lenta de amônia que a uréia convencional e pode efetivamente reduzir as concentrações de amônia ruminal quando substituído por uréia.

Highstreet et al. (2010) estudaram a inclusão de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vacas em lactação e verificaram diferenças na concentração de NH₃ ruminal, com menor concentração para o tratamento com ureia de liberação lenta.

Por outro lado, a reciclagem de N pode mudar o efeito da uréia de liberação lenta no N ruminal (Tedeschi et al., 2002). Além disto, os compostos com uréia de liberação lenta podem ser removidos do rúmen antes da adaptação ruminal (Johnson and Clemens 1973) devido ao rápido turnover do rúmen.

É necessário N ruminal disponível para que não haja limitação na degradação ruminal de carboidratos (Oliveira Junior et al., 2004b). Portanto, em dietas com carboidratos semelhantes, espera-se alterações na concentração molar e proporção de AGV, somente se houver deficiência ruminal de N (Nocek e Tamminga, 1991).

Carmo (2001) e Oliveira Júnior et al. (2004b) não verificaram efeito sobre os ácidos graxos de cadeia curta quando avaliaram a substituição parcial do farelo de soja por amiréia ou uréia em dieta para vacas e novilhos, respectivamente. Devido aos ácidos graxos de cadeia curta serem derivados principalmente da fermentação dos carboidratos da dieta (Firkins et al., 2007), concentrações similares de ácidos graxos de cadeia curta refletem nenhum efeito adverso da adição de fontes de uréia.

Por outro lado, Highstreet et al. (2010) sugeriram que o aumento nas produções de proteína verdadeira e de gordura no leite, em vacas no início da lactação com o uso de ureia de liberação lenta em substituição à ureia comum seria em

detrimento da modificação do perfil de ácidos graxos de cadeia curta produzidos. Segundo os autores, a redução no pico dos níveis de N-NH₃ das vacas alimentadas com a dieta com uréia de liberação lenta causaria uma mudança nas proporções de espécies microbianas no rúmen, e conseqüentemente uma modificação no perfil de ácidos graxos produzidos.

Galina et al. (2003) alimentaram novilhos zebuínos com 100% de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e cana-de-açúcar: milho (40:60%) suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e verificaram que a proporção molar de acetato e propionato foram menores e maiores respectivamente para ambas as dietas com uréia de liberação lenta. Além disto, a concentração de amônia e a digestão das frações potencialmente digestíveis e indigestíveis foram aumentadas nas dietas com ULL.

Proteína Microbiana

Um indicador da eficiência do uso de nitrogênio no rúmen é a quantidade de proteína microbiana sintetizada, o qual é conseqüência do crescimento microbiano do rúmen (Sniffen e Robinson, 1987).

A síntese de proteína microbiana no rúmen provê a maioria do suprimento de proteína fornecida para o intestino delgado de ruminantes sendo responsável por 50 a 80% do total de proteína absorvível (Storm e Orskov, 1983). A quantidade total de proteína microbiana que flui para o intestino delgado depende da disponibilidade de nutrientes e eficiência de utilização destes nutrientes pelas bactérias ruminais (Bach et al., 2005).

Além da importância das quantidades de fornecimento de nutrientes, a sincronia com que os nutrientes tornam-se disponíveis também é importante. (Bach et al., 2005). Quando a taxa de degradação da proteína excede a taxa de fermentação CHO, grandes quantidades de N podem ser perdidas como amônia, e, inversamente, quando a taxa de fermentação CHO excede a taxa de degradação de proteínas, síntese de proteína microbiana pode diminuir (Nocek e Russell, 1988).

Segundo Van Soest (1994), a eficiência da fermentação ruminal no incremento da proteína microbiana é influenciada principalmente pela taxa de fermentação (que

determina a quantidade de alimento por unidade de tempo) e a taxa de passagem (a qual favorece a remoção de substratos lentamente fermentáveis e microrganismos mais maduros, reduzindo a idade média da população de microrganismos).

A excreção urinária de derivados de purina constitui boa alternativa para a estimativa do fluxo de compostos N microbianos (Fujihara et al., 1987; Broderick e Merchen, 1992 e Vagnoni et al., 1997). Amostras *spot* de urina parecem estimar satisfatoriamente a produção e excreção de derivados de purina em vacas leiteiras e, portanto, a produção de N microbiano, assim como aquela realizada pela coleta total de urina 24 horas (Valadares et al., 1999).

De acordo com Gleghorn et al. (2004), quando a uréia é utilizada como fonte suplementar de proteína na ração, a síntese de proteína microbiana é maximizada e maior quantidade de aminoácidos e peptídeos estarão presentes no intestino delgado para absorção, quando comparada a proteína verdadeira (rica em proteína não degradável no rúmen).

Ferrel et al. (2001) verificaram maiores quantidades de N solúvel no rúmen e maior crescimento microbiano para a dieta com uréia (11,4% PB) quando comparada a dieta com farelo de soja (11,2%PB) em carneiros alimentados com 95% de concentrado, estudando o efeito do nitrogênio não protéico suplementar ou a fonte de proteína no metabolismo pós-absortivo de N. No mesmo sentido, Devant et al. (2001) compararam fontes de proteína verdadeira com e sem uréia. Quando foi adicionado uréia, a eficiência (g/kg de matéria original verdadeiramente digerida) e a produção de proteína microbiana aumentaram independente das fontes de proteína verdadeira.

Cherdthong et al. (2010), em experimento *in vitro* verificaram aumento na produção de proteína microbiana para o tratamento com uréia de liberação lenta em detrimento a uréia. Por outro lado, Galo et al. (2003) verificaram semelhante IMS e excreção dos derivados de purina entre as dietas com uréia de liberação lenta (16 e 18% de PB com 0,77% de Optigen) e uréia (18%PB) em vacas de leite em produção.

Entretanto, os autores observaram aumento na excreção de N na urina para as dietas com uréia de liberação lenta, sem alterações no balanço de N. Os autores

atribuíram a falta de respostas à uma ruptura parcial do revestimento do polímero da uréia de liberação lenta promovendo uma rápida liberação da uréia e possivelmente uma menor digestibilidade do amido no rúmen em relação ao formulado nas rações o que afetou a utilização microbiana de N.

Microorganismos

A população microbiana do rúmen é composta por bactérias, protozoários ciliados e fungos (Krause et al., 2003) e alguns trabalhos estão sendo realizados a fim de quantificar esses microrganismos para relacioná-los com os processos que ocorrem no rúmen (Ezequiel et al., 2002).

A quantidade de N exigida pelos microrganismos é função da quantidade de energia disponível no rúmen, porque os protozoários e bactérias precisam de N e energia, simultaneamente, para que ocorra uma proliferação desejável (Lucci, 1997).

A função mais importante dos protozoários é a habilidade de engolfar moléculas grandes como proteína, carboidratos e até bactérias ruminais (Van Soest, 1994). Os protozoários também desenvolvem um papel na regulação do turnover de N bacteriano no rúmen, e eles ainda fornecem proteína solúvel para manter o crescimento microbiano (Bach et al., 2005). Devido aos protozoários são serem capazes de utilizar N amoniacal (Onodera et al., 1977), uma fração da proteína insolúvel previamente engolfada, retorna ao fluido ruminal na forma de proteína solúvel (Dijkstra, 1994). Esta é uma das principais razões porque a defaunação diminui a concentração N amoniacal no rúmen (Eugene et al., 2004).

Abadi et al. (2011) estudaram o efeito da degradabilidade da proteína no desempenho, parâmetros ruminais e sanguíneos e na população de protozoários, através dos tratamentos farelo de soja+uréia (74% PDR, %PB), farelo de soja (70,40% PDR, %PB), farinha de carne+uréia (68,7% PDR, %PB) e farinha de carne (63,70% PDR, %PB) em vacas de leite. Os autores não verificaram diferenças no desempenho, composição do leite, parâmetros sanguíneos e pH ruminal. Entretanto, o número de

protozoários aumentou de acordo com o aumento de PDR dos tratamentos, sendo maior na dieta farelo de soja+uréia, o qual tinha a maior porcentagem de PDR (74%).

Dennis et al. (1982) verificaram aumento na população de protozoários no rúmen de vacas alimentadas com uréia em comparação ao farelo de soja.

Os requerimentos dos microrganismos ruminais por amônia e aminoácidos para síntese de proteína dependem das espécies de bactéria (Ling e Armstead, 1995) e das características da dieta (Cruz Soto et al., 1994; Chikunya et al., 1996). Considerando-se que as bactérias são os organismos de taxa metabólica mais elevada, as mesmas serão, portanto, influenciadas de modo proporcionalmente mais intenso do que em protozoários e fungos ruminais (Arcuri, Lopes e Carneiro, 2006).

A bactéria *Streptococcus bovis* é considerada a predominante espécie utilizadora de amido, presente no rúmen de animais alimentados com dietas ricas em amido (Mackie e Gilchrist, 1979). Segundo Jarvis et al. (2000), a dieta pode ter um impacto na seleção de *Streptococcus bovis* no ambiente ruminal.

Nguyen et al. (2011) quantificaram bactérias por PCR em tempo real e verificaram aumento na população de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus* em búfalos que receberam 4% de uréia em substituição a 16% do farelo de soja no concentrado.

Segundo Kanra (2005), um ótimo valor de pH para o crescimento das bactérias ruminais seria entre 6,0 e 6,9. Portanto, o valor de pH médio (6,72) observado atendeu estes requerimentos.

Em revisão, Kamra, 2005 enfatiza a necessidade da utilização de técnicas de biologia molecular para identificação e caracterização de microrganismos ruminais. Segundo o autor, com o emprego das novas técnicas de biologia molecular, as rotas metabólicas designadas por diferentes grupos de bactérias poderiam ser restabelecidas e o cenário de microbiologia do rúmen poderia ser totalmente diferente nas próximas décadas. Ele afirma que essas novas técnicas poderão talvez ajudar a compreender o mecanismo da utilização do alimento no rúmen.

Parâmetros Sanguíneos

A concentração sanguínea de nitrogênio ureico no soro (NUS) é altamente correlacionada com a amônia ruminal e a incorporação de NUS na proteína bacteriana (reciclagem da uréia) é inversamente relacionada ao nível de consumo de proteína (Bunting et al., 1989, Hammond, 1997). A concentração de NUS pode ser utilizada como uma ferramenta para verificar a concentração de proteína na dieta para maximizar o desempenho animal (Pfander et al., 1975).

O aumento da PB na dieta aumenta linearmente a concentração de NUS (Vasconcelos et al., 2007). Johnson and Preston (1995), os quais trabalharam com dietas contendo 10, 12, 14, e 16% de proteína bruta para novilhos em terminação, observaram aumento linear no NUS com o aumento dos níveis de PB na dieta.

Segundo Broderick (1995), a concentração elevada de uréia no soro está relacionada à utilização ineficiente da proteína bruta da dieta.

Huntington et al. (2006) conduziram três experimentos (um com alto concentrado e dois com alta forragem) para avaliar o efeito da dieta com uréia de liberação lenta (uréia-cálcio) em novilhos na absorção de amônia do intestino e na produção de N ureico no fígado. Os autores verificaram menor concentração plasmática de amônia nos novilhos alimentados com uréia de liberação lenta em comparação a uréia no experimento com alta forragem e nenhuma alteração nas concentrações de uréia plasmática. Em adição, constataram maior teor de glicose plasmática nos alimentados com a dieta uréia em relação à uréia de liberação lenta. Segundo os autores o aumento das concentrações de glicose da dieta U foram associadas com a diminuição do uso periférico de glicose, que foi consistente com concentrações mais baixas de insulina verificadas e possivelmente com o aumento da gliconeogênese.

Gleghorn et al. (2004) não verificaram efeito no NUS utilizando uréia ou farelo de algodão como fontes protéicas em dieta de novilhos em terminação. Similarmente, Highstreet et al. (2010) estudaram a inclusão de 5% da PB solúvel de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vaca em lactação e não verificaram diferenças na concentração de N uréico no sangue.

CAPÍTULO 2

Substituição do farelo de soja por uréia ou uréia de liberação lenta sobre os parâmetros de desempenho, características de carcaça e na qualidade da carne de novilhos Nelore em terminação

RESUMO: Estudos vêm sendo realizados na tentativa de se avaliar os efeitos da manipulação da nutrição protéica, devido à sua importância no metabolismo e desempenho de bovinos. O presente estudo teve como objetivo identificar a melhor fonte de nitrogênio não-protéico (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) em substituição parcial ao farelo de soja sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de novilhos Nelore em terminação. Quarenta e seis novilhos Nelore ($313,30 \pm 22,62$ kg) foram distribuídos em um delineamento em blocos e confinados em baias individuais por 74 dias. As dietas foram formuladas isoprotéicas e isoenergéticas, com os seguintes tratamentos: 1) Controle: composta por 12% de farelo de soja, 2) Uréia: com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia, 3) Optigen: com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia de liberação lenta e 4) Uréia e Optigen: com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta, tendo como volumoso o bagaço e a silagem de cana totalizando 21,5% da MS. Não foram verificados efeitos das dietas ($P > 0,05$) no peso vivo final, ganho médio diário, consumo de matéria seca, eficiência alimentar, características de carcaça e qualidade de carne. A substituição parcial do farelo de soja pelas fontes de NNP (uréia e uréia de liberação lenta) proporcionou desempenho, características de carcaça e qualidade da carne semelhantes.

Palavras-chave: bovinos, confinamento, nitrogênio não protéico, Optigen, uréia

Replacement of soybean meal for urea or slow releasing urea on the performance, carcass traits and meat quality of finishing Nellore steers.

ABSTRACT: Several studies have been performed to evaluate the effects of protein nutritional manipulation due to its importance to ruminant metabolism and performance. This study aimed to identify the best source of non protein nitrogen (urea, slow releasing urea and their combination) for the partial replacement of soybean meal, and its effect on the animal performance, carcass traits and meat quality. Forty-six Nellore steers (BW 313.30 ± 22.62 kg) were allotted in a randomized block design and fed in individual pens for 74 days. Steers were fed isoproteic and isoenergetic diets as follows: 1)Control (**CTL**): 12% of soybean meal 2)Urea (**U**): the replacement of 6% of soybean meal protein for urea, 3)Optigen (**O**): the replacement of 6% of soybean meal protein for slow releasing urea and 4)Urea and Optigen (**UO**): the replacement of 6% of soybean meal protein for urea and slow releasing urea, with 21.5% of the total DM of sugarcane silage and bagasse as roughage. No differences ($P>0,05$) in final body weight, average daily gain, dry matter intake, feed efficiency, carcass traits and meat quality were found among steers fed with the dietary treatments. The partial replacement of soybean meal by NPN sources (urea and slow releasing urea) had animal performance, carcass traits and meat quality similar to the control.

Keywords: beef cattle, feedlot, non-protein nitrogen, Optigen, urea

INTRODUÇÃO

Dentre os ingredientes de um concentrado, os protéicos são os mais onerosos e sua utilização implica em maior custo por arroba na terminação de bovinos.

A substituição parcial ou total de uma fonte de proteína verdadeira como o farelo de soja por uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP) poderia significativamente reduzir os custos com alimentação em confinamento.

A fonte mais comum de NNP utilizada para fornecer nitrogênio amoniacal para satisfazer os requerimentos microbianos é a uréia.

Todavia, a quantidade de NNP da uréia que pode ser utilizada é limitada devido a rápida hidrólise de nitrogênio em amônia no rúmen. Como a amônia produzida no rúmen é utilizada para o crescimento microbiano, que também é dependente da disponibilidade de energia, é importante que a taxa de produção de amônia no rúmen ser coordenada com a taxa de digestão dos carboidratos (Galo et al., 2003). Paralelamente, é possível que níveis tóxicos para o animal possam ser atingidos quando a uréia não é adequadamente distribuída na dieta ou quando os animais ingerem uma quantidade excessiva de uréia (Smith 1986).

O risco de intoxicação com níveis elevados de uréia na dieta e a assincronia entre a degradação de uréia e carboidratos no rúmen levou a busca de diferentes formas de NNP. Compostos de uréia de liberação lenta liberam o nitrogênio mais lentamente que a uréia convencional (Taylor Edwards et al., 2008)

Desta forma, o uso de uréia de liberação lenta (Optigen) pode ser uma alternativa positiva na substituição total ou parcial da proteína, como fonte de nitrogênio.

Contudo, resultados variados no desempenho de bovinos de corte frente à utilização de uréia e/ou uréia de liberação lenta tem sido verificados na literatura (Seixas et al., 1997, Seixas et al., 1999, Tedeschi et al., 2002, Pirez et al., 2004, Chizzotti et al., 2008, Taylor-Edwards et al., 2008, Fernades et al., 2009).

Aliando-se dietas ricas em concentrado (com carboidratos rapidamente fermentescíveis) com as fontes de NNP, que serão rapidamente (uréia) e lentamente (uréia de liberação lenta) degradadas no rúmen, hipotetiza-se, que o desempenho animal

possa ser maximizado com a substituição parcial de farelo de soja por uréia de liberação lenta ou a combinação de uréia e uréia de liberação lenta em relação a uréia, uma vez que compostos de uréia de liberação lenta resultam em fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana mais eficiente que a uréia (Cherdthong, 2010)

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a melhor fonte de NNP (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) em substituição parcial ao farelo de soja no desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos Nelore em terminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Instalação Experimental

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA / USP, Pirassununga, SP- Brasil. Foram utilizados 46 bovinos machos castrados da raça Nelore, com idade e peso inicial de 20 meses e $313,3 \pm 22,6$ kg. Os animais foram distribuídos em quatro baias equipadas com 12 portões eletrônicos cada, do tipo Calan (Calan Systems Inc.), para controle do consumo individual. As baias da instalação experimental possuíam cochós de cimento cobertos e dois bebedouros comunitários.

Delineamento Experimental e Tratamentos

Foi realizado um delineamento em blocos casualizados (Tabela 4) divididos em três períodos experimentais com 46 animais, distribuídos em quatro blocos de acordo com o peso inicial e confinados com quatro dietas diferindo quanto à fonte protéica:

Tratamento CONTROLE (CTL): composto por 12% de farelo de soja

Tratamento URÉIA (U): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia na mesma quantidade de proteína bruta

Tratamento OPTIGEN (O): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia de liberação lenta (Optigen) na mesma quantidade de proteína bruta

Tratamento URÉIA+OPTIGEN (UO): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta (Optigen) na mesma de proteína bruta

As dietas experimentais foram calculadas no programa RLM[®] (ESALQ/USP) e aferidas no programa CNCPS v 6.1 (Fox et al., 2000). A proporção dos ingredientes na dieta total, assim como a respectiva composição químico-bromatológica das dietas experimentais, concentrados e ingredientes são descritas nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Composição Percentual dos ingredientes e composição química das dietas experimentais

Ingredientes (%)	DIETAS EXPERIMENTAIS			
	Controle	Uréia	Optigen ¹	Ureia+Optigen
Silagem de cana-de-açúcar	10,75	10,75	10,75	10,75
Bagaço de cana-de-açúcar	10,75	10,75	10,75	10,75
Milho grão seco	44,00	49,34	49,28	49,28
Casca de soja peletizada	20,00	20,00	20,00	20,00
Farelo de soja	12,10	6,10	6,10	6,10
Sal mineral	1,40	1,40	1,40	1,40
Uréia	1,00	1,66	0,00	1,00
Uréia de liberação lenta	0,00	0,00	1,80	0,72
Composição Química ²				
MS ³	81,78	81,89	82,00	81,79
MO ⁴	95,27	95,99	95,62	95,93
MM ⁴	4,73	4,01	4,38	4,07
PB ⁵	11,68	11,22	11,17	11,21
NIDIN ⁴	0,78	0,87	0,86	0,93
NIDA ⁴	0,69	0,89	0,77	0,73
EE ⁴	2,00	2,38	2,73	2,47
CT ⁴	81,60	82,38	81,72	82,25
FDN ⁴	36,44	37,69	37,11	36,17
FDNcp ⁴	34,34	35,46	34,35	33,55
CNF	45,15	47,05	48,23	48,96
FDA ⁴	26,26	25,61	26,69	25,43
LIG	2,73	2,25	2,45	2,27
PDR ⁵ , % MS	11,27	10,97	10,69	10,87
PDR ⁵ , % PB	77,46	78,31	76,67	77,7
PNDR ⁵ , %PB	22,54	21,69	23,33	22,3
NDT ⁶	72,87	75,13	76,68	75,57

¹Uréia de liberação lenta da Alltech,

²MS: Matéria Seca, MO: Matéria Orgânica, MM: Matéria Mineral, PB: Proteína Bruta, NIDN: Nitrogênio insolúvel em detergente neutro, NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido, EE: Extrato etéreo, CT: Carboidratos totais, FDN: Fibra em detergente neutro, FDNcp: FDN corrigido para cinzas e proteína, CNF: Carboidratos não fibrosos, FDA: Fibra em detergente ácido, LIG: Lignina, PDR: Proteína degradável no rúmen, PNDR: Proteína não degradável no rúmen, NDT: Nutrientes digestíveis totais;

³% de matéria natural, ⁴% de matéria seca, ⁵Estimado pelo CNCPS v. 6.1, ⁶Estimado pelas equações do NRC (2001)

Tabela 2. Composição Percentual dos ingredientes e composição química das dietas experimentais

Composição Química ²	CONCENTRADOS			
	Controle	Uréia	Optigen ¹	Ureia+Optigen
MS ³	91,88	92,02	92,16	91,89
MO ⁴	95,28	96,19	95,72	96,12
MM ⁴	4,72	3,81	4,28	3,88
PB ⁴	14,13	13,55	13,48	13,54
NIDIN ⁴	0,90	1,01	1,01	1,10
NIDA ⁴	0,83	1,09	0,93	0,88
EE ⁴	2,19	2,68	3,11	2,79
CT ⁴	78,96	79,96	79,13	79,79
FDN ⁴	27,06	28,66	27,92	26,72
FDNcp ⁴	25,00	26,43	25,01	23,99
CNF ⁴	51,88	54,30	55,80	56,73
FDA ⁴	19,43	18,60	19,97	18,37
LIG ⁴	1,13	0,51	0,77	0,54
NDT ⁵	78,25	81,13	83,11	81,69

¹Uréia de liberação lenta da Alltech;

²MS: Matéria Seca, MO: Matéria Orgânica, MM: Matéria Mineral, PB: Proteína Bruta, NIDN: Nitrogênio insolúvel em detergente neutro, NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido, EE: Extrato etéreo, CT: Carboidratos totais, FDN: Fibra em detergente neutro, FDNcp: FDN corrigido para cinzas e proteína, CNF: Carboidratos não fibrosos, FDA: Fibra em detergente ácido, LIG: Lignina, NDT: Nutrientes digestíveis totais;

³% de matéria natural, ⁴% de matéria seca, ⁵Estimado pelas equações do NRC (2001);

Tabela 3. Composição Química dos Ingredientes das Dietas Experimentais

Composição Química ¹	Silagem de Cana-de-açúcar	Bagaço de Cana-de-açúcar	Farelo de Soja	Milho Moído	Casca de Soja
MS ²	37,00	52,83	90,71	91,54	92,73
MO ³	92,70	97,80	93,26	98,66	95,99
MM ³	7,30	2,20	6,74	1,34	4,01
PB ³	3,43	2,00	47,81	8,12	9,82
NIDIN ³	0,45	0,23	3,24	1,20	2,08
NIDA ³	0,21	0,15	1,80	0,85	0,41
EE ³	1,39	1,20	1,57	4,11	0,61
CT ³	87,88	94,60	43,88	86,43	85,56
FDN ³	56,30	85,02	23,51	12,90	70,92
FDNcp ³	54,30	82,59	19,03	8,32	68,22
CNF ³	31,58	9,58	20,37	73,53	14,64
FDA ³	37,40	65,03	12,50	4,90	52,45
LIG ³	5,59	11,60	2,12	0,17	1,50
NDT ⁴	56,80	44,92	75,32	89,25	66,29

¹MS: Matéria Seca, MO: Matéria Orgânica, MM: Matéria Mineral, PB: Proteína Bruta, NIDN: Nitrogênio insolúvel em detergente neutro, NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido, EE: Extrato etéreo, CT: Carboidratos totais, FDN: Fibra em detergente neutro, FDNcp: FDN corrigido para cinzas e proteína, CNF: Carboidratos não fibrosos, FDA: Fibra em detergente ácido, LIG: Lignina, NDT: Nutrientes digestíveis totais;

²% de matéria natural, ³% de matéria seca, ⁴Estimado pelas equações do NRC (2001);

A uréia de liberação lenta utilizada neste estudo o Optigen foi fornecido pela empresa Alltech. Optigen é um polímero de uréia e uma fonte de amônia que se comporta como uma uréia com liberação lenta no rúmen, do que a uréia tradicional.

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada dieta experimental, para estimativa do consumo individual. Os animais foram alimentados de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido percentual de sobras das dietas, diariamente de 10% do fornecido para não haver limitação de consumo. As sobras de alimentos nos cochos foram pesadas e amostradas três vezes por semana para a determinação da matéria seca, estimativa de consumo e eficiência alimentar. As

amostras dos ingredientes dos concentrados, das batidas dos concentrados, do volumoso e das sobras foram coletadas e armazenadas a -20°C para posteriores análises químico-bromatológicas.

Os alimentos foram analisados quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002). O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os carboidratos totais (CT) foram calculados segundo Sniffen et al. (1992), em que: $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$. Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo Hall (1998) onde: $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ Uréia} + \% \text{ Uréia}) + \%EE + \%MM + \%FDN]$. Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações do NRC (2001), em que: $NDT = CNFD + PBD + (EED * 2,25) + FDND - 7$, onde PBD, CNFD, FDND e EED representam o total destes nutrientes digestíveis. Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDNcp), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon.

Período Experimental

O período experimental teve a duração de 104 dias, divididos em 30 dias de adaptação e 74 dias de confinamento. A adaptação às dietas foi realizada com níveis crescentes de concentrado até atingir 78,5%. Após a adaptação iniciaram-se os períodos experimentais, nos quais os animais foram alimentados *ad libitum*, uma vez ao dia por 74 dias, totalizando dois períodos de 28 dias e um período de 18 dias. O último período foi antecipado devido às constantes chuvas ocorridas no fim no experimento, fato que estava prejudicando o consumo dos animais e teve a duração de 18 dias.

Desempenho

Os cálculos de desempenho foram realizados utilizando as medidas de consumo e ganho de peso tomadas durante todo o período experimental. Foram calculados a ingestão de matéria seca (IMS), ganho de peso médio diário (GMD) e a eficiência alimentar (EA). O GMD no período foi calculado através da regressão linear entre o tempo de confinamento e o peso vivo individual medidos nos dias 1, 28, 56 e 74. As pesagens não seguiram jejum hídrico ou de alimentos.

Abate

Os animais foram abatidos aos 75 dias de confinamento quando a espessura de gordura atingiu média de três milímetros, entre a 12^a e 13^a costelas, avaliada por ultrassonografia.

O abate foi realizado no Abatedouro-Escola da USP de Pirassununga. Os animais foram abatidos de acordo com as normas preconizadas pelo regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1997). No dia do abate foram determinados o pH (pH_{1h}) e a temperatura (T_{1h}), no músculo (m.) *Longissimus dorsi* da meia carcaça esquerda, na altura da 12^a costela, na primeira hora após o abate, utilizando-se um termômetro e peagâmetro digital (modelo MA002 marca Marconi) com sondas de penetração. Essas medidas foram repetidas 24 horas após o abate.

Após as mensurações, foi realizada a desossa das meias carcaças. Durante a desossa, foram realizadas medidas de avaliação das carcaças, incluindo as medidas de área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS). Em adição, foram colhidas quatro amostras do m. *Longissimus dorsi*, para análises de índice de marmorização, cor, maciez (1, 14 e 21 dias de maturação) e extrato etéreo, conforme segue:

Avaliação das carcaças

As carcaças foram separadas em meias carcaças, e em seguida, foram conduzidas à câmara de resfriamento, $\pm 0^{\circ}\text{C}$, por 24 horas para instalação e resolução do *rigor mortis*. As carcaças foram pesadas quentes (PCQ) e após 24h de permanência na câmara fria e foi calculado o rendimento de carcaça quente (RCQ).

Área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS).

As medidas de AOL e EGS foram realizadas nas meias carcaças esquerdas, 24 horas após o abate, entre a 12ª e 13ª costelas, utilizando grade reticulada, com medida em centímetros quadrados (cm^2).

Índice de Marmorização, Cor e Análise de Maciez Objetiva

Foram retirados três bifés de 2,5 cm de espessura, de cada meia carcaça esquerda, do m. *Longissimus dorsi* entre a 12ª e 13ª costelas. Os bifés foram embalados a vácuo, maturados em câmara frigorífica (0 a 1°C) por 1, 14 e 21 dias e posteriormente congelados (-18°C) para posteriores análises.

Após o descongelamento das amostras, foi realizada a avaliação do índice de marmorização, cor e maciez objetiva como segue:

A avaliação do índice de marmorização foi realizada no m. *Longissimus dorsi*, com uso de escore visual subjetivo (USDA Quality Grade, 1999), nos depósitos de gordura entre as fibras musculares no m. *Longissimus dorsi*, cuja classificação foi determinada por uma escala de pontos. Os graus em ordem decrescente de qualidade consistem em “prime” (dividido em “Abundant”, “Moderately Abundant” e “Slightly Abundant”), “choice” (dividido em “Moderate”, “Modest” e “Small”), “select” (dividido em “Slight”) e “standard” (dividido em “Traces” e “Practically Devoid”). Graus “prime”, “choice”, “select” e “standard”, cada qual tem uma maturidade máxima destacada (8,0 a 10,9 para “prime”, 5,0 a 7,9 para “choice”, 4,0 a 4,9 para “select” e 2,0 a 3,9 para “standard”) (Meat Evaluation Handbook, 1973).

A análise de cor dos bifés foi realizada com o auxílio de um colorímetro portátil (mod. MiniScan XE, marca Hunter Lab), com fonte de luz D65, ângulo de observação

de 10º e abertura da célula de medida de 30 mm, usando-se a escala L*, a*, b* do sistema CIELab, onde o L* é o croma associado à luminosidade (L*= 0 preto, 100 branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+); e b*, que varia do azul (-) ao amarelo (+) (Houben et al., 2000). O aparelho foi utilizado após calibração com um padrão branco e outro preto. As amostras foram deixadas em repouso, com a superfície exposta ao ambiente, por 30 minutos, para oxigenação da mioglobina (Abularach et al., 1998). Foram realizadas três medidas em áreas diferentes na superfície de interesse, tomando-se a média como o valor determinado.

Posteriormente as mensurações de cor, os bifes foram assados em forno elétrico a 170ºC, até atingirem a temperatura interna no bife de 71ºC. As temperaturas internas dos bifes foram avaliadas, por meio de termômetros individuais (termopares), (marca Gulterm, modelo 700-10S.), que foram inseridos nos bifes até sua parte central. Logo em seguida, os bifes foram resfriados por 24 horas, em refrigerador doméstico, com temperatura aproximada de 5ºC. Em seguida, foram retirados seis cilindros de 12 mm de diâmetro de cada bife, com um vazador elétrico. A análise de maciez foi realizada com aparelho Warner-Bratzler Shear Force, para determinação da força de cisalhamento (AMSA, 1995), considerando para cada bife o valor médio obtido nos seis cilindros.

Extrato etéreo

Para a determinação do extrato etéreo (EE) foi utilizado um bife retirado do m. *Longissimus dorsi*, da meia carcaça esquerda, sem a cobertura de gordura. As amostras foram congeladas, e em seguida moídas individualmente em aparelho Waring (Comercial Laboratory Blender). Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri, devidamente identificadas e pesadas, para serem liofilizadas. A liofilização foi realizada na empresa Terroni Equipamentos Científicos, localizada em São Carlos/SP. Em seguida, as amostras foram moídas manualmente e congeladas, para a determinação do extrato etéreo. Após o descongelamento das amostras a análise de extrato etéreo na carne foi realizada segundo a metodologia da AOAC, (1997) no Laboratório de

Bromatologia do Departamento de Produção e Nutrição Animal da FMVZ-USP, com o equipamento ANKOM XT15 extraction system.

Para se obter a porcentagem de gordura na carne utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\%EE = \frac{W_2 - W_3}{W_1} \times 100, \text{ na qual,}$$

- W1 é o peso amostra original;
- W2 o peso da amostra pré seca com o bag;
- e W3 o peso da amostra e bag após a extração.

Análise Estatística

Os dados de desempenho foram analisados em delineamento em blocos casualizados (Tabela 4) utilizando-se o procedimento MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Tabela 4. Análise de variância Experimento

Causas de variação	Graus de liberdade
Tratamento	3
Bloco	3
Resíduo	39
Total	45

A variável GMD foi calculada por regressão linear, baseada em medidas tomadas nos períodos experimentais.

Foi considerado o tratamento como efeito fixo e o bloco como efeito aleatório. Quando foi observado efeito dos tratamentos, as médias dos mesmos foram comparadas por contrastes ortogonais, utilizando-se o teste de F. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + b_i + t_j + ei_{jk}$$

Onde: Y_{ijk} foi a variável analisada, μ foi a média geral, b_i foi o efeito aleatório do i bloco, t_j foi o efeito fixo do tratamento j , e e_{ijk} foi o erro residual. Os efeitos de tratamentos foram considerados significativos ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho

As características de peso vivo inicial, peso vivo final, ganho médio diário, ingestão de matéria seca e eficiência alimentar dos novilhos em terminação não foram influenciadas pelas dietas experimentais (Tabela 5).

Tabela 5. Médias, erros-padrões da média e valores de P das características peso vivo inicial, peso vivo final, ganho médio diário, ingestão de matéria seca, eficiência alimentar em função das dietas experimentais.

Características	Dietas Experimentais ¹				EPM*	Valor-P
	CTL	U	O	UO		
Peso Vivo Inicial (kg)	325,0	306,8	310,6	311,7	6,20	0,325
Peso Vivo Final (kg)	441,8	430,4	424,9	442,3	7,56	0,291
Ganho médio diário (Kg)	1,59	1,54	1,46	1,66	0,08	0,342
Ingestão de matéria seca (kg/dia)	10,65	10,53	9,99	10,50	0,40	0,640
Ingestão de matéria seca %PV	2,58	2,65	2,66	2,52	0,06	0,364
Eficiência Alimentar (Kg ganho/Kg MS)	0,152	0,146	0,145	0,160	0,006	0,345

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média.

A suplementação protéica pode interferir no consumo de matéria seca, seja pela disponibilidade de frações nitrogenadas para a maximização da fermentação ruminal e síntese microbiana, ou pela quantidade e perfil de aminoácidos disponíveis

para a absorção no intestino delgado (NRC,1996). Todavia,efeito neste estudo, a ingestão de matéria seca (IMS) em kg/dia ou expressa em % de peso vivo, não foram influenciadas pelas fontes protéicas (P=0, 640; P=0, 364). Estes resultados corroboram aos obtidos por Seixas et al. (1999), Gleghorn et al. (2004), Tedeschi et al.(2002), Taylor-Edwards et al. (2008), Fernandes et al. (2009), os quais trabalharam com diferentes fontes protéicas na alimentação de bovinos e não verificaram diferenças para a IMS.

Os valores de IMS em kg/d observados neste estudo para as dietas experimentais (CTL:10,65; U:10,53; O:9,99; UO:10,50) foram superiores aos preditos pelo CNPS v.6.1 (CTL:7,27; U:7,03; O:7,06; UO:7,14).

Stock et al. (1981) sugerem que a combinação de proteína degradável (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR) é necessária para maximizar o desempenho. Esta hipótese foi confirmada neste estudo no qual as dietas experimentais eram compostas por farelo de soja e fontes de uréia, em diferentes porcentagens e proporcionaram um GMD de 1,56 Kg/dia, o qual foi superior ao predito pelo CNCPS v.6.1 de 1,36 kg/dia.

Não foram observadas diferenças (P>0,05) no peso vivo final, ganho médio diário (GMD) e eficiência alimentar entre as dietas experimentais.

Na literatura, há estudos com resultados contrastantes sobre os efeitos das fontes de NNP no GMD de bovinos em terminação.

Taylor-Edwards et al. (2008) alimentaram novilhos em terminação com silagem de milho suplementados com níveis (0,4, 0,8, 1,2 e 1,6%) de uréia e uréia de liberação lenta e verificaram similar GMD para os níveis 0,8 e 1,2%. Entretanto, observaram redução no GMD para o nível 1,6% de uréia de liberação lenta, próximo ao deste estudo (1,8%).

Fernandes et al. (2009) avaliaram a substituição de uréia por farelo de soja em novilhos com dietas de elevado teor de concentrado (90%) e verificaram menor GMD para a dieta com maior porcentagem de uréia como fonte protéica.

Contudo, a maioria dos estudos encontrou resultados similares aos verificados no presente estudo. Seixas et al. (1999), não verificaram diferenças no GMD em

novilhos alimentados com amiréia 30, uréia ou farelo de algodão. No mesmo sentido, Tedeschi et al. (2002) não observaram variações no GMD suplementando novilhos em terminação com 85% de silagem de milho com Optigen, Uréia, ou a combinação destes. Da mesma forma, Gleghorn et al. (2004) alimentaram novilhos com 100% de uréia, 50% uréia+ 50% farelo de algodão e 100% de farelo de algodão e também não verificaram efeito no GMD.

Por outro lado, Pirez et al. (2004) observaram maior GMD para os animais alimentados com uréia e amiréia em substituição ao farelo de soja. Os autores atribuíram o aumento no GMD aos diferentes níveis de PDR entre os tratamentos farelo de soja (58,4% da PB), uréia e amiréia (75,3% PB).

Provavelmente a falta de resultados no desempenho observadas no presente estudo pode ser atribuída ao mesmo nível de PDR observado nas dietas (CTL:77,46; U:78,31; O:76,67, UO:77,7 % PB), fato este que pode ter prejudicado a detecção de possíveis resultados das fontes de NNP em substituição ao farelo de soja. Além disto, a ausência de uma resposta no desempenho quando a uréia é substituída por uréia de liberação lenta pode ser explicada por alguns fatores como :

- 1) A reciclagem de N mantém a concentração de N constante no rúmen (Smith et al., 1975), o que pode ter contribuído para mascarar os efeitos das fontes de NNP.
- 2) É possível que os compostos de uréia de liberação lenta sejam removidos do rúmen antes que ocorra a adaptação destes compostos (Johnson e Clemens 1973) devido à rápida taxa de passagem.
- 3) Segundo Smith (1975), depois que os microrganismos ruminais são adaptados aos compostos de liberação lenta, a uréia de liberação lenta pode ser degradada na mesma intensidade que a uréia convencional.

É difícil afirmar qual destes fatores contribuiu para o desempenho semelhante entre os animais alimentados com uréia e uréia de liberação lenta, entretanto, pode-se assegurar que o composto de uréia de liberação lenta utilizado neste estudo o Optigen, promoveu desempenho semelhante aos animais alimentados com uréia, sem os riscos potenciais de intoxicação associados com a alimentação com uréia convencional.

Características de Carcaça

Não foi verificado efeito das dietas experimentais no peso de carcaça quente (PCQ), rendimento de carcaça quente (RCQ), área do olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) (Tabela 6).

Tabela 6. Médias, erros-padrões da média e valores de P das características peso de carcaça quente (PCQ), rendimento de carcaça quente (RCQ), área do olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) em função das dietas experimentais

Características	Dietas Experimentais				EPM*	Valor-P
	CTL	U	O	UO		
PCQ (kg)	260,17	252,97	248,49	258,56	4,56	0,267
RCQ (%)	58,86	58,91	58,48	58,47	0,45	0,837
AOL (cm ²)	73,74	73,25	69,67	71,07	0,32	0,481
EGS (mm)	3,61	3,63	3,33	3,88	2,11	0,68

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média.

Segundo Gleghorn et al. (2004), têm sido demonstrados diferentes efeitos da influência de fontes suplementares de proteína bruta nas características avaliadas na carcaça. Diferentemente ao observado neste estudo, Milton et al. (1997), verificaram efeito quadrático no PCQ com o aumento da concentração de uréia na dieta. Por outro lado, Tedeschi et al. (2002) não observaram efeitos nas características de carcaça suplementando novilhos em terminação com Uréia, Optigen ou a combinação destes. Similarmente, Gleghorn et al. (2004) não observaram efeito no PCQ, trabalhando com uréia em substituição ao farelo de algodão. Os trabalhos citados acima que não verificaram efeitos das fontes protéicas nas características de carcaça, também não encontraram diferenças no desempenho. Consequentemente, similarmente aos trabalhos citados anteriormente, no presente estudo não foram detectadas diferenças entre as características de carcaça, uma vez que o desempenho dos animais foi semelhante para as dietas experimentais.

Deste modo, pode-se afirmar que o desenvolvimento muscular (proporcional à AOL) foi semelhante nas quatro dietas, o que já era esperado, devido a falta de respostas no desempenho dos animais.

De acordo com Abularach (1998) quanto maior a área de olho de lombo (AOL), maior será o rendimento da carcaça em cortes comercializáveis e a espessura de gordura subcutânea (EGS) é importante para os atributos qualitativos da mesma.

Os valores observados para AOL foram superiores aos valores observados por Andrighetto (2009), que afirmou que valores de AOL entre 66 e 69 cm² são indicativos de um bom rendimento de cortes cárneos.

Segundo Felício (1997), a indústria frigorífica exige cobertura de gordura de 3 a 6 mm, pois carcaças com adequada cobertura de gordura reduzem os efeitos de desidratação e encurtamento das fibras musculares, o que pode causar o endurecimento da carne. Portanto, pode-se observar que os resultados obtidos (3,61 mm) encontram-se dentro da expectativa da indústria brasileira.

Qualidade da Carne

Seguindo os padrões verificados para as características de desempenho e características de carcaça, não foram observados efeitos da substituição de farelo de soja por diferentes fontes de NNP nas características de qualidade da carne avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7. Médias, erros-padrões e probabilidades (P) das características pH, Temperatura, L*, a* e b*, força de cisalhamento (kg), perdas por cocção(%), índice de marmorização e extrato etéreo para as dietas experimentais

Características	Dietas Experimentais ¹				EPM*	Valor-P
	CTL	U	O	UO		
pH 1h	6,86	6,69	6,65	6,82	0,07	0,12
pH 24hs	5,42	5,47	5,46	5,44	0,02	0,36
Temperatura 1h	35,59	35,69	35,47	34,64	0,68	0,69
Temperatura 24hs	9,25	9,5	9,25	12,13	3,49	0,42
L*	39,65	38,48	39,08	38,74	0,42	0,22
a*	18,11	18,13	17,74	17,81	0,3	0,71
b*	15,55	15,20	15,22	15,00	0,23	0,42
Força de Cisalhamento (Kg)	4,73	4,91	4,91	5,01	0,19	0,81
Perdas por Cocção (%)	27,02	25,87	26,71	25,75	0,6	0,36
índice de Marmorização	4,84	4,65	4,72	4,77	0,86	0,43
Extrato Etéreo (%)	2,76	2,35	2,64	2,49	1,03	0,43

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que avaliaram a substituição de uma fonte de proteína verdadeira por uréia e uréia de liberação lenta na qualidade da carne de bovinos em terminação. Desta forma, serão discutidos os valores obtidos para as variáveis testadas quanto aos padrões para bovinos Nelore.

Diante dos resultados, pode-se observar que os valores de pH após 24 horas de maturação permaneceram entre 5,42 e 5,47. Valores de pH final entre 5,4 e 5,8 são considerados normais, ou típicos para a carne bovina (Judge et al., 1989; Koomaraie et al., 1991; Luchiari Filho, 2000). Sendo assim, pode-se dizer que não ocorreu anomalia DFD (“dark, firm and dry”), denominados cortes escuros, que está relacionado a músculos com valores de pH acima de 6,0, associado principalmente com o estresse pré-abate (Tarrant et al., 1980).

Com relação à temperatura, pode-se observar que os valores finais permaneceram entre 9,25°C e 16,53°C. Segundo Sarcinelli et al. (2007) o ideal é que a temperatura interna da carcaça mantenha-se a 7°C. Esses valores mais altos podem ser

consequência do tempo de entrada de algumas carcaças na sala de desossa, pois algumas permaneceram na antecâmara até o momento da desossa, fator este que pode ter interferido nos dados finais de temperatura.

Evidenciando os resultados referentes à cor da carne observados neste estudo, Loxton (1993) afirmou que o manejo alimentar tem pouca influência na cor de cortes frescos.

Os valores observados para L^* e a^* (38,98 e 17,94) situam-se dentro dos padrões de variação citados por Muchenja et al. (2009) para carne bovina (L^* :33,2 a 41, a^* :11,10 a 23,60). Entretanto, para b^* não há justificativa para o resultado encontrado (15,24), uma vez que segundo Muchenja et al. (2009), o padrões de variação para b^* são de 6,1 a 11,3.

O valor médio observado da força de cisalhamento (FC) no presente estudo foi de 4,89 kg. Independente dos tratamentos, valores de FC de 3,9 kg a 4,5 kg são considerados macios (Leme et al., 2002), portanto esses valores foram atribuídos às carnes macias, inclusive atendendo aos padrões internacionais de maciez de carne.

Em relação às perdas por cocção, pode-se observar que os valores variaram de 24% a 27%, sendo que a média foi cerca de 26%.

A marmorização da carne, que representa a gordura intramuscular e, de modo geral, contribui positivamente no sabor e maciez da carne, pode ser influenciada pelo tipo de alimentação, pela espécie e pelo peso de abate, com maior deposição de gordura no tecido intramuscular. Porém, já que neste estudo não foram verificadas diferenças quanto a EGS e extrato etéreo da carne, o índice de marmorização seguiu a mesma tendência de resultado.

Os valores para o índice de marmorização variaram de 4,65 a 4,84, sendo que a média foi de 4,74 caracterizando a carne como tendo marmorização de grau “select” (Meat Evaluation Handbook, 1973).

Os valores de extrato etéreo no músculo *Longissimus dorsi* variaram no presente estudo de 2,35% a 2,76%, tendo como média 2,56%. Esses valores foram superiores aos observados por Abularach et al. (1998), que constataram 1,71% de extrato etéreo em bovinos Nelore confinados.

Semelhantes características de qualidade da carne entre as dietas experimentais eram esperadas, uma vez que as dietas proveram quantidades de NDT (CTL:72,9 U:75,1, O:76,7 UO:73,5) e PDR (CTL:11,3, U:11,0 O:10,7, UO:10,9%) similares, fatores estes que contribuíram para não proporcionar efeitos no desempenho, características de carcaça, e conseqüentemente na qualidade da carne dos animais do presente estudo.

CONCLUSÃO

A substituição parcial do farelo de soja pelas fontes de nitrogênio não proteico (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) mostraram-se semelhantes ao farelo de soja sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos Nelore em terminação.

IMPLICAÇÕES

A substituição parcial do farelo de soja por diferentes fontes de NNP pode ser utilizada como uma alternativa na nutrição protéica de bovinos em confinamento, uma vez que proporcionou desempenho, característica de carcaça e qualidade de carne semelhantes.

Partindo-se dos resultados obtidos neste estudo, encoraja-se a condução de um projeto que avalie o efeito da substituição do farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta com diferentes níveis de proteína degradável no rúmen.

CAP 3

Efeitos da substituição do farelo de soja por uréia ou uréia de liberação lenta na digestibilidade aparente total, produção de proteína microbiana, quantificação de microrganismos ruminais e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos Nelore.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi identificar a melhor fonte de nitrogênio não protéico (NNP), (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) para a substituição parcial ao farelo de soja, avaliando seus efeitos na fermentação ruminal, digestibilidade aparente total, produção de proteína microbiana, contagem de microrganismos ruminais e parâmetros sanguíneos de bovinos Nelore. Para tanto, quatro novilhos Nelore com cânulas ruminais (PV 407,1 ± 11,7 kg) foram distribuídos em um quadrado latino (4×4) durante quatro períodos de 21 dias. As dietas foram formuladas isoproteicas e isoenergéticas, com os seguintes tratamentos: 1) Controle (**CTL**): composta por 12% de farelo de soja, 2) Uréia (**U**): com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia, 3) Optigen (**O**): com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia de liberação lenta e 4) Uréia e Optigen (**UO**): com a substituição de 6 % da proteína do farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta, tendo como volumoso o bagaço e a silagem de cana totalizando 21,5% da MS. Não foi observado efeito das dietas experimentais ($P > 0,05$) no consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total, com exceção do consumo de extrato etéreo que foi maior nos animais alimentados com as fontes de NNP (U:0,19, O:0,20 e UO:0,19 kg/d) em relação a dieta CTL (0,17 kg/d). A concentração de nitrogênio amoniacal, proporção molar, porcentagem e total de ácidos graxos de cadeia curta no líquido ruminal foram semelhantes entre as dietas. No entanto, os animais alimentados com a dieta CTL apresentaram maior ($P = 0,017$) pH ruminal (6,81) em relação as fontes de NNP (U:6,64, O:6,63 e UO:6,76). A quantidade de todos os gêneros de protozoários ciliados foram aumentados no conteúdo ruminal dos animais alimentados com as fontes de NNP em relação à dieta controle ($P < 0,001$). Foi observada maior produção de proteína microbiana para as dietas com NNP, devido aos maiores valores de alantoina ($P = 0,074$), purinas totais ($P = 0,090$), purinas microbianas absorvidas ($P = 0,091$), nitrogênio microbiano ($P = 0,091$) e proteína bruta microbiana ($P = 0,091$) observados

quando comparadas a dieta CTL. A concentração plasmática de glicose, uréia no plasma e nitrogênio ureico no soro foram maiores na dieta CTL ($P=0,012$; $0,017$ e $0,017$, respectivamente) em relação as fontes de NNP. A substituição parcial de farelo de soja por uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação de uréia e uréia de liberação lenta, resultou em melhor eficiência de utilização protéica pelos animais, entretanto, a uréia e a uréia de liberação lenta foram semelhantes nas variáveis analisadas.

Palavras-chave: bovinos, Optigen, nitrogênio, protozoários, uréia

Effects of the replacement of soybean meal for urea or slow releasing urea on the digestibility, microbial protein synthesis, microorganisms quantification and ruminal and blood parameters on Nelore steers

ABSTRACT: This study aimed to identify the best source of non protein nitrogen (urea, slow releasing urea and their combination) for the partial replacement of soybean meal, and its effect on the ruminal fermentation, total apparent digestibility, microbial protein production, ruminal microorganisms and blood parameters in Nelore steers. Four Nelore steers (BW 407,1 ± 11,7 kg) with ruminal canulas were allotted in a (4×4) square design for four 21 days periods. Steers were fed isoproteic and isoenergetic diets as follows: 1)Control (**CTL**): 12% of soybean meal 2)Urea (**U**): the replacement of 6% of soybean meal protein for urea, 3)Optigen (**O**): the replacement of 6% of soybean meal protein for slow releasing urea and 4)Urea and Optigen (**UO**): the replacement of 6% of soybean meal protein for urea and slow releasing urea, with 21.5% of the total DM of sugarcane silage and bagasse as roughage. There was no effect of experimental diets ($P > 0.05$) on nutrient intake and total apparent digestibility, but ether extract intake was higher in animals fed NPN diets (U:0.19, O:0.20 e UO:0.19 kg/d) when compared to the CTL diet (0.17 kg/d). The ruminal ammonia N concentration and the ruminal short-chain fatty acid concentrations were similar among the diets. Therefore, the animals fed the CTL diet had increased ($P=0.017$) ruminal pH (6.81) when compared to the NPN diets (U:6.64, O:6.63 e UO:6.76). The NPN diets provided more protozoa than the CTL diet. ($P<0.001$). It was observed an increase production of microbial protein to the NPN diets due to the higher values of allantoin ($P=0.074$), total purine ($P=0.090$), microbial purine absorbed ($P=0.091$), microbial N ($P=0.091$) and microbial crude protein ($P=0.091$) observed when compared to the CTL diet. The CTL diet had higher blood concentration of glucose ($P=0.012$) plasma urea ($P=0.017$) and serum urea nitrogen ($P=0.017$) when compared with the NPN sources. The partial replacement of soybean meal for urea, slow releasing urea or their combination resulted in better efficiency on protein utilization by the animals,

Keywords: beef cattle, Optigen, nitrogen, protozoa, urea

INTRODUÇÃO

A proteína é o nutriente considerado mais importante e também o mais caro em dietas para bovinos e, portanto deve ser eficientemente utilizado (Cherdthong, 2010).

Os ruminantes têm a capacidade de utilizar fontes de nitrogênio não-protéico (NNP) como fonte de nitrogênio para síntese de proteína microbiana (Highstreet et al., 2010).

A uréia é a fonte mais comumente utilizada de NNP em dietas para bovinos de corte devido a sua alta disponibilidade e baixo custo quando comparada a fontes de proteína verdadeira como o farelo de soja.

Todavia, a rápida degradação da maioria dos compostos de nitrogênio não protéico em amônia é frequentemente mais rápido que a utilização de amônia pelos microrganismos ruminais, resultando em amônia sendo absorvida através da parede ruminal como íon amônio (Satter e Roffler, 1975), a qual é convertida em uréia e excretada na urina (Highstreet et al., 2010).

A uréia de liberação lenta é mais lentamente hidrolisada em amônia do que a uréia convencional e poderia ser utilizada de forma mais eficiente pelos microrganismos ruminais (Galo et al 2003), uma vez que proporciona um fornecimento estável de amônia para as bactérias ruminais (Highstreet et al., 2010). Em adição, a utilização de uréia de liberação lenta poderia diminuir o custo metabólico associado com a conversão de amônia em uréia no fígado (Highstreet et al., 2010).

Resultados variados tem sido verificados na literatura com a substituição de proteína vegetal por uréia (Milton et al., 1997; Ferrell et al., 2001; Rennó et al., 2005; Paixão et al. 2007; Chizzotti et al., 2008) ou uréia de liberação lenta (Tedeschi et al., 2002; Galo et al., 2003; Galina et al., 2003; Oliveira Junior et al., 2004a; Huntington et al., 2006; Taylor-Edwards et al., 2008; Highstreet et al., 2010; Alvarez Almora et al., 2011) em bovinos.

Com base na literatura investigada, hipotetiza-se que a substituição de farelo de soja por diferentes fontes de NNP proporcione diferentes comportamentos quanto à fermentação ruminal, produção de proteína microbiana, quantificação de

microrganismos ruminais e parâmetros sanguíneos sem influenciar o consumo e a digestibilidade aparente total. Em adição, espera-se que os animais alimentados com as dietas contendo uréia de liberação lenta (Optigen), apresentem reduzida concentração ruminal de N amoniacal e maior produção de proteína microbiana.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a melhor fonte de NNP (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) em substituição parcial ao farelo de soja na fermentação ruminal, digestibilidade aparente total, produção de proteína microbiana, quantificação de microrganismos ruminais e parâmetros sanguíneos de bovinos Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Instalação Experimental

O ensaio de pesquisa foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga-São Paulo.

Foram utilizados quatro novilhos da raça Nelore com idade e peso médio inicial de 22 meses e $407,1 \pm 11,7$ kg portadores de cânulas ruminais. Os animais foram alocados no Estábulo Experimental que consiste basicamente de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos individuais.

Delineamento Experimental e Tratamentos

Foi utilizado o quadrado latino balanceado (Tabela 8) como delineamento experimental com quatro períodos e quatro tratamentos (dietas experimentais), como segue:

Tratamento CONTROLE (CTL): composto por 12% de farelo de soja

Tratamento URÉIA (U): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia na mesma quantidade de proteína bruta

Tratamento OPTIGEN (O): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia de liberação lenta (Optigen) na mesma quantidade de proteína bruta

Tratamento URÉIA+OPTIGEN (UO): com a substituição de 6 % de farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta (Optigen) na mesma de proteína bruta

A proporção dos ingredientes na dieta total, assim como a respectiva composição químico-bromatológica das dietas experimentais, concentrados e ingredientes são descritas nas Tabelas 1,2 e 3 (capítulo 2) e demais informações sobre as dietas experimentais encontram-se no capítulo 2.

Manejo Nutricional

Os novilhos foram mantidos separados e a alimentação foi fornecida individualmente duas vezes ao dia, as 8:00 e as 16:00 horas. Diariamente, foram realizadas pesagens dos volumosos, concentrados fornecidos e das sobras de cada dieta experimental, para a estimativa do consumo individual de matéria seca. O ajuste da ração era realizado de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior de forma a ser mantido um percentual de sobras de 5% do fornecido para não haver limitação de consumo.

Período Experimental

O experimento foi composto por quatro períodos experimentais, cada um com duração aproximada de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e seis dias para colheita de amostras e um dia para colheita de urina, sendo que o sangue foi coletado ao final do período de colheita de urina (Figura 3). Ao final de cada período experimental os animais eram soltos e descansavam sete dias em um piquete antes do início do período subsequente.

horas, segundo adaptação de técnica descrita por (Casali, 2008). Após a retirada dos sacos do rúmen, estes foram lavados com água corrente até o total clareamento, e imediatamente conduzidos à estufa de ventilação forçada (60º/72 horas). Após este período, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não ventilada (105º/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados, obtendo-se a matéria seca indigestível. Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (Mertens, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon[®]. Após este período foram lavados com água quente e acetona, sendo secos e pesados conforme procedimento anterior. Ao final deste tratamento, obteve-se a FDAi.

Amostragem de líquido ruminal

As amostras de conteúdo ruminal foram colhidas durante os períodos experimentais em três pontos diferentes no rúmen, através de uma bomba de vácuo. Foram retirados pelo menos 500 ml de conteúdo ruminal, que foram devolvidos ao rúmen-retículo, após a colheita das devidas alíquotas. Tais amostragens foram realizadas às 0, 2, 4, 6 e 8 horas após o arraçoamento matinal efetuado às 8:00 hs.

Fermentação Ruminal

A fermentação ruminal foi avaliada por meio de pH, concentração de N-NH₃ e ácidos graxos de cadeia curta .

- pH Ruminal

Imediatamente após a colheita, 100 ml de fluído ruminal foram utilizados para a determinação do pH em potenciômetro digital portátil, calibrados com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

- Ácidos Graxos de cadeia curta (AGCCs)

Uma alíquota de aproximadamente 100 ml de conteúdo ruminal foi centrifugada a 3.500 rpm por 15 minutos; 1 ml do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio arrolhado e adicionar-se-á 0,2 ml de ácido fórmico P.A., armazenando-se em congelador à -20°C até o momento da análise.

A determinação dos AGCCs contidos no conteúdo ruminal foi realizada através de cromatografia gasosa, segundo método preconizado por Erwin et al. (1961). Para tal, foi utilizado um cromatógrafo a gás (marca FINNIGAN modelo 9001) equipado com coluna de vidro de 2 m de comprimento e 1/4 de polegada de diâmetro empacotada com 80/120 CarbopackTM B-DA/4%. Carbowax 20M. Os gases utilizados foram o nitrogênio como gás de arraste na vazão de 25 ml/min, oxigênio como gás comburente na vazão de 175 ml/min, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 15 ml/min.

Foram preparadas e padronizadas soluções padrões a 0,1 Normal de ácido acético, propiônico e butírico com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 Normal, para produzir solução padrão de ácidos graxos de cadeia curta de concentração conhecida Injetou-se 01 μl de amostra em um cromatógrafo integrado a um computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia. A determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi realizada pelo método de ácido salicílico. Posteriormente, 1 ml tungstato de sódio a 10% foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico Normal e as amostras foram centrifugadas a 1200 g durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 μl do sobrenadante a um tubo de ensaio, no qual foi adicionado 5 ml do reagente fenol e 5ml de hipoclorito. Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras e colocados em banho maria a 37°C durante 15 minutos adquirindo coloração azul. Após resfriamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro quanto a sua absorbância e os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração em mg/dl,

onde: Concentração de N-NH₃ (mg/dl) = Absorbância (a)/b; b= r² da equação elaborada a partir do padrão. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras seja inferior a 5%. Foram quantificados AGCCs totais, ácidos acético, propiônico e butírico e relação acético: propiônico.

- Nitrogênio Amoniacal

Alíquotas de 2 ml de conteúdo ruminal foram colocadas em tubos de ensaios contendo 1 ml de solução de ácido sulfúrico 1 N e armazenadas sob refrigeração até a realização das análises.

A determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi realizada por colorimetria, segundo método proposto por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

Quantificação de microrganismos ruminais

Foram realizadas colheitas de conteúdo ruminal para identificação e contagem de gêneros de protozoários ciliados e para contagem das bactérias ruminais *Fibrobacter Succinogenes*, *Streptococcus Bovis* e *Ruminococcus albus*.

- Protozoários

Para contagem de ciliados, foram realizadas coletas logo antes da alimentação dos animais e após quatro horas de alimentação, no mesmo dia das colheitas de material para análise de fermentação ruminal. No laboratório, uma alíquota de 10 mL de conteúdo ruminal foi transferida para frascos de vidro com 10mL de formaldeído a 37%. As amostras permaneceram em repouso até o momento das determinações que foram executadas de acordo com metodologia de Dehority (2003) para determinação das curvas de aparecimento dos gêneros de ciliados, utilizando câmara de contagem de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1mL. Utilizou-se microscópio ótico comum provido de retículo com área de 0,4362 mm².

- Quantificação de Bactérias

As amostragens para contagem das bactérias foram realizadas três dias do período de colheita, duas vezes ao dia: antes da alimentação matinal e oito horas após a alimentação. Foram colhidos aproximadamente 600 mL de conteúdo ruminal que eram identificados e congelados a -20°C para posteriores análises. Foram quantificadas as bactérias *Streptococcus bovis*, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus*.

Imediatamente após o descongelamento das amostras, os 600 ml de conteúdo ruminal, foram adicionados a 600 ml de solução salina estéril (0,9 %), em um Becker de 2.000 mL, e homogeneizado com a ajuda de um bastão de vidro. Após homogeneização, o conteúdo ruminal foi filtrado em três camadas de gaze, acondicionado em tubos Falcon de 50 ml e foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 min a 4°C, o pelete foi ressuspenso em 2,0 ml de solução salina estéril e armazenados em microtubos de 1,5 ml a -80°C para posteriores extração do DNA e amplificação por PCR. O DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o kit comercial “QIAamp DNA Stool Mini Kit”, seguindo-se as recomendações do fabricante e, em seguida, submetidas à reação em cadeia da polymerase (PCR) para otimização das condições da reação, e verificação da especificidade dos primers utilizados (Tabela 8).

As reações em cadeia de polymerase (PCR) foram realizadas com o objetivo de comprovar a qualidade dos primers de acordo com a capacidade de amplificação do inserto de DNA predito. Foi preparado um mix, utilizando-se em cada reação: 1 µL de dNTP (10 mM), 5 µL de tampão de PCR 10 X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,25 µL de primer_F (10 µM), 1,25 µL de primer_R (10 µM), 0,25 µL de Taq (*Termophilus aquaticus*) DNA polymerase (5 U/µL) e H₂O_{MiliQ} estéril para completar 49 µL.

Tabela 8. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

Espécie de Bactéria	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Anelamento/ Tamanho Produto	Referência
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCCTGAACTATC	62°C 445 pb	Tajima et al. (2001)
<i>Ruminococcus albus</i>	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55°C 175 pb	Koike e Kobayashi (2001)
<i>Streptococcus bovis</i>	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG	57°C 869 pb	Tajima et al. (2001)
<i>Eubacteria Universal</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	58°C 193 pb	Muyser et al. (1993)

A amplificação ocorreu em um volume final de 50 µL, sendo 1 µL de DNA e mais 49 µL do mix, utilizando um termociclador PXE 0.2 (Thermo Electron Corporation), com a seguinte programação: 1 ciclo de 94 °C por 45 seg; seguido por 44 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento a 55 °C por 30 seg e extensão 72 °C por 30 seg; e finalizada com 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto, 1 ciclo de 55 °C por 30 seg, 1 ciclo de 72 °C por 1 min e 4 °C infinito. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2% para verificação da existência e comprovação do número de pares de bases dos insertos amplificados.

RT-PCR em tempo real

As amplificações em PCR em tempo real foram realizadas com o objetivo de quantificar a expressão gênica relativa das bactérias ruminais. Foram feitas curvas padrão com diluição do DNA de cada microorganismo que, através da inclinação da curva (*slope*), determinaram a eficiência das reações. As detecções das amplificações por PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *StepOne*[®] (Applied Biosystems[®] – Life Technologies do Brasil) utilizando o reagente *SYBR Green master*

mix 2 X (Applied Biosystems® – Life Technologies do Brasil), composto pelo corante *SYBR Green*, dNTPs, MgCl₂, tampão e *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase*.

Após padronização, as reações foram definidas como: 10 µL de *SYBR Green master mix 2 X*, 1,2 µL de cada iniciador (5 µM), 6,6 µL H₂O_{MiliQ} estéril e 1 µL de DNA, perfazendo um volume final de 20 µL. Em todas as reações foram utilizados controles negativos, contendo H₂O_{MiliQ} estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em duplicatas (curva padrão) ou triplicatas (quantificação dos microorganismos), em tubos com tampas ópticas transparentes e planas ou em placas com adesivo óptico, que permitem a passagem da luz. A programação do equipamento foi: 1 ciclo de 95 °C por 10 min, denominado *holding stage*, que tem por função parar a atividade da enzima *Uracil-N-Glicosilase* (UNG), a qual degrada DNA dupla fita contendo uracila; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg e anelamento a 60 °C por 1 min. Após os ciclos de amplificação, procedeu-se a curva de dissociação que ocorre entre 60 e 95 °C, com ciclos subsequentes de 95 °C por 15 seg e 60°C por 1 min, colhendo pontos a cada aumento em 0,3 °C na temperatura.

Determinação da Proteína Microbiana

Para a análise de proteína microbiana foram realizadas coletas spot de urina, quatro horas após a alimentação dos animais. Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas dos novilhos no 21º dia de cada período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção espontânea. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando-se reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração na

urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 27,76 mg/kg de peso vivo (Rennó et al., 2008). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dl) da amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por novilho/dia. Os níveis de alantoína e ácido úrico na urina foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992). A excreção total de derivados de purina foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (DP - 0,236 * PV^{0,75}) / 0,84$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e 0,236, a excreção endógena de derivados de purina (Orellana Boero et al., 2001).

Foram avaliadas também as purinas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de $0,512 * PV^{0,75}$ e a recuperação de 0,70 (Gonzalez- Ronquillo et al., 2003). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (Chen e Gomes, 1992): $Nmic = (70 * Pabs) / (0,83 * 0,134 * 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (Valadares et al., 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

Parâmetros Sanguíneos

As coletas de sangue dos animais foram realizadas no 21º dia de cada período experimental anteriormente ao arraçoamento matinal. O sangue foi colhido em tubos do tipo *vacutainer* de 10 ml para a dosagem dos parâmetros sanguíneos proteínas totais, albumina, as enzimas aspartato amino transferase (AST), gama glutamil transferase (GTA) e fosfatase alcalina (FA), glicose, uréia e nitrogênio uréico no soro.

Logo após a colheita, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos. O soro foi pipetado para tubos ependorf identificados e armazenados a -20 Cº para posteriores análises laboratoriais.

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no, por meio de kits comerciais (Laborlab® e CELM®) que utilizam método enzimático colorimétrico de ponto final, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (SBA-200-CELM®).

Análise Estatística

Neste estudo foi utilizado como delineamento experimental um quadrado latino (4x4) balanceado, com quatro animais, tratamentos e períodos, onde cada animal recebeu um tratamento em cada período (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de variância do Experimento

Causas de variação	Graus de liberdade
Tratamento	3
Linha (período)	3
Coluna (animal)	3
Resíduo	6
TOTAL	15

Os resultados foram analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS.

Apenas os dados obtidos nas análises de contagem de protozoários foram submetidos à função logarítmica [$\text{Log}(X+1)$], por não atender as premissas estatísticas.

Para as análises de consumo, digestibilidade aparente total, proteína microbiana e parâmetros sanguíneos, as dietas experimentais foram consideradas como efeito fixo, animal e período como efeito aleatório. Foi incluído no modelo efeito

do tempo, referente aos diferentes dias de amostragem, nas análises de fermentação ruminal, quantificação de bactérias e número de protozoários.

Quando foi observado efeito dos tratamentos, as médias dos mesmos foram comparadas por contrastes ortogonais, utilizando-se o teste de F. Foi utilizado um nível de significância de $P \leq 0,09$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Consumo

Os resultados referentes ao consumo diário de nutrientes, de acordo com as dietas experimentais podem ser observados na Tabela 10.

O consumo de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais foram semelhantes ($P > 0,05$) entre as dietas experimentais. No entanto, foi verificado efeito das dietas experimentais no consumo diário de extrato etéreo.

Os animais alimentados com a dieta CTL apresentaram menor consumo de EE ($P = 0,006$) quando comparados aos animais alimentados com as fontes de NNP ($P > 0,05$), sem diferenças quanto aos animais alimentados com ureia em relação a ureia de liberação lenta.

Tabela 10. Médias, erros padrões da média e valores de P dos consumos de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), carboidratos totais (CT), fibra em detergente neutro (CFDN), carboidratos não fibrosos (CCN) e nutrientes digestíveis totais (CNDT) obtidos para as dietas experimentais.

Variável	Dietas Experimentais ¹				EPM*	Valor-P
	CTL	U	O	UO		
CMS, kg/dia	7,95	7,40	7,67	7,44	0,29	0,554
CMS, %PV	1,80	1,67	1,77	1,67	0,07	0,424
CMO, kg/dia	7,61	7,15	7,38	7,18	0,28	0,645
CPB, kg/dia	0,90	0,85	0,88	0,89	0,03	0,415
CFDN, kg/dia	2,83	2,81	3,10	2,68	0,11	0,163
CEE, kg/dia	0,17	0,19	0,20	0,19	0,01	0,023
CCT kg/dia	6,52	6,07	6,34	6,12	0,22	0,502
CCNF kg/dia	3,72	4,01	4,02	4,12	0,11	0,213
CNDT, kg/dia	5,93	5,98	6,45	6,16	0,55	0,712

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média

No mesmo sentido deste estudo, Rennó et al. (2005) verificaram semelhante consumo de nutrientes na substituição do farelo de soja por uréia na dieta de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos em dietas com 50% de feno.

Já, Chizotti et al. (2008), não observaram efeito no consumo diário de MS, MO, PB, FDN e NDT de animais fistulados e alimentados com níveis crescentes de uréia (0, 15,5, 31, e 46.5%) na dieta. Todavia, os autores constataram efeito no consumo diário de extrato etéreo e carboidratos não fibrosos.

Apesar de não ter sido detectado efeito no consumo diário de CNF, observou-se um aumento numérico deste nutriente para as fontes de NNP.

O aumento significativo e numérico verificados no consumo diário EE e CNF respectivamente, podem ser atribuídos ao aumento da adição de milho nas dietas com NNP em substituição ao farelo de soja (Tabela 2), semelhante ao observado por Chizotti et al. (2008).

Highstreet et al. (2010) estudaram o efeito da inclusão de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vacas em lactação e não verificaram variações nos consumos de matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro e proteína bruta.

Digestibilidade Aparente Total

Os resultados de digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes podem ser observados na Tabela 11.

Os coeficientes de digestibilidade aparente total da MS e dos demais nutrientes foram semelhantes entre as dietas experimentais ($P>0,05$).

Tabela 11. Médias, erros padrões da média e valores de P para os coeficientes de digestibilidade aparentes totais da matéria seca (CDMS), matéria orgânica (CDMO), proteína bruta (CDPB), extrato etéreo (CDEE), carboidratos totais (CDCT), fibra em detergente neutro (CDFDN), e carboidratos não fibrosos (CDCNF) obtidos para as dietas experimentais.

Variável	Dietas Experimentais ¹				EPM*	Valor-P
	CTL	U	O	UO		
%						
CDMS	70,21	69,47	70,73	71,79	1,56	0,765
CDMO	68,92	68,42	69,59	70,66	1,62	0,787
CDPB	67,09	63,87	67,22	65,78	2,28	0,716
CDEE	56,20	56,40	58,03	56,37	1,83	0,879
CDCT	72,20	73,80	74,35	73,90	1,66	0,874
CDFDN	49,38	52,17	52,59	51,41	2,10	0,719
CDCNF	78,51	82,52	82,91	82,14	1,14	0,362

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média

Similarmente ao observado neste estudo, Paixão et al. (2007) não verificaram efeito da uréia sobre a digestibilidade da MS e demais nutrientes, quando substituíram o farelo de soja por uréia em dois níveis de concentrado (0.75 or 1.25% do PV). No mesmo sentido, Ferrel et al. (2001) não verificaram diferenças na digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e energia para a dieta com uréia (11,4% PB) quando comparada a dieta com farelo de soja (11,2%PB) em carneiros alimentados com 95% de concentrado.

Chizzotti et al. (2008) avaliaram níveis crescentes de uréia (0, 15,5, 21,5 e 46,5%) na dieta de novilhos e verificaram aumento linear no CDPB aparente total com o aumento dos níveis de uréia na dieta, entretanto, os demais coeficientes de digestibilidade não foram influenciados. Os autores atribuíram o aumento da

digestibilidade aparente da PB à maior absorção de amônia dos tratamentos com NNP do que do tratamento com farelo de algodão (sem uréia). Contudo, Chizzotti et al. (2008) observaram aumento nos níveis de PDR %PB (64.5 67.6 73.9 81.8%) com o aumento de uréia na dieta (0, 15,5. 21,5 e 46,5%), fato que não foi observado no presente estudo.

Highstreet et al. (2010) verificaram digestibilidade aparente total da proteína bruta e fibra em detergente neutro semelhantes com a inclusão de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vacas em lactação.

Galina et al. (2003) alimentaram novilhos zebuínos com 100% de cana-de-açúcar, cana-de-açúcar suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e cana-de-açúcar: milho (40:60%) suplementada com 1,8 kg de MS de uréia de liberação lenta e verificaram melhor digestibilidade aparente total de FDN para as dietas com uréia de liberação lenta. Contudo, a porcentagem de volumoso utilizada no presente estudo (25%) justificaria a ausência nestes resultados.

Oliveira Júnior et al. (2004a), constataram maior digestibilidade FDN e FDA em novilhos canulados alimentados com a substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia (uréia de liberação lenta), entretanto, os demais coeficientes de digestibilidade (MS, MO, PB, EE, CNF) foram semelhantes entre os tratamentos. Segundo os autores a menor digestibilidade da FDN e FDA no tratamento com farelo de soja que era deficiente em PDR pode ter ocorrido em virtude da falta de amônia ruminal, prejudicando as bactérias fermentadoras de fibra, que podem ter provocado redução na taxa de passagem e, conseqüentemente, no consumo de MS. Entretanto, neste estudo as dietas não eram deficientes em PDR, o que não prejudicou a digestibilidade da fibra.

Fermentação Ruminal

Não houve efeito das dietas experimentais sobre a maioria das variáveis analisadas (Tabela 12), com exceção do pH ruminal.

Tabela 12. Médias, coeficientes de variação (CV), valores de P e contrastes para pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), proporção molar, porcentagem e total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no líquido ruminal, segundo as dietas experimentais

Variável	Dietas Experimentais ¹				Médias	CV %	Valores de P		
	CTL	U	O	UO			Trat ²	Tempo	Inter ³
pH	6,81	6,64	6,63	6,76	6,72	3,05	0,001	<0,001	0,789
N-NH ₃ (mg/dl) (mM)	26,70	22,03	22,00	24,11	23,71	41,52	0,19	<0,001	0,966
Acético	62,78	61,39	62,97	57,76	61,22	18,00	0,45	0,032	0,683
Propiônico	17,38	16,09	17,32	15,22	16,50	22,73	0,48	0,017	0,991
Butírico (%)	6,47	8,82	9,46	8,75	9,22	27,36	0,26	0,091	0,634
Acético	69,85	71,34	70,32	70,82	70,58	2,28	0,19	0,058	0,735
Propiônico	19,29	18,63	19,16	18,59	18,92	8,62	0,73	0,094	0,300
Butírico	10,85	10,02	10,51	10,57	10,49	12,77	0,61	0,762	0,404
C2/C3 ⁴	3,63	3,84	3,70	3,86	3,76	10,11	0,51	0,032	0,373
AGCC	90,06	86,31	89,76	81,73	86,96	19,23	0,40	0,026	0,820

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; ²Trat: Efeito das dietas experimentais; ³Inter: Efeito da Interação entre Tratamento e Tempo

O pH dos animais alimentados com a dieta CTL foi superior (P=0,017) ao pH dos animais alimentados com as fontes de NNP (P=0,928). Na formulação das dietas com NNP, na substituição de parte do farelo de soja, foi acrescido milho. Essa maior quantidade de milho nestas dietas pode ter influenciado um menor pH ruminal em relação a dieta CTL, devido a maior quantidade de CNF e possivelmente amido, embora não tenha sido observado diferenças nas proporções de ácidos graxos de cadeia curta.

Foi verificado neste estudo um valor médio de pH de 6,72, valor considerado adequado para a ação proteolítica das bactérias. Pois, o valor de pH entre 5,5 a 7,0 é considerado ótimo para ação das enzimas proteolíticas ruminais (Kopečný e Wallace, 1982).

Oliveira Júnior et al. (2004b), constataram pH ruminal semelhante (6,57) ao deste estudo na substituição de farelo de soja por uréia ou amiréia em novilhos.

De acordo com Satter e Slyter (1974), a máxima taxa de crescimento microbiano ocorre com as concentrações de N-NH₃ entre 5 e 8 mg/dl. Entretanto, estudos sugerem valores entre 15 e 20 mg/dl dependendo da dieta (Leng e Nolan, 1984). Estimativas mais altas de concentração de amônia ruminal obtidos *in vivo*, em comparação com os estudos *in vitro* como o exemplo clássico dos autores Satter e Slyter (1974), ocorrem devido a diferenças nas concentrações de nutrientes entre os microambientes como a colonização microbiana na superfície das partículas do alimento e em torno do ambiente (Odle e Schaefer, 1987).

Verificou-se no presente trabalho que o teor de nitrogênio amoniacal ruminal esta acima da faixa considerada pela literatura como mínima para um ótimo crescimento microbiano, apresentando média de 23,71 mg/dl.

Espera-se que a concentração de N-NH₃ ruminal aumente com a inclusão de compostos nitrogenados mais degradáveis, como a uréia (Paixão et al., 2007). O aumento da suplementação com NNP resulta em um acúmulo ruminal de NH₃, indicando, que os requerimentos microbianos de NH₃ foram excedidos, ou que os microrganismos ruminais não foram capazes de utilizar o N seja porque a energia foi limitante ou que o crescimento microbiano foi mais lento do que a solubilização de N (Chizzotti et al., 2008). Contudo, neste estudo as dietas apresentaram semelhantes concentrações de NH₃ ruminal. Já, Chizzotti et al. (2008) e Paixão et al. (2007) verificaram aumento na concentração ruminal de NH₃ com níveis crescentes de uréia e com a substituição de farelo de soja por uréia, respectivamente.

Taylor-Edwards et al. (2008) verificaram menor concentração ruminal de NH₃ para os novilhos suplementados com uréia de liberação lenta em relação aos novilhos com uréia e 85% de silagem de milho. Os autores concluíram a utilização de compostos de uréia de liberação lenta *in vivo*, de fato, têm uma taxa de liberação mais lenta de

amônia que a uréia convencional e pode efetivamente reduzir as concentrações de amônia ruminal quando substituído por uréia.

Entretanto, foi observada neste estudo apenas uma menor concentração numérica de NH₃ do tratamento com uréia de liberação lenta (Figura 4).

Highstreet et al. (2010) estudaram a inclusão de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vacas em lactação e verificaram diferenças na concentração de NH₃ ruminal. Segundo os autores a redução no pico dos níveis de N-NH₃ em vacas alimentadas com dietas com uréia de liberação lenta causa uma mudança nas proporções de espécies microbianas no rúmen, e conseqüentemente uma modificação no perfil de ácidos graxos produzidos. Entretanto, isto não foi verificado neste estudo, uma vez que as fontes de NNP utilizadas nas dietas experimentais não influenciaram as concentrações de N-NH₃ (Figura 6), provavelmente devido ao alto coeficiente de variação observado nesta característica (CV % =41,52). Além disto, Highstreet et al. (2010), trabalharam com dietas de elevado teor protéico (18 e 17,8% para as dietas com uréia e uréia de liberação lenta, respectivamente) características de vacas de leite, diferentemente deste estudo, em que o teor médio de PB foi de 11,3%.

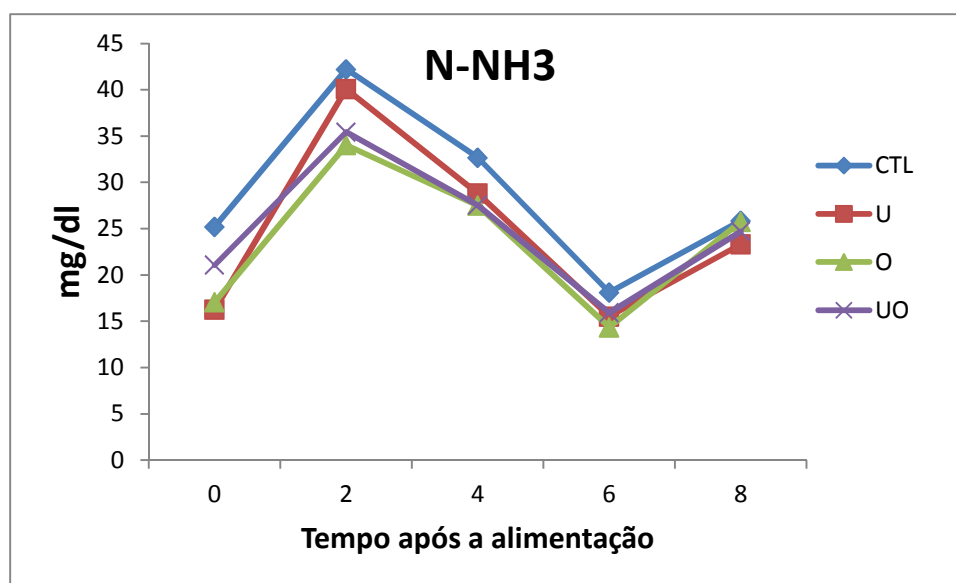


Figura 4. Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, no tempo após a alimentação em função das dietas experimentais

Neste trabalho eram esperados diferentes comportamentos quanto à concentração de nitrogênio amoniacal ruminal frente à substituição parcial do farelo de soja por uréia e uréia de liberação lenta. Entretanto, provavelmente isto não ocorreu devido à ação da reciclagem de N. A reciclagem de N pode mudar o efeito da uréia de liberação lenta no N ruminal (Tedeschi et al., 2002). Além disto, os compostos com uréia de liberação lenta podem ser removidos do rúmen antes da adaptação ruminal (Johnson e Clemens, 1973) devido ao rápido turnover do rúmen.

Esperam-se alterações na concentração molar e proporção de ácidos graxos de cadeia curta, somente se houver deficiência ruminal de N em dietas com níveis de carboidratos semelhantes (como neste estudo) (Nocek e Tamminga, 1991).

Não houve efeito das fontes de NNP das dietas sobre os ácidos graxos de cadeia curta, em porcentagem e proporção molar, quando comparados a dieta CTL. Resultados similares foram obtidos por Carmo (2001) e Oliveira Júnior et al. (2004) avaliando a substituição parcial do farelo de soja por amiréia ou uréia em dieta para vacas e novilhos, respectivamente. Oliveira Júnior et al. (2004b) verificaram que não houve limitação de N ruminal, embora o tratamento com farelo de soja tenha apresentado um balanço ruminal de N negativo. Possivelmente, neste estudo a quantidade de N ruminal não foi limitante na degradação de carboidratos, uma vez que a proporção de ácidos graxos de cadeia curta foi semelhante entre as dietas.

Quantificação de microrganismos ruminais

- Protozoários

A maioria dos gêneros de protozoários aumentou quatro horas após o fornecimento da alimentação, com exceção do gênero *Dasytricha* (Tabela 13).

Tabela 13. Médias e erros-padrões do número dos protozoários ciliados (x10⁴/mL) do conteúdo ruminal de novilhos Nelore em diferentes tempos de alimentação

Potozoários	Tempo ¹		EPM*	P
	0	4		
<i>Entodinium</i>	34,42	35,12	0,2317	0,0437
<i>Diplodinium</i>	2,70	2,88	2,793	0,0002
<i>Epidinium</i>	2,38	2,50	0,0277	< 0.001
<i>Isotricha</i>	2,77	2,94	0,0360	0,0031
<i>Dasytricha</i>	2,59	2,69	0,0515	0,206
<i>Ostracodinium</i>	1,03	1,12	0,0253	0,0159
<i>Eudiplodinium</i>	0,89	1,04	0,0188	0,0004
TOTAL	46,79	48,25	0,227	0,0002

¹Tempo 0= na hora da alimentação e T4= 4 horas apos a alimentação.

*Erro Padrão da Média

Posteriormente a alimentação, os microrganismos ruminais começam a digestão do alimentos liberando substratos. Com o aumento destes substratos e condições adequadas de pH (como foi verificado neste estudo), ocorre aumento de microrganismos ruminais.

Protozoários ciliados no rúmen melhoram consideravelmente a renovação do N ruminal, melhorando significativamente a eficiência de síntese quando em quantidades importantes no rúmen (Ushida et al., 1990). Provavelmente, o aumento observado nos gêneros de protozoários ciliados colaborou para a melhor eficiência de uso do N e produção de proteína microbiana verificada nas fontes de NNP, que será discutido posteriormente.

Na Tabela 14 é apresentado o efeito das dietas experimentais nos gêneros de protozoários avaliados.

Tabela 14. Médias e erros-padrões do número dos protozoários ciliados (x10⁴/mL) do conteúdo ruminal de novilhos Nelore recebendo diferentes fontes de proteína

Potozoários	Dietas Experimentais ¹					Contrastes-Valor de P		
	CTL	O	U	UO	EPM*	CTL vs Fontes NNP	O vs U	UO vs U
<i>Entodinium</i>	28,76	34,81	35,32	40,20	0,327	< 0,001	0,2894	< 0,001
<i>Diplodinium</i>	1,89	2,98	2,90	3,40	0,393	< 0,001	0,1840	< 0,001
<i>Epidinium</i>	1,71	2,63	2,38	3,05	0,046	< 0,001	0,0011	< 0,001
<i>Isotricha</i>	2,11	3,01	2,72	3,59	0,051	< 0,001	0,0006	< 0,001
<i>Dasytricha</i>	1,81	2,75	2,55	3,45	0,073	< 0,001	0,1056	< 0,001
<i>Ostracodinium</i>	0,91	1,01	1,07	1,30	0,036	< 0,001	0,2390	0,002
<i>Eudiplodinium</i>	0,718	0,838	0,9713	1,26	0,027	< 0,001	0,0021	< 0,001
TOTAL	37,90	48,02	47,91	56,25	0,321	< 0,001	0,8108	< 0,001

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja; *Erro Padrão da Média

O gênero majoritário foi *Entodinium*, que alcançou 73.17% da população total.

A utilização de fontes de NNP na alimentação de novilhos Nelore aumentou a quantidade de todos os gêneros de ciliados em relação a dieta controle (P < 0,001). Semelhante aos resultados verificados neste estudo, Dennis et al. (1982) verificaram aumento na população de protozoários no rúmen de vacas alimentadas com uréia em comparação ao farelo de soja.

Abadi et al. (2011) verificaram aumento na população de protozoários com o aumento dos níveis de PDR na dieta através dos tratamentos farelo de soja+uréia (74% PDR), farelo de soja (70,40% PDR), farinha de carne+uréia (68,7% PDR) e farinha de carne (63,70% PDR) em vacas de leite. Apesar dos níveis de PDR deste presente estudo terem sido semelhantes, a presença de NNP provavelmente ocasionou o aumento de protozoários no rúmen.

O número de protozoários ciliados aumenta em relação ao aumento da proporção de uréia na dieta (Nogueira Filho et al., 1989). Além disto, dietas livres de proteína natural acarretam uma grande e complexa fauna de protozoários, os quais presumivelmente usam bactérias como fonte de nitrogênio (Dennis et al., 1982). Apesar das dietas com NNP conter farelo de soja em sua formulação, esse efeito foi encontrado, possivelmente devido a redução de 12 % da dieta CTL para 6 % deste ingrediente nas demais dietas.

Os animais alimentados com ULL (O) apresentaram maiores quantidades dos gêneros *Epidinium* (O= 2,63 e U= 2,38) e *Isotricha* (O= 3,01e U= 2,72) e menores do gênero *Eudiplodinium* (O= 0,838 e U= 0,9713) em comparação aos alimentados com uréia.

Já a dieta com a combinação das fontes de NNP (Uréia e uréia de liberação lenta) aumentou a concentração de todos os gêneros de ciliados quando comparada a dieta apenas com U. Provavelmente, a combinação da rápida liberação de nitrogênio amoniacal da uréia e a mais lenta liberação da uréia de liberação lenta propiciou um adequado aproveitamento de nitrogênio favorecendo a maior população de protozoários.

Os protozoários desenvolvem um papel importante na regulação do turnover de N bacteriano no rúmen, e eles ainda fornecem proteína solúvel para manter o crescimento microbiano (Bach et al., 2005). Devido aos protozoários serem capazes de utilizar N amoniacal (Onodera et al., 1977), uma fração da proteína insolúvel previamente engolfada, retorna ao fluido ruminal na forma de proteína solúvel (Dijkstra, 1994). Apesar de não ter sido observado diferenças na concentração de N amoniacal no rúmen nas dietas com NNP, a maior população de protozoários destas dietas em relação à dieta CTL possivelmente propiciou um melhor desenvolvimento microbiano.

- Bactérias

Segundo Kanra (2005), um ótimo valor de pH para o crescimento das bactérias ruminais seria entre 6,0 e 6,9. Portanto, o valor de pH médio (6,72) observado atendeu estes requerimentos.

As bactérias amilolíticas (*Streptococcus bovis*) e celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus*) não foram influenciadas pelo tempo de colheita ($P= 0,477, 0,161, 0,8747$). Ou seja, a população das bactérias amilolíticas e celulolíticas não foram alteradas antes e oito horas após a alimentação matinal (as 8:00h), permanecendo na mesma quantidade.

As dietas experimentais ($P=0,05$) influenciaram a expressão relativa da bactéria *Streptococcus bovis* (Figura 5).

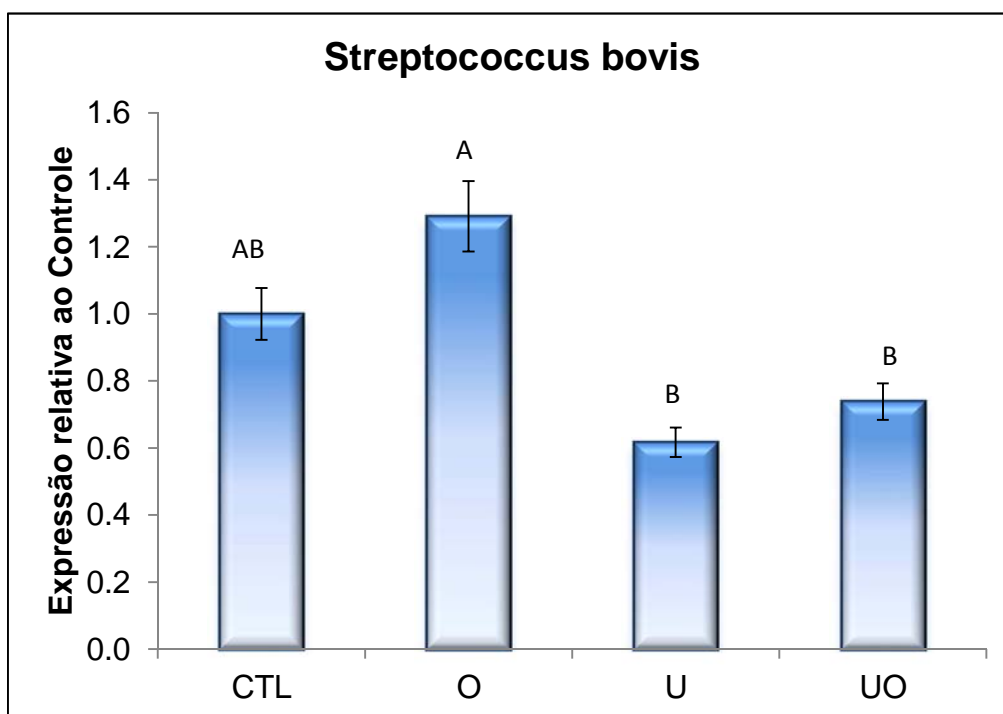


Figura 5. Expressão relativa da bactéria *Streptococcus Bovis* do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais

Foi observada maior população de *Streptococcus bovis* no conteúdo ruminal dos animais alimentados com a dieta Optigen quando comparados a dieta com U (Uréia) e a dieta UO (Uréia e Optigen). Entretanto, a população desta bactéria no

conteúdo ruminal dos animais alimentados com a dieta CTL permaneceu semelhante em relação aos demais tratamentos.

A bactéria *Streptococcus bovis* é considerada a predominante espécie utilizadora de amido, presente no rúmen de animais alimentados com dietas ricas em amido (Mackie et al., 1979), entretanto os estudos com PCR tem mostrado que o número da *Streptococcus bovis* não tem mudado na maioria dos animais em que a dieta foi modificada de alta forragem para alto grão (Klieve et al., 2003). De acordo com Kanra (2005) outras espécies e microrganismos estão envolvidos com a hidrólise de amido e as novas técnicas de biologia molecular permitirão que diferentes grupos de bactérias sejam restabelecidos no cenário microbiológico do rúmen nas próximas décadas. Portanto, não é possível relacionar a maior quantidade observada de *Streptococcus bovis* no tratamento com Optigem com o substrato amido, uma vez que o mesmo também não foi quantificado neste estudo.

As espécies celulolíticas são apresentadas nas Figuras 6 e 7.

A população da bactéria *Fibrobacter succinogenes* foi semelhante entre as dietas experimentais ($P= 0,769$).

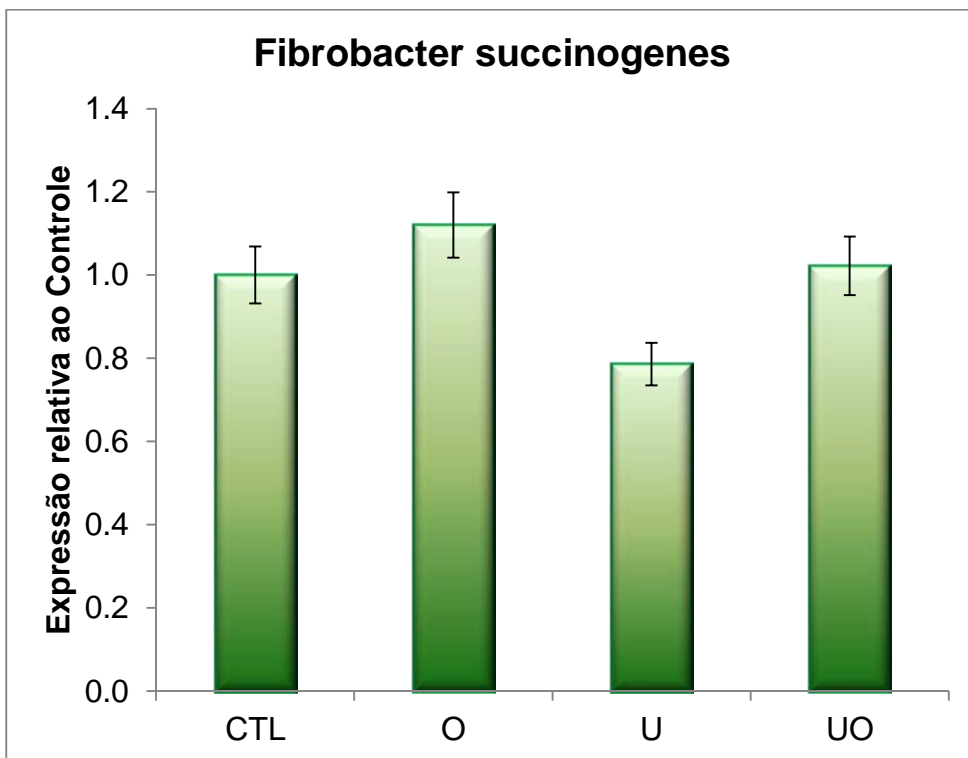


Figura 6. Expressão relativa da bactéria *Fibrobacter succinogenes* do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais

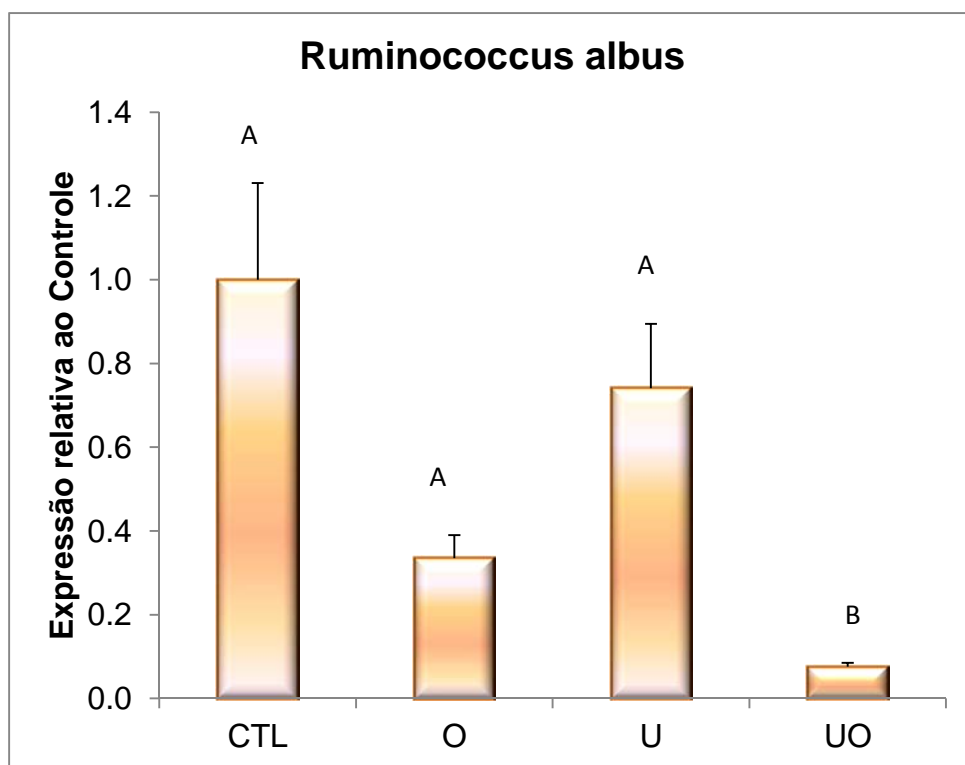


Figura 7. Expressão relativa da bactéria *Ruminococcus albus* do conteúdo ruminal de novilhos Nelore de acordo com as dietas experimentais

Nas espécies celulóticas apenas a população de *Ruminococcus albus* foi influenciada pelas dietas experimentais ($P < 0,001$). Os animais alimentados com a dieta UO (Uréia e Optigen) apresentaram a menor quantidade desta bactéria no conteúdo ruminal quando comparado aos demais. Para as dietas CTL (controle), U (Uréia) e O (Optigen) a população de bactérias foi considerada semelhante estatisticamente.

Redução na população de bactérias celulolíticas é uma consequência do baixo pH que leva a uma redução na degradação da fibra reduzindo o acesso da bactéria proteolítica a proteína, indiretamente diminuindo a degradação protéica (Bach et al., 2005). Todavia, isto não foi verificado neste estudo uma vez que o pH das dietas experimentais foi considerado ótimo para o desenvolvimento das bactérias ruminais (CTL:6,81; U:6,64; O:6,63 e UO:6,76).

Proteína Microbiana

Na Tabela 15 são descritas as médias, coeficientes de variação (CV) e valores de *P* dos contrastes da excreção total de urina (ETU), das concentrações de alantoína (AL), do ácido úrico (AU), da alantoína em % de purinas totais (AL %), das purinas totais (PT), purinasmicrobianas absorvidas (Pabs), do nitrogênio microbiano (Nmic), da proteína bruta microbiana (Pmic) na urina e da uréia (URE) na urina função das dietas experimentais.

Não foi observado efeito das dietas experimentais na excreção total de urina (ETU), nas concentrações de ácido úrico e da alantoína em % de purinas totais.

Tabela 15. Médias, coeficientes de variação (CV) e valores de P dos contrastes da excreção total de urina (ETU), das concentrações de alantoína (AL), do ácido úrico (AU), da alantoína em % de purinas totais (AL %), das purinas totais (PT), purinas microbianas absorvidas (Pabs), do nitrogênio microbiano (Nmic), da proteína bruta microbiana (Pmic) na urina e da uréia (URE) na urina função das dietas experimentais.

Variáveis	Dietas Experimentais ¹				Média	CV %	Contrastes-Valor de P		
	CTL	U	O	U+O			CTL vs Fontes NNP ⁵	O vs U	UO vs U
ETU L/dia	9,39	6,19	5,98	7,42	7,22	35,74	0,130	0,915	0,782
AL mmol/dia	145,21	173,12	193,65	162,63	168,65	14,85	0,074	0,291	0,225
AU mmol/dia	13,47	10,42	14,93	14,10	13,23	27,97	0,886	0,136	0,554
ALAN % PT mol/d	91,33	93,95	92,53	90,70	92,13	2,41	0,438	0,400	0,112
PT mmol/dia	158,68	183,55	208,58	176,73	181,88	14,59	0,090	0,231	0,279
Pabs mmol/dia	162,52	191,65	221,99	183,45	189,90	16,56	0,091	0,221	0,271
Nmic gN/dia	102,29	120,62	139,72	115,46	119,52	16,56	0,091	0,221	0,271
PBmic g/dia	639,28	753,86	873,23	721,64	747,00	16,56	0,091	0,221	0,271
URE mg/dl	120,75	109,00	112,75	108,50	122,38	21,41	0,358	0,764	0,977

¹CTL: controle, U: dieta com Uréia em substituição ao farelo de soja, O: dieta com Optigen em substituição ao farelo de soja, UO: dieta com Uréia e Optigen em substituição ao farelo de soja\

Para ALAN (mmol/dia) e AU foram verificadas médias de 168,65 e 14,01 mmol/dia, superiores às observadas por Rennó (2003) e Magalhães et al. (2005), que avaliaram níveis crescentes de uréia e níveis de uréia e casca de algodão na dieta de novilhos, respectivamente.

Foi observado um efeito com $P \leq 0,09$ para as fontes de NNP nas variáveis, concentração de AL ($P=0,074$), PT ($P=0,090$), Pabs ($P=0,091$), Nmic ($P=0,091$) e PBmic ($P=0,091$) quando comparadas a dieta CTL. As médias observadas para as fontes de NNP foram superiores às verificadas para a dieta CTL, ou seja, a substituição de parte do farelo de soja por NNP proporcionou maior eficiência de utilização de N pelas bactérias ruminais, resultando em maior produção de proteína microbiana.

De acordo com Gleghorn et al. (2004), quando a uréia é utilizada como fonte suplementar de proteína na ração, a síntese de proteína microbiana é maximizada e maior quantidade de aminoácidos e peptídeos estarão presentes no intestino delgado para absorção, quando comparada a proteína verdadeira (rica em proteína não degradável no rúmen).

Quantidades substanciais de aminoácido dietético são desaminados pelas bactérias e convertidos como produto final em N amoniacal e a maioria do N amoniacal que não é incorporado na proteína microbiana no rúmen é finalmente excretado como uréia (Broderick et al., 1991). Possivelmente, isto ocorreu nos animais alimentados com a dieta CTL, uma vez que numericamente foi observada maior quantidade de N amoniacal no rúmen e uréia na urina, com menor produção de proteína microbiana ($P=0,091$).

A principal rota do N em excesso aos requerimentos do animal é via urina (Reynal e Broderick, 2005) e a uréia é principal forma de N na urina (Broderick, 2003). Portanto, pode-se inferir que os animais alimentados com a dieta CTL apresentaram um excesso de N, uma vez que numericamente apresentaram maior quantidade de uréia na urina.

Bach et al. (2005) observaram uma relação negativa entre pH e fluxo de N bacteriano, fato que é uma consequência do aumento de energia das rações altamente fermentescíveis que tem como característica baixo pH. Neste estudo, foi verificado diferentes valores de pH ($P<0,001$) para entre a dieta CTL (6,81) e as demais (U:6,64; O:6,63 e UO:6,76). Portanto, possivelmente o maior pH observado na dieta CTL colaborou para um menor fluxo de N bacteriano e consequentemente uma menor produção de proteína microbiana.

No mesmo sentido deste estudo, Devant et al. (2001) compararam fontes de proteína verdadeira com e sem uréia. Quando foi adicionado uréia, a eficiência (g/kg de matéria original verdadeiramente digerida) e a produção de proteína microbiana aumentaram independente das fontes de proteína verdadeira. Com isso, pode-se

verificar que a utilização de uréia é benéfica, principalmente quando associada a uma fonte de proteína verdadeira, aumentando a eficiência da síntese microbiana em dietas com alto teor de concentrado. Cherdthong et al. (2010), em experimento *in vitro* verificaram aumento na produção de proteína microbiana para o tratamento com uréia de liberação lenta em detrimento a uréia. Por outro lado, Galo et al. (2003) verificaram que a excreção dos derivados de purina foi semelhante entre as dietas com uréia de liberação lenta (16 e 18% de PB com 0,77% de Optigen) e uréia (18%PB) em vacas de leite em produção, semelhantemente ao observado neste estudo entre as dietas com Optigen e Uréia. Galo et al. (2003) atribuíram a produção de proteína microbiana semelhante entre as dietas à uma ruptura parcial do revestimento do polímero da uréia de liberação lenta promovendo uma rápida liberação da uréia, uma vez que os autores testaram a o produto *in vitro*. Todavia, não se pode afirmar o mesmo neste estudo uma vez que o produto utilizado não foi testado.

A síntese de proteína microbiana depende, em grande parte, da disponibilidade de carboidratos e de N no rúmen (Clark et al.,1992; NRC, 2001), de modo que o crescimento microbiano é maximizado pela sincronização entre a disponibilidade da energia fermentável e o N degradável no rúmen (Russell et al., 1992; NRC, 1996), portanto, a partir dos resultados observados, pode-se inferir que esta hipótese foi confirmada com a substituição de parte do farelo de soja por fontes de NNP, ou seja, as fontes de NNP atenderam os requerimentos de N microbiano.

Parâmetros Sanguíneos

As concentrações plasmáticas de glicose (GLI), uréia (URE), nitrogênio uréico no soro (NUS) e aspartato aminotransferase (AST) foram influenciadas ($P < 0,05$) pelas fontes de NNP (Tabela 16).

Tabela 16. Médias, coeficientes de variação (CV) e valores de P dos contrastes das concentrações sanguíneas das proteínas totais (PT), albumina (ALB), glicose (GLI), uréia (URE), nitrogênio uréico no soro (NUS), gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) em função das dietas experimentais.

Variáveis	Dietas Experimentais				Média	CV %	Contrastes (Valores de P)		
	CTL ¹	U ²	O ³	UO ⁴			CTL vs Fontes NNP ⁵	O vs U	UO vs U
PT(g/dl) ⁷	4,60	4,45	4,35	4,25	4,41	7,52	0,240	0,685	0,427
ALB(g/dl) ⁷	2,02	2,01	1,96	2,04	2,01	4,04	0,760	0,487	0,564
GLI(mg/dl) ⁶	77,50	73,50	68,00	67,75	71,69	5,25	0,012	0,127	0,256
URE (mg/dl) ⁶	44,00	37,25	35,25	34,25	17,61	11,74	0,017	0,547	0,375
NUS mg/dl ⁶	20,56	17,41	16,47	16,01	37,69	11,74	0,017	0,546	0,488
GGT (U/L) ⁸	3,48	3,88	4,58	4,28	4,05	21,50	0,178	0,299	0,647
AST (U/L)	45,25	46,25	47,50	57,25	49,06	12,97	0,216	0,791	0,051
FA (U/L) ⁸	90,75	87,50	84,50	89,75	88,13	7,50	0,394	0,545	0,230

¹ CTL: controle, ² U: utilizando uréia na proporção de 1,66% , ³ O: utilizando Optigen na proporção de 1,80%, ⁴ U+O: utilizando uréia e Optigen na proporção de 1,0% e 0,72%, ⁵ NNP: fontes de nitrogênio não-protéico (U, O e UO), ⁶ Miligrama por decilitro; ⁷ Gramas por decilitro; ⁸ Unidades por litro.

O teor de glicose sanguíneo tem poucas variações nos ruminantes em função dos mecanismos homeostáticos bastante eficientes do organismo, exceto em animais com severa desnutrição (González e Scheffer, 2003). Porém, os animais alimentados com a dieta CTL apresentaram maior concentração plasmática de glicose (P=0,012) em relação aos alimentados com as fontes de NNP. Já os animais submetidos à dieta U apresentaram maior concentração plasmática de glicose em relação à dieta O (P=0,084) e UO (P=0,074).

Huntington et al. (2006) conduziram três experimentos (dois com dietas baseadas em forragem e um com uma dieta rica em grãos) para avaliar os efeitos da dieta com ULL (uréia-cálcio) na absorção de N amoniacal no intestino e a produção de N ureico no fígado. Os autores verificaram redução nas concentrações de glicose arterial nos animais alimentados com a dieta com ULL quando comparada a U em dietas com alta forragem. Segundo os autores o aumento das concentrações de glicose

da dieta U foram associadas com a diminuição do uso periférico de glicose, que foi consistente com concentrações mais baixas de insulina verificadas e possivelmente com o aumento da gliconeogênese. Apesar de ter sido observado efeito semelhante para a glicose entre as dietas Optigen e Uréia, contudo, a dieta CTL em relação as fontes de NNP (uréia, uréia de liberação lenta e a combinação destas) apresentou maior concentração plasmática de glicose que possivelmente pode ser associada com o aumento da gliconeogênese.

Os valores de GLI e NUS observados neste estudo, foram maiores e similares respectivamente aos valores obtidos por Oliveira Júnior et al. (2004b) na substituição de farelo de soja (GLI:62,2; NUS:20,9 mg/dL) por uréia (GLI:65,2; NUS:17,8 mg/dL) ou amiréia (GLI:69,8; NUS:18,5 mg/dL) em novilhos.

O teor de NUS tem sido utilizado para obtenção de informações adicionais sobre a nutrição protéica de ruminantes, por meio da resposta metabólica à determinada dieta. Desse modo, é possível evitar perdas econômicas advindas do fornecimento excessivo de proteína dietética e possíveis prejuízos produtivos, reprodutivos e ambientais (Chizzotti et al., 2006).

Foi observado efeito das fontes de NNP nas concentrações de NUS ($P=0,017$) e na concentração plasmática de URE ($P=0,017$). Verificou-se menor concentração de NUS e URE nas dietas com NNP em relação a dieta CTL. Por outro lado, Gleghorn et al. (2004) não verificaram efeito no NUS utilizando uréia ou farelo de algodão como fontes protéicas em dieta de novilhos em terminação. Similarmente, Highstreet et al. (2010) estudaram a inclusão de 5% da PB solúvel de uréia de liberação lenta ou uréia em 2 grupos de vaca em lactação e não verificaram diferenças na concentração de N uréico no sangue.

Segundo Broderick (1995), a concentração elevada de uréia no soro está relacionada à utilização ineficiente da proteína bruta da dieta. Neste sentido, pode-se inferir que os animais alimentados com a dieta CTL foram menos eficientes em relação aos animais alimentados com as demais dietas contendo NNP.

Apesar de não ter sido observado efeito de tratamento nas concentrações de N-NH₃ ruminais devido ao alto coeficiente de variação observado, numericamente os valores de N-NH₃ no rúmen (CTL =28,30, U=24,80, O=23,74 e UO= 24,92 mg/dl) seguiram o mesmo padrão do plasma, com a uréia (CTL =44,00, U=37,25, O=35,25 e UO= 34,25 mg/dl) e no soro com N ureico (CTL =20,56, U=17,41, O=16,47 e UO= 16,01 mg/dl), ou seja, a dieta CTL apresentou maiores concentrações de N tanto no rúmen quanto no sangue. De acordo com Wickersham et al. (2008), em situações de deficiência de N ruminal disponível, a suplementação com PNDR pode prover uma quantidade substancial de N no rúmen em detrimento ao aumento da reciclagem de uréia. Embora não tenha sido fornecidas dietas com deficiência em N, a reciclagem de uréia pode ter influenciado os níveis superiores de N ruminais e sanguíneos observados na dieta CTL. Em adição, Ferrel et al. (2001) constatou que a maior quantidade de proteína fluindo para o intestino grosso poderia resultar em maior proteólise microbiana, liberando mais N amoniacal para os cordeiros alimentados com farelo de soja (11,2%PB) quando comparados a uma dieta controle (6,6% PB).

Os animais alimentados com a dieta CTL apresentaram maiores quantidades de glicose, N ureico no plasma e soro, menor quantidade de Pmic e numericamente maiores quantidades de uréia na urina e N-NH₃ no rúmen em relação a dietas com NNP. Provavelmente, a maior quantidade de PNDR advinda do farelo de soja desta dieta tenha ocasionado esses resultados. A PNDR é transformada em aminoácidos (AA) no intestino, os quais são transportados para o fígado. No fígado os AA podem seguir três vias: 1) entrar no ciclo do ácido cítrico, ser transformado em oxaloacetato e posteriormente em glicose; 2) ser transportado para o tecido muscular; e 3) ser transformado em uréia que pode entrar na reciclagem da uréia via saliva e rúmen ou ser excretado na urina. Na reciclagem, a uréia é transformada em amônia que pode ser utilizada pelas bactérias para a produção de proteína microbiana ou pode ser transportada para o fígado onde é transformada em uréia novamente e é excretada na urina. Possivelmente, sobrou amônia no rúmen, o que ocasionou maior quantidade de N-NH₃ no rúmen, uréia no sangue e na urina. Além disto, a sincronização entre

carboidratos e proteína pode não ter sido adequada para a dieta CTL, uma vez que a produção de proteína microbiana foi menor.

CONCLUSÃO

As fontes de nitrogênio não proteico mostraram-se similares ao farelo de soja quanto a digestibilidade aparente total e fermentação ruminal em bovinos Nelore. Todavia, houve um incremento na produção de proteína microbiana e na população de protozoários ciliados para as dietas com NNP, com conseqüente redução nos teores de uréia no plasma e nitrogênio ureico no soro, resultados estes que indicam melhor eficiência de utilização protéica destas pelos animais.

IMPLICAÇÕES

Este estudo demonstrou que as fontes de NNP (uréia, uréia de liberação lenta ou a combinação destas) podem ser utilizadas em substituição ao farelo de soja, promovendo melhor eficiência de produção de proteína microbiana.

Nos níveis de proteína bruta (CTL:11,68, U:11,22, O:11,17, UO:11,21 %) e proteína degradável no rúmen (CTL:11,27, U:10,97, O:10,69, UO:10,87 %) utilizados neste estudo a uréia de liberação lenta proporcionou resultados semelhantes à uréia nas características avaliadas. Deste modo, a utilização de uréia de liberação lenta em detrimento da uréia pode ser uma alternativa na substituição de fontes de proteína vegetal em dietas para bovinos, sem os riscos potenciais de intoxicação associados a uréia convencional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, E.I.K.et al. Influence of Protein Sources with different degradability on performance, ruminal fermentation, blood metabolites and protozoa population in lactating dairy cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p.43-49, 2011.

AKAY, V., et al. Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. **International Feed Industry Symposium**. Lexington, Alltech, 2004. (CD-ROM)

AMSA. AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. Research guidelines for cookery, sensorial evaluation and tenderness measurements of fresh meat. National Livestock and Meat Board, Chicago, IL, 1995.

ANDRIGHETTO, C., ARAUJO, L.C.A de, CARDASSI, M.R. et al. Características de carcaça de bovinos da raça Nelore suplementados durante o período seco com sal proteinado e concentrado. **VI Encontro de Zootecnia – UNESP Dracena-**, 22 a 24 de setembro de 2009.

ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G de. **Nutrição dos ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p.111-140.

BACH,A.; CALSAMIGLIA,S.;STERN, M.D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, p 9-20, 2005.

BARTLEY, E.E.; DEYOE, C.W. Starea as a protein replacer for ruminants:review of 10 years of research. **Feedstuffs**, Minnetonka, v.47, p.42-44, 1975.

BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. Avaliação de indicadores interno em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.830-833, 2000.

BOLEMAN, S.J.; MILLER, R.K.; BUYCK, M.J. Influence of realimentation of mature cows on maturity, color, collagen solubility, and sensory characteristics. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2187-2194, 1996.

BLAXTER, K.L. The energy metabolism of ruminants. London: Hutchinson, 329p, 1962.

BRODERICK, G.A. Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, Vol 73,p.2760-2773, 1995.

BRODERICK, G.A; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**,v. 75, p. 2618, 1992.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v.80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.

BRODERICK, G.A.; STEVENSON, M.J.; PATTON, R.A. Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2719–2728, 2009.

BRODY, T. Nutritional Biochemistry. San Diego: Academic Press, 1993. 658p.

BUNTING, L. D.; BOLING, J.A.; MACKOWN, C.T. Effect of dietary protein level on nitrogen metabolism in the growing bovine:I. Nitrogen recycling and intestinal protein supply in calves. **Journal of Animal Science**, v.67, p.810, 1989.

BÜRGER, P.J. et al. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.206-214, 2000.

CARMO, C.A. **Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia em dietas para vacas leiteiras**. 2001. 74p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CASALI, A.O. et al. Influência do tempo de incubação e tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimento *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.335-342, 2008.

CHALUPA, W. Problems in feed urea to ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.27, ,p.207-219, 1968.

CHEN, X.B., GOMES, M.J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (Occasional publication). 21p.

CHERDTHONG, A; WANAPAT, M. Development of Urea Products as Rumen Slow-Release Feed for Ruminant Production: A Review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**,V. 4, p. 2232-2241, 2010

CHIKUNYA, S. et al.Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. **Animal Feed Science and Technology**, v.63, p.33-340, 1996.

CHIZZOTTI F.H.M. et al.Effects of dietary nonprotein nitrogen on performance, digestibility, ruminal characteristics, and microbial efficiency in crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1173-1181, 2008.

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

CHEN, X.B., GOMES, M.J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK.(Occasional publication). 21p.

COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes.** Piracicaba: Livrocetes, 1979. 380p.

Cruz Soto, R., S. A. et al. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay on the growth of rumen bacteria *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.49, p.151–161, 1994.

DENNIS, S.M. *et al.* Effect of energy concentrations and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1248-1254, 1982.

DEVANT, M.,et al. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*.**Journal of Animal Science**, v.79, p.1944-1953, 2001.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology.** Thrumpton: Nottingham University Press, 2003. 372p.

DIJKSTRA, J. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. **British Journal Nutrition**, v.72, p.679–699, 1994.

ERWIN, W.S.; MARCO, G.J.; MERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal Dairy Science*, v. 44, p. 1768-1771, 1961.

EUGENE, M.,ARCHIMEDE,H.; SAUVANT, D. Quantitative metaanalysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. **Livestock Production Science**, v. 85, p.81–97, 2004.

EZEQUIEL, J.M.B. et al. Quantificação das bactérias sólido aderidas, bactérias e protozoários líquido associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.707-715, 2002.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

FERNANDES, J.J.R. et al. Farelo de soja em substituição à ureia em dietas para bovinos de corte em crescimento. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10,n. 2, p. 373-378. 2009.

FERRELL,C.L.,et al.The effect of dietary nitrogen and protein on feed intake, nutrient digestibility, and nitrogen flux across the portal-drained viscera and liver of sheep

consuming high-concentrate diets ad libitum. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1322-1328, 2001.

FIRKINS, J.L. et al. Effects of feed intake and dietary urea concentration on ruminal dilution rate and efficiency of bacterial growth in steers. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.2312-2321, 1987.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. Ph.D. thesis, East Lansing - Michigan State University, 1977.

FUJIHARA, T., et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agriculture Science**, v.109, p.7-12,1987.

GALINA, M.A., et al. Effect of slow release urea supplementation on fattening of steers fed sugar cane tops (*Saccharum officinarum*) and maize (*Zea mays*): ruminal fermentation, feed intake and digestibility. **Livestock Production Science**, v. 83, p.1–11, 2003.

GALO, E., S., et al. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2154–2162, 2003.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).

GOLOMBESKI, G.L. et al. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4395–4403, 2006.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F.H.D.; Campos, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade do Rio Grande do Sul. p.73-94, 2003.

GONZALEZ-RONQUILLO, M. et al. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1282-1291, 2003

GLEGHORN, J.F., et al. Effects of crude protein concentration and degradability on performance, carcass characteristics, and serum urea nitrogen concentrations in finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2705-2717, 2004.

HADLICH J. C.; LONGHINI, L. G. R.; MASÓN, M. C. A influência do colágeno na textura da carne. *Pubvet*, vol. 2, no 32, 2008.

HAMMOND, A. C. Update on BUN and MUN as guides for protein supplementation in cattle. In Proc. 8th Annu. Florida **Ruminant Nutrition Symposium**. p. 45. Univ. of Florida, Gainesville, 1997.

HEDRICK, H.B. Methods of estimating live animal and carcass composition. **Journal of Animal Science**, v74, n.5, p.1316-1326,1983.

HELMER, L.G.; BARTLEY, E.E. Progress in the utilization of urea as a protein replace for ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.54, p.25-51, 1971.

HIGHSTREET, A., et al. Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. **Livestock Production Science**, v.129,p. 179–185, 2010.

HUBER, J.T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. **Livestock Production Science**, v. 39, p. 141-155, 1994.

HUNTINGTON, G. B. Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 69, p. 215-223, 1989.

HUNTINGTON, G.B., ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**. 1999.

HUNTINGTON, G.B., et al. Effects of a slowrelease urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v.130, p225-241, 2006.

HYDEN, S.A. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *Kungl Lantbruks-Högskolans Annales*, v.22, p.139-145, 1956.

INOSTROZA, J.F., et al. Effect of diets containing a controlledrelease urea product on milk yield, milk composition, and milk component yields in commercial Wisconsin dairy herds and economic implications. **Professional Animal Scientist**, v.26, p.175-180, 2010.

JARVIS, G. N. et al. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. **Current Microbiology**, v.40, p.327–332, 2000.

JOHNSON, R. R.; CLEMENS, E. T. Adaptation of rumen microorganisms to biuret as an NPN supplement to low quality roughage rations for cattle and sheep. **Journal of Nutrition**, v.103, p.494–502, 1973.

JUDGE, M. et al. 1989. Principles of Meat Science. Kendall/Hunt Publishing Co.,2nd ed.,
Dubuque, Iowa.

KAMRA, D.N.Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, p.124–135, 2005.

KOPECNY, J.; WALLACE, R.J. Cellular location and some properties of proteolytic
enzymes of rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p.1026–1033,
1982.

KOOHMARAIE, M. Understanding and managing variation in meat tenderness. In:
Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v.40, 2003, Santa Maria :
Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003, CD ROM.

KOPECNY, J.; R. J. WALLACE. Cellular location and some properties of proteolytic
enzymes of rumen bacteria. **Applied. Enviromental Microbiology**, v.43, p.1026–1033,
1982.

KRAUSE, D.O.et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen:
microbiology,ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Revision**, v. 27, p.663–693,
2003.

KULASEK, G. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v.15, n.4,p.801-810, 1972.

LAWRIE R.A. Meat science. 4.ed. New York: Pergamon Press, 1985. 451p.

LEME, P.R.; SILVA, S.L.; PEREIRA, A.S.C. et al. Desempenho e características de carcaça de animais Nelore, $\frac{1}{2}$ Caracu x $\frac{1}{2}$ Nelore e $\frac{3}{4}$ Caracu x $\frac{1}{4}$ Nelore confinados com dietas de alto concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gnosis, [2002] (CD-ROM).

LENG, R.A.;NOLAN, J.V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 67: p.1072-1089, 1984.

LING, J. R. e ARMSTEAD, LP. The in vitro uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p.116-124, 1995.

LOXTON, I.D. The influence of animal nutrition on the quality of meat from *Bos indicus* cross-bred steers in Northern Australia. In: THE AUSTRALIAN MEAT INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, Australia, 1993. Proceedings... Australia:CSIRO, 1993. p.1-1

LUCCI, C.S. 1997. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Ed. Manole Ltda. 169p.

MACKIE, R. I.; GILCHRIST, F. M. C. Changes in lactate producing and lactate utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high concentrate diet. **Applied Environmental Microbiology**, v. **38**, p.422–430, 1979.

MILLEN, D.D. et al. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. *Animal Frontiers*, v.1, p.46-52, 2011.

MEAT EVALUATION HANDBOOK. National Live Stock and Meat Board. Chicago, Illinois 60603 p.70 1973.

MENEZES, L.F.G., RESTLE, J., VAZ, F.N. et al. Composição física da carcaça e qualidade da carne de novilhos de gerações avançadas do cruzamento alternado entre as raças Charolês e Nelore, terminados em confinamento¹ **Revista Brasileira de Zootecnia** v.34 n.3 2005.

MENEZES, L.F.D., KOZLOSKI, G.V., RESTLE, J. et al. Perfil de ácidos graxos de cadeia longa e qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento com diferentes níveis de monensina sódica na dieta *Ciência Rural*, v.36, n.1, 2006.

MEHRES, A.Z.; ØRSKOV, E.R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.88, p.645-650, 1977.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**,v.85, p.1217-1240, 2002.

MILTON, C. T.; BRANDT JR., R.T.;TITGEMEYER, E.C. Urea in dry-rolled corn diets: Finishing steer performance, nutrient digestion, and microbial protein production. **Journal of Animal Science**,v.75, p.1415–1424, 1997

NETO, P.N, JORGE, A.M., MOREIRA, P.S.A. et al., Desempenho e qualidade da carne de bovinos Nelore e F1 Brangus × Nelore recebendo suplemento com cromo complexado à molécula orgânica na terminação a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.4, p.737-745, 2009.

NEWBOLD, J. R.; RUST, S.R. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. **Journal of Animal Science**, v.70, p.538.

NGUYEN, V.T. et al. Nutrient digestibility and ruminal fermentation characteristic in swamp buffaloes fed on chemically treated rice straw and urea. **Tropical Animal Health Production**, v.11, p.1-8, 2011.

NOCEK, J. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71,p.2051-2069, 1988.

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 of Dairy Science**, v.71, p.2070–2107, 1988.

NOCEK, J.E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3598-3629, 1991.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M. *et al.* Efeitos da administração de uréia protegida sobre a população de protozoários ciliados em rúmen de ovinos (*Ovis aries*) da raça Hampshire Down. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 26,1989, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SBZ, 1989,p.182.

NRC. National Research Council. **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC. 1985, 138p.

NRC. 1996. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7th ed. National Academy Press, Washington,DC.

NRC. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.

ODLE, J. e SCAEFER, D.M. Influence of ureen ammonia concentration on the rumen degradation rates of barley and maize. *British Journal Nutrition*, v.57, p. 127, 1987.

OLIVEIRA, A.S., et al. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite em vacas alimentadas com quatro níveis de compostos nitrogenados não protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30(4), p.1358-1366, 2001.

OLIVEIRA JUNIOR, R.C. **Substituição do farelo de soja por uréia e amiréia em dietas de bovinos de corte. I. digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminais e sanguíneos; II. desempenho e III. Avaliação de indicadores de digestibilidade**. 200. 196 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura: “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

OLIVEIRA JUNIOR, R.C., et al. Digestibilidade de nutrientes em dietas de bovinos contendo uréia ou amiréia em substituição ao farelo de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.39, p.2-8, 2004a.

OLIVEIRA JUNIOR, R.C. et al. 2004. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os

parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.738-748, 2004b.

ORELLANA BOERO, P. et al. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v.68, p.243-250, 2001.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science.*, v.92, n.1, p.499-503, 1979.

ONODERA, R.; NAKAGAWA, Y.; KANDATSU, M. Ureolytic activity of the washed suspension of rumen ciliated protozoa. **Agriculture Biology Chemistry**, v.41, p.2177–2182, 1977.

OWENS, F.N. et al. Slow ammonia release from urea: Rumen and metabolism studies. **Journal of Animal Science**, v.50, p.527-531, 1980.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A.L . Fermentación ruminal. El Rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición. D. C. Church, ed. Acribia. Zaragoza, Espana, p.159-189, 1988.

OWENS, F.N., ZINN, R. 1988. **Metabolismo de la proteína en los ruminants**. CHURCH, C.D. El ruminante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Acribia, 641p.

PLATER, W.J. et al. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef striploin steaks. **Journal of Animal Science**, p 41-541, 2003.

PAIXÃO, M.P., et al. Uréia em dietas para bovinos: consumo, digestibilidade aparente, ganho de peso, característica da carcaça e produção microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2451-2460, 2006.

PEREIRA, A. Características da Carcaça e da Carne das Progênes de Touros Representativos da Raça Nelore (Bos Indicus) e de Diferentes Grupos Genéticos. Pirassununga, 2006. 20p Dissertação –(doutorado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

PETROBRAS/EMBRAPA – **Gado de Leite. Uréia pecuária.** Informações técnicas. Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite – Juiz de Fora, MG. 1997, 15p.

PINTO, L.F.B., FERRAZ, J.B.S., CARVALHO, J.C. de. et al., Qualidade de carne e decarcação em bovinos da raça Nelore¹ Anais... VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. São Carlos, SP, 10 e 11 de julho de 2008.

PINOS-RODRÍGUEZ, J.M., et al. Effects of a slow-release coated urea product on growth performance and ruminal fermentation in beef steers. **Italian Journal of Animal Science**, v.4, p.255-268, 2010.

PFANDER, W. H. et al. Use of plasma urea-nitrogen to vary protein allowances of lambs. **Journal of Animal Science**, v.41, p.647, 1975

PINA, D.S.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes, produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1543-1551, 2006.

PIRES, A.V.; OLIVEIRA JUNIOR, R.C.; SUSIN, I. et al. Fontes nitrogenadas em rações contendo bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado no desempenho de bovinos confinados em terminação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.163-168, 2008.

PLATER, W.J. et al. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef striploin steaks. **Journal of Animal Science**, p 41-541, 2003.

RENNO, L.N., et al. Níveis de ureia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: consumo e digestibilidades totais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.24, p.363–370.

RIBEIRO, F.G., LEME, P.R., BULLE, M.L.M. et al. Características e qualidade da carne de tourinhos alimentados com dietas de alta energia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.749-756, 2002.

RIBEIRO, E.L.A, HERNANDEZ, J.A., ZANELLA, E.L. et al. Desempenho e características de carcaça de bovinos de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.9, p.1669-1673, 2008.

ROÇA, R.O. Tecnologia da carne e produtos derivados. 2.ed. Botucatu: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial/FCA/UNESP, 2001. p. 201.

RÜBENSAM, J. M., FELÍCIO, P. E., TERMIGNONI, C. Influência do genótipo Bos indicus na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no Sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.405-409, 1998.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70:3551–3561, 1992.

SANTOS, F.A.P. Metabolismo das proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G de. **Nutrição dos ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p.255-284.

SANTOS, G.T.; Cavalieri, F.L.B.; Modesto, E.C. **Recentes Avanços em Nitrogênio não Protéico na Nutrição de Vacas Leiteiras**. Disponível em:<<http://www.nupel.uem.br/recentes.pdf>>Acesso em 15 novembro 2011.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Características da carne bovina. **Boletim Técnico**. PIE-UFES, 2007.

SATTER, L.D. e ROFFLER, R.E. Nitrogen Requirement and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 58, p. 1219, 1975

SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal Nutrition**, v.32, p.199-208, 1974.

SEIXAS, J. R. C. et al. Desempenho de bovinos confinados alimentados com dietas à base de farelo de algodão, uréia ou amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 432-438, fev. 1999.

SHAIN, D. H. et al. Effect of degradable intake protein level on finishing cattle performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, v.76 p.242-249, 1998.

SILVEIRA, H.C. O boi não tem culpa do aquecimento global. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/...boi/o-boi-nao-tem-culpa-do-aquecimento-global>> Acesso em : 9 novembro 2011.

SMITH, R. H.; SALTER, D. N.; SUTTON, J. D.; MCALLAN, A. B. Synthesis and digestion of microbial nitrogen compounds and VFA production by the bovine. Tracer studies on

non-protein nitrogen for ruminants. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. Vol. 2, p. 81–93, 1975.

SNIFFEN, C. J.;ROBINSON, P.H. Microbial growth and flowsas influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.425–441, 1987.

SOUZA, V.L. et al. Substituição parcial de farelo de soja por ureia protegida na produção e composição do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.62, p.1415-1422, 2010.

SORIA, L. A.; Corva P.M. Factores genéticos y ambientales que determinan la terneza de la carne bovina. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.12, n.2, p. 73-88, 2004.

STORM, E.; ØRSKOV, E.R..The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. **British Journal Nutrition**, v.50, p.463-470, 1983.

TAMMINGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 49, p.1615–1630, 1979.

STRONG, J. Differences in carcass grading schemes used in the used in the USA, Japan and Austrália. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.675-680,

2004.

TAMMINGA, S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74 p.3112, 1996.

TAYLOR-EDWARDS, C.C., et al., Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth and performance in beef steers. **Journal of Animal Science**, p. 1-26, 2008.

TAYLOR-EDWARDS, C.C., et al., Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 209-221, 2009.

TEDESCHI, L. O., M. J. BAKER, D. J. KETCHEN, D. G. FOX. Performance of growing and finishing cattle supplemented with a slow-release urea product and urea. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 82, p. 567–573, 2002.

THOMPSON, J. M. The effects of marbling on flavor and juiciness scores of cooked beef, after adjusting to a constant tenderness. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.645-652, 2004.

TORRES, L. B., FERREIRA, M. A., VÉRAS A. S. C., et al. Níveis de bagaço de cana e uréia como substituto ao farelo de soja em dietas para bovinos leiteiros em crescimento.

Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.3, p.760-767, 2003.

USDA. Official United States standards for grades of carcass beef. Agric. Marketing Serv., USDA, Washington, D.C., 1999.

USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture Disponível em:<http://www.fas.usda.gov/dlp>. Acesso em : 15 novembro 2011.

VAGNONI, D.B.et al. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. **Journal of Dairy Science**,v. 80, p.1695-1702, 1997.

VALADARES FILHO, S.C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES, 1995, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV/DZO, p.355-388, 1995.

VALADARES, R.F.D., BRODERICK, G.A., VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfafa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.2686-2696, 1999.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed., Cornell University, Ithaca. 476p, 1994.

VASCONSELOS et al. REVIEW: Feeding Nitrogen and Phosphorus in Beef Cattle Feedlot Production to Mitigate Environmental Impacts. **The Professional Animal Scientist**, v.23 p. 8–17, 2007.

WEATHERBURN, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, v.39, p.971-974, 1967.

XIN, H.S., et al. Effects of polyurethane coated urea supplement on *in vitro* ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 23, p. 491-500, 2010.