

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

METABOLISMO DE NITROGÊNIO, PARÂMETROS  
DIGESTIVOS E EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA PARA  
MANTENÇA DE BÚFALAS EM CRESCIMENTO

Autora: Erica Machado  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março-2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

METABOLISMO DE NITROGÊNIO, PARÂMETROS  
DIGESTIVOS E EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA PARA  
MANTENÇA DE BÚFALAS EM CRESCIMENTO

Autora: Erica Machado

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março-2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M149m Machado, Erica  
Metabolismo de nitrogênio, parâmetros digestivos e exigência de proteína para manutenção de búfalas em crescimento / Erica Machado. -- Maringá, 2014.  
48 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2014.

1. Balanço de nitrogênio. 2. Bubalinocultura. 3. Búfalos - Exigência proteica. 4. Búfalos - Nutrição - Digestibilidade. 5. Búfalos - Nutrição - Fluxo de nutrientes. I. Zeoula, Lúcia Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22.ed. 636.293

SOI-002045



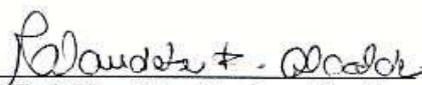
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**METABOLISMO DE NITROGÊNIO, PARÂMETROS  
DIGESTIVOS E EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA PARA  
MANTENÇA DE BÚFALAS EM CRESCIMENTO**

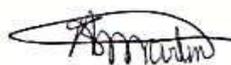
Autora: Erica Machado  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 27 de março de 2014.

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Claudete Regina Alcalde

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paula Adriana Grande



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Adriana de Souza  
Martins

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

À

Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me fortalecendo e me guiando em todos os caminhos percorridos.

Aos

Meus pais, José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado, que foram a base de tudo para mim, apoiando-me nos momentos difíceis, com força, confiança, amor, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando-me a alcançá-los.

Às

Minhas irmãs Flávia Machado e Izabela Machado que são minha fortaleza.

Aos

Meus sobrinhos, Beatriz e Arthur por encherem nossas vidas de alegria.

Aos

Amigos e familiares pelas orações e apoio.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação, por viabilizar a realização deste projeto;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos;

À profa e orientadora Dra. Lúcia Maria Zeoula, pelo carinho, respeito, oportunidades, conselhos e ensinamentos ao longo desses anos e, sobretudo, pela confiança em mim depositada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelos conhecimentos repassados e pela dedicação;

Aos meus pais, José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado pelo apoio, incentivo, paciência, amor imenso, carinho constante, confortável força, orações e esforços financeiros;

Às minhas irmãs, Flávia Machado e Izabela Machado pelo companheirismo, amizade e confiança.

Aos meus sobrinhos, Beatriz Nasorri e Arthur Nasorri pelos momentos de alegria, descontração e por renovarem minhas energias, sempre que necessário, durante a realização deste trabalho.

À minha grande amiga, Lívia Domeneghetti, que sempre me apoiou, me ajudou e foi minha família durante esses anos.

Ao Lucas Vieira, por todo amor, carinho, compreensão, amizade, apoio e paciência durante esses anos.

Aos amigos e companheiros de pesquisa, Emerson Henri Yoshimura, Rafael Barreiros Samensari, Nadine Woruby Santos, Bruna Calvo Agustinho, Lucelia de Moura Pereira, Sílvia Cristina de Aguiar, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por toda a ajuda, todas as risadas, todos os conselhos e ensinamentos, enfim, por tudo, sem vocês nada disso seria possível.

Aos colegas de grupo de trabalho, Eduardo Marostegan de Paula, Fábio Maia, Cecília Spada, Hugo Monteiro, pela agradável convivência, pelos ensinamentos, conselhos e sugestões.

Ao Ezupério Salim, funcionário da Fazenda Experimental de Iguatemi, pela amizade e por toda ajuda e dedicação durante a condução do experimento à campo.

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá Cleuza Volpato, Creuza Azevedo e Hermógenes Augusto de C. Neto;

Ao funcionário da secretaria da Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Denílson Vicentin, pelos serviços prestados;

E aos que não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão de mais essa etapa e estão no meu coração.

Meus sinceros agradecimentos!

## BIOGRAFIA

ERICA MACHADO, filha de José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado, nasceu em Catanduva, São Paulo, no dia 27 de janeiro de 1987.

No ano de 2007, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2011, cumpriu as exigências para obtenção do título de “zootecnista” pela mesma instituição.

Em 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na sub-área de Nutrição de ruminantes.

Em março de 2014, submeteu-se à banca examinadora para a defesa da presente dissertação

## ÍNDICE

## Pagina

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix

## CAPITULO I

INTRODUÇÃO.....	10
REFERÊNCIAS.....	19

CAPITULO II - Níveis de Proteína Para Búfalas Mestiças em Crescimento:  
Metabolismo de Nitrogênio, Parâmetros Digestivos e exigência de proteína  
para manutenção

RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAIS E METODOS.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

## LISTA DE TABELAS

## Página

Tabela 1. Composição química dos ingredientes das dietas.....	28
Tabela 2. Proporção dos ingredientes e teores médios dos nutrientes das dietas.....	29
Tabela 3. Ingestão e digestibilidade da MS, MO, PB, EE e NDT e fluxos fecal e omasal.....	33
Tabela 4. Ingestão e digestibilidade dos carboidratos e fluxos fecal e omasal.....	34
Tabela 5. Digestibilidade total da MS e dos demais nutrientes.....	35
Tabela 6. Dinâmica da fase líquida.....	36
Tabela 7. Eficiência de síntese de proteína microbiana.....	37
Tabela 8. pH ruminal, concentração de amônia (N-NH <sub>3</sub> ) no líquido ruminal e parâmetros sanguíneos.....	39
Tabela 9. Balanço de nitrogênio em búfalas mestiças recebendo dietas contendo níveis crescentes de PB.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Página	
Figura 1.	pH do líquido ruminal em função de horas após a alimentação.....40
Figura 2.	Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) no líquido ruminal em relação ao tempo após a alimentação em função dos tratamentos.....41
Figura 3.	Relação entre balanço de N e Ingestão de N.....43
Figura 4.	Relação entre balanço de N e N absorvido.....43

## I – INTRODUÇÃO

### **Proteína para ruminantes**

A proteína desperta grande interesse dos pesquisadores em nutrição animal por que, depois da energia, é o nutriente mais limitante na dieta de ruminantes e em virtude de os alimentos proteicos compreenderem a parte mais dispendiosa dos custos de produção (Valadares Filho et al., 2006). Sua deficiência na dieta limita o crescimento microbiano, reduzindo a digestibilidade da parede celular, a ingestão e, conseqüentemente, o desempenho animal (Van Soest, 1994).

A degradação da proteína (PB) no rúmen ocorre pela ação das enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais que degradam a fração solúvel da proteína e utilizam os peptídeos, aminoácidos e amônia para a síntese de proteína microbiana e multiplicação celular. O nível de síntese de proteína microbiana é dependente da disponibilidade de energia no ambiente ruminal, que é gerada através da fermentação dos carboidratos (Broderick et al., 2009).

Diversos fatores afetam a degradação da PB no rúmen, tais como a composição química e física da PB, a atividade proteolítica microbiana, o acesso microbiano à proteína, o tempo de retenção do alimento no rúmen, o pH ruminal, o processamento do alimento e a temperatura ambiente (Santos & Mendonça, 2011).

A quantidade total de proteína microbiana que chega ao intestino delgado depende da disponibilidade de nutrientes e da eficiência de utilização desses nutrientes pelos microrganismos ruminais. Assim, o metabolismo de nitrogênio (N) no rúmen está em função da proteína degradável no rúmen (PDR) que proporciona fontes de N para as bactérias para que haja síntese de proteína microbiana (Bach, 2005). Desta forma, a proteína que chega ao intestino dos ruminantes é proveniente da proteína dietética não degradada, proteína microbiana e proteína endógena; O aporte de aminoácidos absorvidos provenientes da digestão dessas fontes é denominado proteína metabolizável (Santos & Mendonça, 2011).

A proteína dietética promove ganhos diferenciados no desempenho animal, e também melhora as condições ruminais para o desenvolvimento dos microrganismos, que, conseqüentemente, proporciona uma melhor extração de energia das porções fibrosas dos alimentos volumosos, permitindo maior economia nos sistemas de produção, além de reduzir a contaminação ambiental devido à menor excreção desse elemento (Salvador et al., 2008).

### **Metabolismo da proteína em ruminantes**

Normalmente, a maior parte do N consumido pelos animais é convertida em amônia pelas bactérias ruminais e cerca de 40 a 100% do N microbiano é oriundo da amônia (Kozloski, 2011). Além disso, a amônia é essencial para o crescimento de algumas bactérias.

A amônia que entra na célula bacteriana pode ser captada em reações catalisadas por várias enzimas diferentes, de acordo com sua concentração na célula, sendo o sistema glutamina sintetase o de maior afinidade, especialmente quando as concentrações de amônia no fluido ruminal encontram-se baixas. Nesse sistema há gasto de 1 mol de ATP para a fixação de 1 mol de amônia. No entanto, na maior parte das situações dietéticas, predomina a atividade de sistemas de captação de amônia de menor afinidade, destacando-se o sistema glutamato desidrogenase dependente de NADH ou NADPH. Nessa reação, a amônia é captada através da síntese de glutamato a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato; esse sistema é predominante em situações com altas concentrações de amônia no fluido ruminal e não requer ATP para a fixação da amônia na célula microbiana (Kozloski, 2011). Entretanto, quando a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados para a síntese microbiana, o excesso de amônia produzida no rúmen é absorvido através do epitélio ruminal, transportada para o fígado, onde é transformada em ureia, no ciclo da ureia, e direcionada para a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, a ureia pode retornar ao rúmen via saliva ou pelo próprio epitélio ruminal ou ser excretada via urina (Santos & Mendonça, 2011).

A maior parte da proteína que chega ao abomaso e, conseqüentemente, ao intestino é proveniente da fermentação ruminal, daí a importância da maximização, em qualidade e quantidade, dessa fermentação (Cavalcante et al., 2006). Além disso, cerca

de 80% da proteína bruta microbiana que chega ao duodeno é proteína verdadeira e os outros 20% são ácidos nucleicos (Santos & Mendonça 2011). As bactérias representam cerca de 90% da proteína microbiana verdadeira e é a maior fonte de proteína para o ruminante (Calsamiglia et al. 1995). Assim sendo, no que tange à nutrição proteica, o conhecimento da síntese de proteína microbiana e da digestibilidade da proteína no intestino é de fundamental importância para o sucesso dos programas nutricionais.

A síntese de proteína microbiana se dá em virtude de dois fatores principais: a taxa de fermentação, como supracitado, a qual estabelece a quantidade de alimento digerido por unidade de tempo, e a taxa de passagem, que favorece a saída ruminal do substrato lentamente fermentado e remove os microrganismos. A produção microbiana é vinculada às complexas inter-relações que ocorrem no rúmen envolvendo as diversas espécies microbianas, disponibilidade de carboidratos, nitrogênio e seu metabolismo (Salazar et al, 2008).

Os substratos limitantes para a síntese de proteína microbiana no rúmen são os carboidratos e a proteína. A proteína está relacionada à velocidade e intensidade de degradação ruminal da proteína dietética, e os carboidratos estão relacionados à eficiência de utilização dos compostos nitrogenados, uma vez que são os responsáveis pelo aporte de energia para os microrganismos (Cavalcante et al., 2005).

Uma pequena parte da proteína microbiana é utilizada no próprio rúmen, mas a maior parte chega ao abomaso aderida às partículas dos alimentos; Os ácidos secretados no abomaso interrompem toda a atividade microbiana e as enzimas digestivas iniciam o processo de hidrólise da proteína, originando peptídeos que seguem para o intestino (Alderman, 1995).

No intestino delgado as enzimas digestivas pepsina (abomaso) e tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases hidrolisam as proteínas e peptídeos nos seus aminoácidos constitutivos, que são, logo a seguir, absorvidos pela mucosa intestinal e transportados para a circulação sanguínea.

Após a absorção, os aminoácidos são utilizados pelo tecido animal principalmente para síntese de proteínas e podem também ser convertidos em glicose, lipídios e outros compostos de grande importância. Os aminoácidos não utilizados neste processo são deaminados, originando a amônia e esqueletos de carbono. Os esqueletos de carbono podem ser oxidados a CO<sub>2</sub> e água, com geração de energia. De modo geral, o catabolismo de aminoácidos, seja para síntese de glicose (gliconeogênese) no fígado,

ou oxidação a CO<sub>2</sub> e água, tem como via comum o ciclo de Krebs (Santos & Mendonça, 2011).

Além disso, os ruminantes dispõem da reciclagem de nitrogênio para manterem maior quantidade de nitrogênio circulante em seu organismo em situações de baixa ingestão de compostos nitrogenados. A reciclagem de nitrogênio ocorre sob a forma de ureia, que está presente na corrente sanguínea e também na saliva e pode difundir-se através do epitélio ruminal (Van Soest, 1994).

Os níveis de amônia no sangue, normalmente, permanecem baixos, isso se dá em virtude da capacidade do fígado em converter, rapidamente, amônia em ureia. Porém, quando as concentrações sanguíneas de amônia se elevam, devido à alta ingestão de compostos nitrogenados com alta proteína degradável no rúmen (PDR), o fígado excede sua capacidade de conversão e pode elevar a concentração de amônia na corrente sanguínea, isso faz com que ocorra elevação do pH sanguíneo, que dificulta as trocas gasosas entre o sangue e os tecidos.

A bioquímica das proteínas séricas também é de crucial importância na avaliação do estado nutricional dos animais. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, de modo que sua taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal, especialmente com relação aos níveis de proteína e de vitamina A e com a funcionalidade hepática (Bezerra et al., 2009). Os metabólitos sanguíneos que melhor representam o metabolismo proteico são as proteínas totais, a ureia e albumina. Os valores das proteínas totais abaixo do normal no plasma estão relacionados com deficiência de proteína na dieta, quando excluídas causas patológicas (Gonzalez et al., 2000).

A concentração de ureia no sangue é positivamente relacionada com a ingestão de nitrogênio e a relação proteína: energia da dieta. Por isso, os valores de concentração sanguínea de ureia são determinados pela velocidade de desintoxicação da amônia e pela quantidade e velocidade de sua síntese hepática. A quantidade de ureia excretada pelos rins depende de fatores como: concentração plasmática de ureia, taxa de filtração glomerular, e reabsorção tubular de ureia, sendo a concentração de ureia no sangue, o principal regulador da excreção pela urina (Pereira et al, 2007).

### **Balço de compostos nitrogenados**

Segundo Mendes et al. (2007), o balanço de compostos nitrogenados, que se refere ao nitrogênio retido no organismo animal, é uma importante ferramenta para determinar a eficiência de utilização de nitrogênio pelos ruminantes e suas perdas. Nesse sentido, o balanço dos compostos nitrogenados é um bom indicativo acerca do metabolismo proteico e constitui um importante parâmetro na avaliação de alimentos, de modo que permite a avaliação sobre o equilíbrio dos compostos nitrogenados no organismo animal e seu estado nutricional (Guimarães Jr. et al., 2007). Além disso, sua determinação é importante para evitar prejuízos produtivos, reprodutivos e ambientais que podem ser causados pelo fornecimento de quantidades excessivas de proteína e/ou da falta de sincronismo na degradação de energia e proteína no rúmen.

Segundo Cavalcante et al. (2006), ocorre maior aproveitamento dos compostos nitrogenados quando se utilizam dietas com menores teores proteicos, pois o aumento excessivo da PB da dieta pode ocasionar excreção excessiva de ureia, via urina, constituindo desperdício de proteína.

Pereira et al. (2007), avaliaram o balanço de nitrogênio (BN) em bovinos e bubalinos recebendo níveis crescentes de concentrado, as dietas continham 80, 110, 140 e 160 g.kg<sup>-1</sup> de PB na MS e o BN variou de 250 a 460 g.kg<sup>-1</sup> para bovinos e de 320 a 510 g.kg<sup>-1</sup> para bubalinos, em relação à quantidade de N ingerida.

A maioria dos estudos indica que a retenção de nitrogênio é maior em búfalos do que em bovinos, em níveis idênticos de ingestão de nitrogênio e energia (Saini & Ray, 1964; Sebastian et al., 1970, Ranjan & Krishnamohan, 1977). Este balanço de nitrogênio mais elevado pode ser decorrente da capacidade inerente dos búfalos de manter maior concentração de nitrogênio não proteico na circulação sanguínea.

Ranjan & Krishnamohan (1977), verificaram que a concentração de ureia no sangue de bezerros búfalos em crescimento, abaixo de dois anos, é quase o dobro da observada em bezerros bovinos, paralelamente a uma maior concentração de amônia no rúmen dos búfalos. Tudo indica que a maior concentração de ureia sanguínea em búfalos não é em vão, pois ela pode ser efetivamente reciclada no rúmen em situações de deficiência de nitrogênio na dieta

Tatsapong et al. (2010), forneceram dietas com 50, 70, 90 e 110 g.kg<sup>-1</sup> de PB para bubalinos em crescimento com média de 15 meses de idade, com peso corporal médio de 209 kg e obteve valores para o BN variando de 50 a 300 g.kg<sup>-1</sup> em relação à quantidade de N ingerida.

O balanço de compostos nitrogenados é, na maioria das vezes, influenciado pela quantidade de PB da dieta, principalmente quando expresso em  $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ , devido à maior ingestão de compostos nitrogenados com o incremento dos níveis de PB nas dietas (Amorim, 2013).

Cavalcante et al. (2006), Verás et al. (2007), Pereira et al. (2007) e Tatsapong et al. (2010), observaram aumento linear nos dados de balanço de compostos nitrogenados com o incremento de PB dietética, devido à maior ingestão de N. Entretanto, indicaram que ocorre maior conservação dos compostos nitrogenados quando se utilizam dietas com menores teores proteicos, pois o aumento na PB da dieta pode ocasionar excesso de liberação de ureia via urina, constituindo desperdício de proteína.

### **Exigência de proteína para manutenção**

As proteínas são necessárias para a construção dos tecidos corporais, reposição celular e ainda fazem parte da composição do leite e carne, por isso, suas necessidades variam de acordo com o peso corporal, idade do animal, níveis de produção e trabalho, estágio fisiológico (crescimento, gestação, lactação, reprodução, etc).

Segundo o ARC (1980), a exigência de manutenção de um animal é definida como a quantidade de nutrientes necessária para que os processos vitais do seu corpo permaneçam normais, ou seja, para que animal não sofra alterações na sua composição corporal. A exigência de proteína para manutenção nada mais é do que a quantidade de proteína necessária para repor as perdas de nitrogênio na urina, fezes e descamação da pele.

O nitrogênio urinário endógeno (NUE) é a quantidade mínima de nitrogênio excretada na urina, proveniente da oxidação dos aminoácidos e do custo de manutenção associado à reciclagem de nitrogênio, que inclui ureia, creatinina, bilirrubina, alantoína e ácido úrico (Csiro, 1990). As perdas de NUE são consideradas menores que as perdas de nitrogênio metabólico fecal.

A perda metabólica fecal é proveniente da incompleta reabsorção dos nutrientes, pela descamação e pela secreção enzimática do trato gastrointestinal e pode ser alterada pelo tipo e quantidade de alimento ingerido, bem como pelo tamanho e atividade do trato gastrointestinal (Paulino et al., 2009).

As exigências de proteína para manutenção podem ser estimadas em estudos de curto prazo envolvendo balanço de nitrogênio, de modo que se encontre a mínima ingestão necessária para produzir equilíbrio de nitrogênio. Nesses estudos os animais são alimentados com diferentes quantidades, mas em níveis restritos de proteínas, de modo que as dietas atendam as exigências dos demais nutrientes. (Kurar & Mudgal, 1977; Sivaiah & Mudgal, 1978; Kurar & Mudgal, 1981).

O balanço de nitrogênio pode não ser uma boa ferramenta para estimar a exigência de proteínas se todos os tecidos não tiverem suas necessidades atendidas. Também não garante a preservação do nitrogênio de reserva ou seu conteúdo nos tecidos. Geralmente o equilíbrio de nitrogênio é atingido às custas de reservas corporais de proteínas, cuja depleção reduz as atividades enzimáticas e também reduz o nível de hemoglobina e a contagem de espermatozoides. Portanto, quando o balanço de nitrogênio é utilizado como medida para estimar as necessidades de proteína para manutenção, é importante que os animais estejam previamente bem nutridos de proteínas (Paul & Lal, 2010).

O balanço dos compostos nitrogenados é obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido e o total excretado nas fezes e na urina. O N metabólico fecal é estimado por regressão entre o N absorvido e a ingestão de N, expressos em  $\text{g.kg}^{-1}$  de MS. As perdas endógenas urinárias são estimadas por regressão entre a excreção urinária de N e a ingestão de N, expressas  $\text{g.kg}^{-0,75}$ , e as perdas endógenas totais, pela regressão entre o balanço de N e a ingestão de N, expressos em  $\text{g.kg}^{-0,75}$ ; todos representados pelo intercepto da equação de regressão (Van Soest, 1994).

Estimando-se a exigência de proteína para manutenção de bubalinos em crescimento através do intercepto da regressão entre a ingestão de PB ( $\text{g.kgPV}^{-0,75}$ ) e o balanço de nitrogênio Kurar & Mudgal (1981) obtiveram valores próximos a 3,56 g de  $\text{PB.PV}^{-0,75}$ ; Singh (1975) obteve 3,16 g de  $\text{PB.PV}^{-0,75}$ ; Gupta (1966) obteve 4,31 g de  $\text{PB.PV}^{-0,75}$ ; Sivaiah & Mudgal (1978) obtiveram 5,14 g de  $\text{PB.PV}^{-0,75}$ .

Estimativas recentes acerca das exigências nutricionais de búfalos são escassas, principalmente em se tratando das condições brasileiras de produção. Tatsapong (2010) estimou as exigências de búfalos em crescimento utilizando-se do mesmo método que os autores supracitados e obteve 4,5 g de  $\text{PB.PV}^{-0,75}$ .

## **Búfalos**

Segundo dados da FAO, a população mundial de búfalos (*Bubalus bubalis*) está estimada em cerca de 198 milhões de cabeças, com a maior concentração (97%) no continente asiático, local de origem dos bubalinos. Fora do continente asiático, o Brasil concentra a maior população desta espécie animal, que foi introduzido no país durante o século XIX, e possui 4 raças (Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo e Carabao), das cerca de 20 existentes no mundo.

A criação de búfalos vem se difundindo mundialmente devido à superioridade dos animais em relação a outros ruminantes domésticos, principalmente em se tratando de rusticidade e adaptação às variadas condições climáticas. Além disso, os búfalos são animais dóceis, de fácil manejo e lucrativos.

A produção de leite proporciona muitas opções na confecção de derivados, principalmente para a produção de mozzarella, que é o produto mais conhecido mundialmente, desta maneira, grande parte da produção de leite no mercado é destinada à produção de mozzarella, por isso, a produção de leite de búfalas é uma atividade de grande importância em muitos países do mundo. No Brasil, o búfalo tem despertado interesse crescente de criadores e órgãos de pesquisa por ser uma boa alternativa na pecuária leiteira (Jorge et al., 2006).

Embora os ruminantes apresentem semelhanças em sua fisiologia digestiva, sua funcionalidade não é exatamente a mesma em todas as espécies, uma vez que há características fisiológicas e comportamentais peculiares em cada espécie. Vega et al., (2010) observaram diferenças importantes no comportamento ingestivo entre bovinos e búfalos, como maior diâmetro dos músculos da mastigação em búfalos, que indica maior força de mastigação. Os búfalos também apresentaram maior ingestão em sistemas alimentares que há predominância de alimentos volumosos e comportamento de descanso mais prolongado que os bovinos.

Cutrignelli et al. (2007) e Calabro et al. (2008) observaram diferenças no processo fermentativo em experimentos *in vitro*, utilizando inoculo de rúmen de bovinos e de búfalos com relação à produção de gases, isso pode ser resultante da diversidade microbiana entre as espécies, uma vez que os búfalos possuem rúmen com maior atividade celulolítica, que proporciona melhor aproveitamento dos componentes fibrosos da dieta (Tewatia & Bhatia, 1998).

A população total e a composição dos protozoários ciliados no rúmen diferem das observadas em bovinos e em outros ruminantes, segundo Franzolin et. al. (2000),

búfalos têm apresentado proporções mais elevadas dos protozoários pertencentes aos gêneros da subfamília *Diplodiniinae* em relação aos ciliados do gênero *Entodinium* em diversos sistemas alimentares.

Além disso, alguns aspectos como o hábito de ingerir os alimentos mais lentamente, a menor taxa de passagem do alimento, o maior pH ruminal em decorrência da secreção salivar mais intensa, o maior poder tampão da saliva que flui para o rúmen (Sivkova et al., 1997) e da manutenção do balanço de nitrogênio positivo, em virtude da maior eficiência de utilização do nitrogênio amoniacal pelo uso mais rápido da amônia pelas bactérias ruminais contribuem para uma leve superioridade dos búfalos em relação aos bovinos, especialmente em dietas mais volumosas.

## Referências bibliográficas

- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of ruminant livestock**. Wallingford: CAB International. 351p, 1980.
- ALDERMAN, G. A. Review of current protein requirement systems for ruminants. In: Simpósio Internacional Sobre Exigências Nutricionais de Ruminantes, 1., 1995, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV. p. 1-25, 1995.
- AMORIM, T.R. **Digestibilidade Verdadeira e Exigência de proteína para manutenção em tourinhos red norte**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 9-21, 2005.
- BEZERRA, L.R.; SILVA, A. M.; AZEVEDO, S.A.; RODRIGUES, O.G. ; AZEVEDO, P.C ; MENDES, R.S. . Concentrações séricas proteicas e minerais de cordeiros alimentados artificialmente com leite enriquecido com *Spirulina platensis*. **Acta Veterinaria Brasilica** (UFERSA), v. 3, p. 132-137, 2009.
- BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, June 2009.
- CALABRO, S.; MONIELLO, G.; PICCOLO, V., BOVERA, F.; INFASCELLI, F.; TUDISCO, R.; CUTRIGNELLI, M.I. Rumen fermentation and degradability in buffalo and cattle using the *in vitro* gas production technique. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v.92, n.3, p.356-362, 2008.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1459-1465, 1995
- CAVALCANTE, M. A. B.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; RIBEIRO, K.G. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: consumo, digestibilidade total e desempenho produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 3, p. 711-719, 2005.
- CAVALCANTE, M. A. B.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; RIBEIRO, K.G.; PACHECO, L.B.B.; ARAUJO, D.; LEMOS, V.L.C. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos

nitrogenados e produção de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 203- 210, 2006.

COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION - CSIRO. **Feeding standards for Australian livestock - ruminants**. Victoria: Australia Agricultural Council. 266p, 1990.

CUTRIGNELLI, M.I.; D'URSO, S.; TUDISCO, R., GROSSI, G.; PICCOLO, V. Effect of ruminant species (bovine vs buffalo) and source of inoculum (rumen liquor vs faeces) on in vitro fermentation. **Italian Journal Animal Science**, v.6, p.295-297, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Acessado em 09 de Abril de 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/corp/estatictics/en/>>

FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M.H.T. População protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1853-1861, 2000.

GONZALEZ, F.H.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, H. D.; BARCELLOS, J.; PATINÕ, H. O.; RIBEIRO, L.A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

GUIMARÃES JÚNIOR, R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, L.G.R. et al. Balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com silagens de três genótipos de milho [ *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: SBZ, 2007. [CD-ROM]

GUPTA, S. S., BHARGAVA, V. N., RAINA, N. N. & SINGH, S. N. Studies on endogenous and metabolic fecal nitrogen in buffaloes. **Indian Journal of Veterinary Science** v.36 p.90-93, 1966.

JORGE, A.M.; ANDRIGHETTO, C.; MILLEN, D.D.; CALIXTO, M.G.; VARGAS, A.D.F. Desempenho e eficiência biológica de bubalinos de três grupos genéticos terminados em confinamento e abatidos em diferentes estádios de maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.252-257, 2006

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2011.

- KURAR, C. K & MUDGAL, V. D. **Comparative utilization of dietary energy in lactating crossbred cows and buffaloes during early lactation**. Proceedings of the XX International Dairy Congress, Paris, p. 82, 1977.
- KURAR, C. K. & MUDGAL, V. D. Maintenance requirements for protein in buffaloes. **Indian Journal of Animal Science** v.51 p. 817-820, 1981.
- MENDES, C.Q.; GENTIL, R.S.; PIRES, A.V. et al. Metabolismo do nitrogênio de cordeiros alimentados com rações contendo silagem de cana-de-açúcar tratada com aditivo químico ou bacteriano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: SBZ, 2007. [CD-ROM]
- PAUL, S. S.; LAL, D. 2010. **Nutrient Requirements of Buffaloes**. In: Azadpur, Delhi, Índia: Satish Serial Publishing House. 138p., 2010.
- PAULINO, P.V.R.; CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; REIS, S.F. Exigências nutricionais de Bovinos de corte: Técnicas de pesquisa e resultados nacionais. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2009, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Editora 5D. v.1, p. 123-146, 2009.
- PEREIRA, K.P.P.; VÉRAS, A.S.C.; FERREIRA, M.A.; BATISTA, A.M.V.; MARQUES, K.A.; FOTIUS, A.C.A. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.29, n.4, p.433-440, 2007.
- RANJHAN, S.K., KRISHNAMOHAN, D.V.G. Efficiency of utilization of nutrients in cattle and buffaloes. **Indian Dairyman**.V.29 p.365-368, 1977.
- SAINI, B.S., RAY, S.N. Comparative utilization of coarse fodders in cattle and buffaloes. **NDRI Annual Report**.1964
- SALAZAR, D.R.; CORTINHAS, C.S.; FREITAS JR, J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. **PUBVET**, Londrina, V. 2, N. 15, Ed. 26, Art. 325, 2008.
- SALVADOR, F.M.; PÉREZ, J.R.O.; REZENDE, A.V. et al. Desempenho de borregas alimentadas com dietas promovendo diferentes balanços de proteína degradável no rúmex e proteína metabolizável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45, Lavras, 2008. **Anais...** Lavras: SBZ, 2008.

- SANTOS, F.A.P.; MENDONÇA, A.P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. 2ed. **Nutrição de Ruminantes**. FAPESP: Jaboticabal, SP. p.265-297, 2011.
- SEBASTIAN, L.; MUDGAL, V.D.; NAIR, P.G. **Comparative efficiency of milk production by sahiwal cattle and Murrah buffalo**. *Journal Animal Science* v.30 p.253-256, 1970.
- SINGH, S. N. Protein requirements of Indian buffaloes. Annual Report, **Indian Council of Agricultural Research**, India, 1975.
- SIVIAH, K. & MUDGAL, V. D. Effect of feeding different levels of protein and energy on feed utilization for growth and milk production on buffaloes, pp. 145-146. Annual Report, **National Dairy Research Institute Karnal**, India, 1978.
- SIVKOVA, K.; TRUFCHEV, H.; VARLIAKOV, I. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves I. Effect on diet, containing alfafa haylage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p.312-316. Caserta. *Proceedings...* Caserta: p.312-316, 1997.
- TATSAPONG, P.; PEANGKOUM, P.; PIMPA, O.; HARE, M. D. Effects of Dietary Protein on Nitrogen Metabolism and Protein Requirements for Maintenance of Growing Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Calves. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n.8, p. 1216-1222, 2010.
- TEWATIA, B. S.; BHATIA, S. K. Comparative ruminal biochemical and digestion related physiological characteristics in buffaloes and cattle fed a fibrous diet. **Buffalo Journal**, v. 14, n. 14, p. 161-170, 1998.
- VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K.A. **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR – Corte**. 1.ed. Viçosa: UFV, DZO. 142p, 2006.
- VAN SOEST; P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2ed. Ithaca: Cornell University Press. 476 p, 1994..
- VEGA, R.S.A.; DEL BARRIO, A.N.; SANGEL, P.P.; KATSUBE, O.; CANARIA, J.C.; HERRERA, J.V.; LAPITAN, R.M.; ORDER, E.A.; FUJIHARA, T.; KANAI, Y. Eating and rumination behaviour in Brahman grade cattle and crossbred water buffalo fed on high roughage diet. **Journal of Animal Science**, v.81, n.5, p.574-579, 2010.

VÉRAS, R.M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; RENNÓ, L.N.; PAULINO, P.V.R.; SOUZA, M.A. Balanço de compostos nitrogenados e estimativa das exigências de proteína de manutenção de bovinos Nelore de três condições sexuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p. 1212-1217, 2007.

## II- Níveis de Proteína Para Búfalas Mestiças em Crescimento: Metabolismo de Nitrogênio, Parâmetros Digestivos e Exigência de Proteína para Manutenção

**Resumo:** Objetivou-se avaliar o metabolismo de nitrogênio, digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais de fêmeas bubalinas em crescimento recebendo dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, bem como estimar a exigência de proteína para manutenção dessa categoria animal. Utilizou-se 4 fêmeas bubalinas, possuindo cânulas no rúmen, com peso inicial médio de  $355 \pm 3,5$  kg, distribuídas em um quadrado latino (4x4) composto por 4 animais e 4 níveis de PB na dieta (70, 90, 110 e 130 g.kg<sup>-1</sup> de MS). As dietas foram compostas de silagem de milho e concentrado, formulados para atender os níveis de proteína propostos e a ingestão foi *ad libitum* permitindo de 50 a 100 g.kg<sup>-1</sup> de MS de sobras. Os níveis de PB influenciaram a ingestão de MS e demais nutrientes, porém não houve efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes e cinética ruminal. O balanço de nitrogênio aumentou linearmente com os crescentes níveis de PB dietético, entretanto, quando expressos em relação ao nitrogênio ingerido, esse efeito não se confirma, com valor médio de 485,50 g.kg<sup>-1</sup>. Os metabólitos sanguíneos (proteínas totais e ureia) foram influenciados positivamente pelas dietas e a exigência de proteína para manutenção dos animais nessas condições, obtida pelo intercepto da regressão entre o balanço de nitrogênio e o nitrogênio ingerido foi de 4,63 g PB.kg PV<sup>-0,75</sup>.

**Palavras-chave:** balanço de nitrogênio, bubalinos, digestibilidade, exigência proteica, fluxo de nutrientes

**ABSTRACT:**

The objective was to evaluate the nitrogen metabolism, digestibility of nutrients and ruminal parameters in the diet of buffaloes containing increasing levels of crude protein, and to estimate the requirement of protein for maintenance this category animal. Four crossbred growing buffaloes were used, weighing  $355 \pm 3.5$  kg of body weight, cannulated in the rumen and distributed in a 4×4 Latin square design, with four animals and four levels of crude protein (70, 90, 110 and 130 g.kg<sup>-1</sup>) and four periods. The diets were consisted in corn silage and concentrate, and was formulated to meet the proposed levels of CP. The intake was ad libitum, allowing 50 – 100 g.kg<sup>-1</sup> of refusals. The levels of CP influenced the dry matter intake and others nutrients, however did not influence nutrient digestibility and ruminal kinetic. The nitrogen balance increased linearly with the increasing levels of CP, however, when expressed in relation to nitrogen intake, with an average of 485.50 g.kg<sup>-1</sup>, this effect is not confirmed. The blood metabolites (urea and total proteins) were influenced by diets and protein requirements for maintenance of the animals in these conditions, obtained by the intercept of the regression of nitrogen balance and nitrogen intake was  $4.63 \text{ g PB.kg W}^{-0.75}$

**Keywords:** buffaloes, digestibility, nutrient flow, nitrogen balance, protein requirement

## **Introdução**

A criação de búfalos no Brasil é a mais importante localizada fora do continente asiático (Alves et al., 2010), além disso, tem ocorrido interesse crescente pelos seus produtos alimentícios em função de suas qualidades nutricionais. A principal finalidade da bubalinocultura brasileira é a produção de leite, que teve um crescimento de 20% no último ano em relação ao ano anterior (Seno et al., 2013). Porém, há acentuada carência de informações acerca da nutrição da espécie bubalina, principalmente em relação às exigências de proteína.

O desempenho e produção de carne e leite de bubalinos dependem de conhecimentos básicos da nutrição de ruminantes, entretanto, apesar das diferentes espécies de ruminantes apresentarem fisiologia digestiva semelhante, a funcionalidade não é exatamente a mesma entre as espécies, já que envolve características comportamentais e fisiológicas peculiares de cada uma delas dentro do ambiente onde vivem.

Portanto, para obter o máximo desempenho produtivo e reprodutivo dos animais bubalinos, é importante conhecer suas necessidades nutricionais, principalmente acerca da proteína, que, depois da energia é o nutriente mais limitante no desenvolvimento dos ruminantes (Paul, 2011), além de ser o nutriente mais dispendioso da dieta.

A perda de nitrogênio pelos ruminantes ocorre em diferentes níveis causando prejuízos econômicos além de também causar danos ao meio ambiente. Dessa forma, promover a adequada eficiência de assimilação pelo animal por meio de uma alimentação balanceada e sincronizada em energia e proteína é um importante meio de redução de perdas (Gonçalves et al., 2009).

A concentração de ureia na urina está relacionada positivamente com as concentrações de nitrogênio no plasma e com sua ingestão, constituindo-se em um bom indicativo da eficiência de utilização do nitrogênio ruminal (Valadares et al., 1997). A concentração de ureia plasmática também está diretamente relacionada ao aporte proteico e à relação entre proteína e energia da dieta. Além disso, a excreção de ureia representa elevado custo biológico e desvio de energia para a manutenção das concentrações corporais de nitrogênio em níveis não tóxicos (Paixão et al., 2006).

Portanto, o balanço dos compostos nitrogenados permite a avaliação do estado nutricional dos animais por meio dos produtos absorvidos e da extensão das perdas excretadas, o que pode refletir na sua resposta produtiva.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a inclusão de níveis de PB na dieta de fêmeas bubalinas em crescimento sobre a ingestão e digestibilidade dos nutrientes, bem como os metabolitos sanguíneos, balanço dos compostos nitrogenados e determinar a exigência de PB para manutenção dos animais dessa categoria, sob condições brasileiras de produção.

## **Material e Métodos**

Os protocolos experimentais desenvolvidos nesta pesquisa atenderam plenamente aos princípios éticos da experimentação animal, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, e foram enviados para apreciação do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, sob número de aprovação 009/2013.

O experimento foi realizado no setor de digestibilidade de ruminantes da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e as amostras dos alimentos, sobras e fezes foram analisadas no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal (LANA), ambos pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizadas 4 fêmeas bubalinas mestiças (murray x jafarabadi), com 18 meses de idade, pesando em média  $355 \pm 3,5$  kg, possuindo cânulas no rúmen, alojadas em baias individuais de 9 m<sup>2</sup> com piso de concreto, equipadas com bebedouro e comedouro. Os animais foram distribuídos em um quadrado latino (4x4), composto por 4 animais e 4 níveis de PB na dieta (70, 90, 110 e 130 g.kg<sup>-1</sup> de MS).

O período experimental teve duração total de 80 dias, dividido em 4 períodos com duração de 20 dias cada, sendo 14 dias para adaptação dos animais às dietas e 6 dias para coleta de dados.

Os tratamentos utilizados diferiram entre si nos níveis de proteína bruta. As dietas foram compostas de silagem de milho e ração concentrada formuladas para atender os níveis de proteína propostos e a ingestão foi *ad libitum* permitindo de 50 a 100 g.kg<sup>-1</sup> de MS de sobras.

Os alimentos e sobras foram amostrados durante todo o período de coletas, armazenados em sacos plásticos e congelados para posteriores análises

A MS das amostras foi determinada em estufa de ventilação forçada de acordo com o procedimento nº 934.01 AOAC (1990). As cinzas foram determinadas por combustão a 600°C por 6 horas de acordo com o método da AOAC 924.05 (1990). A determinação no N total seguiu o procedimento nº 990.03 da AOAC (1990). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), com correção do teor de nitrogênio, foram medidas de acordo com Mertens (2002) com uso de amilase termoestável, sem sulfito de sódio. As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA), sem correção do teor de cinzas, foram determinadas de acordo com o procedimento nº 973.18 AOAC (1990). O extrato etéreo (EE) foi determinado de acordo com o procedimento nº 7.060 AOAC (1990). Os nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foram estimados de acordo com a equação:  $NDT (g.kg^{-1}) = CNF \text{ digestível} + PB \text{ digestível} + FDNa \text{ digestível} + (EE \text{ digestível} \times 2,25)$ , assim como carboidratos não fibrosos,  $CNF (g.kg^{-1}) = 100 - (PB (g.kg^{-1}) + FDNp (g.kg^{-1}) + EE (g.kg^{-1}) + cinzas (g.kg^{-1}))$ , ambas equações descritas por Weiss (1999). Face à presença de ureia nas dietas, os CNF dos concentrados foram calculados segundo Hall (2000), em que  $CNF(g.kg^{-1}) = 100 - [(PB(g.kg^{-1}) - PB(g.kg^{-1}) \text{ derivada da ureia} + ureia (g.kg^{-1})) + EE(g.kg^{-1}) + FDN(g.kg^{-1}) + cinzas(g.kg^{-1})]$ .

A composição química dos ingredientes utilizados para a formulação das rações encontram-se na Tabela 1 e a proporção dos ingredientes na dieta e a composição química da dieta total encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes das dietas

	Silagem de milho	Milho	Farelo de algodão
	g.kg <sup>-1</sup> de MS		
Matéria seca	368,9	902,8	911,2
Matéria orgânica	960,8	988,9	949,7
Proteína bruta	70,30	90,10	310,2
Extrato etéreo	24,30	39,90	21,50
Fibra em detergente neutro	546,4	111,5	378,8
Fibra em detergente ácido	281,8	35,20	325,4
Carboidratos totais	869,5	866,8	606,2
Carboidratos não fibrosos	319,0	757,1	233,3

Tabela 2. Proporção dos ingredientes e teores médios dos nutrientes das dietas (g.kg<sup>-1</sup> de MS)

Ingrediente	Nível de proteína bruta (g.kg <sup>-1</sup> de MS)			
	70	90	110	130
Silagem de milho	900,0	850,0	850,0	800,0
Milho	85,00	68,30	40,00	54,80
Farelo de algodão	-	65,20	87,50	119,5
Ureia	-	0,90	6,30	10,50
Sulfato de amônia	-	0,10	0,70	1,20
Sal mineral <sup>1</sup>	6,00	6,00	6,00	6,00
Calcário	5,50	7,00	7,00	8,00
Fosfato bicálcico	3,50	2,50	2,50	-
Total	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Matéria seca	408,7	434,6	429,4	453,5
Matéria orgânica	948,8	946,8	940,2	937,5
Proteína bruta (PB)	70,08	80,87	100,9	129,9
Proteína degradável no rúmen (PDR)	720,1	710,4	710,8	710,2
PB:PDR	1,37:1	1,40:1	1,39:1	1,40:1
Extrato etéreo	2,47	2,46	2,43	2,44
Fibra em detergente neutro	501,2	496,2	502,0	488,5
Fibra em detergente ácido	256,6	263,1	269,4	266,2
Carboidratos totais	850,0	830,2	820,2	810,1
Carboidratos não fibrosos	340,8	320,0	300,0	290,6

\*PDR (g.kg<sup>-1</sup> da PB) calculada com base em valores tabelados ; 1- Composição do suplemento mineral (por kg do produto): 181g de Cálcio, 130g de fósforo, 9,40g de enxofre, 100mg de cobalto, 1,25g de cobre, 2,20g de ferro, 90mg de iodo, 2g de manganês, 15mg de selênio, 5,27g de zinco, 1,3g de flúor

A coleta de fezes para determinação da digestibilidade foi realizada sempre às 8h00 e 16h00 diretamente da ampola retal durante 5 dias. A coleta de omaso foi realizada por sucção, segundo técnica descrita por Leão et al. (2002) e foram feitas a cada 27 horas, durante 5 dias.

Para a determinação do balanço de nitrogênio, as coletas de fezes e urina foram realizadas durante um período de 24 horas ininterruptas. As fezes foram coletadas após defecação espontânea e armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados. A cada 8 horas de coleta, as fezes foram pesadas, homogeneizadas e uma amostra representativa foi armazenada e congelada a -15°C. A coleta de urina foi realizada via sonda de *folley* nº 16, duas vias, com balão de 25 mL que foi inflado utilizando-se soro fisiológico. Na extremidade livre do cateter, foi adaptada uma mangueira de silicone, pela qual a urina foi conduzida até um recipiente de plástico, com tampa, contendo 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 800:200, v/v.

A coleta de sangue foi realizada quatro horas após o fornecimento da ração, em todos os animais, via punção da veia jugular, utilizando-se tubo de ensaio contendo gel separador e acelerador de coagulação. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos, para separação do soro, que, em seguida, foi armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$  para análise de ureia e proteínas totais.

Para determinação dos fluxos diários de matéria seca no omaso e nas fezes foi utilizado, como indicador externo, o óxido crômico, fornecido em duas doses intraruminais diariamente (às 8h e às 16h) de 5g de óxido crômico cada dose, previamente pesados e acondicionados em papel higroscópico.

As amostras de fezes e da digesta omasal foram armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e congeladas para posterior análise da composição química e das concentrações de cromo.

Para mensuração do pH e quantificação do nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) foi coletado líquido ruminal manualmente, via cânula ruminal, e filtrado em gaze, nos tempos zero (0), 2, 4, 6 e 8 horas após a alimentação matutina. O pH foi mensurado imediatamente após a coleta e 50 mL de líquido ruminal foram acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 500:500;v/v, para determinação da concentração de  $\text{N-NH}_3$ .

Para avaliar a taxa de diluição, foi administrado no rúmen dos animais 32 g de Co-EDTA em solução (Uden et al., 1980) antes da primeira alimentação. O fluido ruminal foi coletado via cânula ruminal nos tempos 0 (que antecede a primeira alimentação) 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 24 horas após a alimentação da manhã e armazenados a  $-15^{\circ}\text{C}$  para análises de concentração de cobalto.

Para estimativa da eficiência de síntese de proteína microbiana foi realizada coleta spot de urina para determinação dos derivados de purinas, a urina foi coletada 4 horas após a alimentação e 10 mL foram armazenados em frascos plásticos, devidamente identificados, contendo 40mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,036N para posterior análise de alantoína, ácido úrico e creatinina.

As concentrações de óxido de cromo nas amostras de digesta omasal e fezes foram determinadas por meio de espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com o método proposto por Williams et al. (1962).

A dosagem de amônia foi determinada pela técnica de Ferner (1965), modificada por Vieira et al. (1980)

Para obter as concentrações dos derivados de purina, presentes na urina, foram realizadas as análises de alantoína segundo metodologia descrita por Chen & Gomes

(1992) e a creatinina e ácido úrico, foram determinados usando kits comerciais Analisa®, e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1601).

A partir da concentração de creatinina, foi estimado o volume urinário (expresso em  $L \cdot dia^{-1}$ ), dividindo-se a excreção diária de creatinina,  $mmol \cdot kg PV^{-0,75}$ , pela concentração de creatinina ( $mmol \cdot L^{-1}$ ). Para determinação da excreção diária de creatinina ( $mmol \cdot kg PV^{-0,75}$ ), foi adotado o valor médio de  $0,44 mmol \cdot kg PV^{-0,75}$ , obtido por Chen et al. (1996) para bubalinos. A produção de nitrogênio (N) microbiano foi calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas (X,  $mmol \cdot dia^{-1}$ ), a qual foi estimada a partir da excreção urinária de derivados de purina (DP)(Y,  $mmol \cdot dia^{-1}$ ), por meio da equação descrita por Dipu et al (2006) para bubalinos:  $Y = 0,74X + (0,117 PV^{0,75})$ ; em que o valor de 0,74 representa a recuperação de purinas absorvidas como DP na urina e o valor da constante  $0,117 mmol \cdot kg PV^{-0,75} / dia$  representa a contribuição endógena líquida de DP em bubalinos.

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y,  $g N \cdot dia^{-1}$ ) foi calculada em função das purinas absorvidas (X,  $mmol \cdot dia^{-1}$ ), por meio da equação descrita por Chen & Gomes, (1992):  $Y = X (mmol \cdot dia^{-1}) \times 70 / 0,116 \times 0,83 \times 1000$ , em que: 70 representa o conteúdo de N nas purinas ( $mg N \cdot mmol^{-1}$ ); 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116 representa a razão N-purina:N total dos microrganismos ruminais.

A estimativa da síntese de PB microbiana (SPBmic) foi obtida multiplicando-se a síntese de N microbiano por 6,25, enquanto a eficiência de síntese de proteína microbiana foi determinada como:  $EPBmic (g \cdot 100g^{-1}) = SPBmic (g) / CNDT (100 g)$ , em que CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais.

O volume ruminal, a taxa de diluição, o tempo de reciclagem e o fluxo de líquido ruminal foram estimados utilizando-se os parâmetros da equação de regressão linear do logaritmo natural das concentrações de cobalto ( $mg \cdot 100mL^{-1}$ ) nas amostras de líquido ruminal retiradas nos diferentes tempos. O volume ruminal foi estimado dividindo-se o total do indicador (mg) adicionado no rúmen pelo antilogaritmo dos interceptos dessas equações. A taxa de diluição foi representada pelos coeficientes de regressão obtidos por meio das equações para cada tratamento e do período de avaliação. A partir desses parâmetros (taxa de diluição e volume ruminal), estimou-se o tempo de reciclagem ( $100 / taxa \text{ de diluição}$ ) e o fluxo ruminal ( $volume \text{ ruminal} \times taxa \text{ de diluição} / 100$ ).

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

O N metabólico fecal foi estimado por regressão entre o N absorvido (Y) e a ingestão de N (X), expressos em  $\text{g.kg}^{-1}$  MS. As perdas endógenas urinárias foram estimadas por regressão entre a excreção urinária de N (Y) e a ingestão de N (X), expressas  $\text{g.kg}^{-10,75}$ , e as perdas endógenas totais, pela regressão entre o balanço de N (Y) e a ingestão de N (X), expressos em  $\text{g.kg}^{-0,75}$ ; todos representados pelo intercepto da equação de regressão (Van Soest, 1994).

As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2.). Utilizou-se o delineamento experimental, em quadrado latino 4x4, com quatro animais e quatro dietas, de acordo com o modelo:

$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$ , em que:

$Y_{ijk}$  = variáveis observadas;  $\mu$  = média geral;  $A_i$  = efeito do animal i, variando de 1 a 4;  $P_j$  = efeito do período j, variando de 1 a 4;  $T_k$  = efeito do tratamento k, variando de 1 a 4;  $e_{ijk}$  = erro aleatório.

Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito do animal, que foi considerado aleatório. Contrastes ortogonais polinomiais foram usados para avaliar as respostas (linear e quadrática) ao aumento dos níveis de PB na dieta. Para as variáveis pH e N-NH<sub>3</sub>, procederam-se à subdivisão das parcelas em função dos tempos de amostragem. Foi utilizada a análise de regressão para as concentrações de pH e N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal, em função do tempo após a alimentação da manhã.

## **Resultados e Discussão**

O aumento nos teores de PB dietético teve efeito positivo ( $P < 0,05$ ) sobre a ingestão de MS, MO, PB, FDN e FDA, porém não teve efeito sobre a ingestão de EE, dos carboidratos não fibrosos e carboidratos totais (Tabelas 3 e 4). Contudo, o aumento na ingestão da MS e dos nutrientes citados resultou em aumentos lineares nas ingestões dos nutrientes digestíveis totais ( $P < 0,05$ ), com o crescente teor de PB na dieta.

Níveis críticos de ingestão de proteína provocam queda na ingestão voluntária de alimentos, embora, para ruminantes, o nível crítico seja menor devido à contribuição proteica da microflora ruminal e a reciclagem de nitrogênio. Valadares et al. (1997) relataram que, quando o suprimento de nitrogênio originário da dieta não atende às

exigências dos microrganismos ruminais, pode ocorrer limitação do crescimento microbiano, afetando a digestibilidade da parede celular e, conseqüentemente, a ingestão. Assim, os resultados sugerem que o menor nível de PB na dieta, 70 g.kg<sup>-1</sup>, foi adequado para promover o crescimento microbiano, uma vez que não houve efeito dos níveis de PB sobre os coeficientes de digestibilidade ruminal e total da fração fibrosa (FDN e FDA) da dieta e sobre a cinética ruminal.

Tabela 3. Ingestão, digestibilidade e fluxos fecal e omasal da MS e demais nutrientes

Item	Nível de proteína (g.kg <sup>-1</sup> )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
Matéria seca									
Ingestão <sup>a</sup>	5,58	6,76	6,99	7,09	1	0,25	<0,01	<0,01	0,31
Fluxo omasal <sup>a</sup>	2,66	2,72	2,67	2,72	ns	0,10	0,12	0,12	0,16
DR <sup>b</sup>	0,51	0,59	0,61	0,62	ns	1,56	0,05	<0,01	0,11
Fluxo fecal <sup>a</sup>	2,10	2,49	2,54	2,50	ns	0,23	0,10	0,14	0,21
DI <sup>b</sup>	0,22	0,14	0,18	0,20	ns	1,29	0,17	0,75	0,07
Matéria orgânica									
Ingestão <sup>a</sup>	5,35	6,43	6,65	6,73	2	0,23	<0,01	<0,01	0,33
Fluxo omasal <sup>a</sup>	2,19	2,31	2,26	2,35	ns	0,25	0,13	0,19	0,23
DR <sup>b</sup>	0,58	0,60	0,60	0,61	ns	1,32	0,11	0,21	0,18
Fluxo fecal <sup>a</sup>	1,86	2,25	2,31	2,18	ns	0,25	0,12	0,13	0,23
DI <sup>b</sup>	0,15	0,14	0,15	0,16	ns	1,85	0,97	0,81	0,79
Proteína Bruta									
Ingestão <sup>a</sup>	0,40	0,62	0,78	0,96	3	0,06	<0,01	<0,01	0,34
Fluxo omasal <sup>a</sup>	0,52	0,57	0,57	0,69	4	1,71	0,03	0,02	0,37
DR <sup>b</sup>	-0,32	0,07	0,26	0,28	5	7,31	<0,01	<0,01	0,21
Fluxo fecal <sup>a</sup>	0,17	0,19	0,20	0,19	ns	1,02	0,23	0,29	0,51
DI <sup>b</sup>	0,68	0,67	0,66	0,67	ns	1,11	0,93	0,73	0,61
Extrato etéreo									
Ingestão <sup>a</sup>	0,14	0,16	0,16	0,16	ns	0,21	0,12	0,11	0,16
Fluxo omasal <sup>a</sup>	0,14	0,16	0,15	0,15	ns	0,28	0,13	0,16	0,14
DR <sup>b</sup>	0,03	0,03	0,06	0,08	ns	0,29	0,20	0,06	0,73
Fluxo fecal <sup>a</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	ns	0,27	0,18	0,21	0,28
DI <sup>b</sup>	0,85	0,87	0,85	0,86	ns	0,21	0,11	0,13	0,17
Nutrientes digestíveis totais									
Ingestão <sup>a</sup>	3,62	4,60	4,76	4,83	6	0,18	0,03	0,02	0,23

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; <sup>a</sup> - kg.dia<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> - kg.kg<sup>-1</sup>; DR = Digestibilidade ruminal. DI = Digestibilidade intestinal; NDT= CNF digestível + PB digestível + FDNp digestível + (EE digestível x 2,25); 1- Y = 4,22 + 0,24X R<sup>2</sup> = 0,3048; 2- Y = 4,11 + 0,22X R<sup>2</sup> = 0,2983; 3- Y = 0,24 + 0,09X R<sup>2</sup> = 0,9114; 4- Y = 0,33 + 0,02X R<sup>2</sup> = 0,8296; 5- Y = 106,49 + 1,68X R<sup>2</sup> = 0,4813; 6- Y = 4,21 + 0,24X R<sup>2</sup> = 0,3098; ns - não significativo.

De acordo com a equação de regressão obtida entre a ingestão de MS, representada em  $\text{kg.dia}^{-1}$ , e os níveis de PB da dieta, houve aumento linear de 0,24 kg na ingestão de MS para cada unidade percentual de aumento da PB, o mesmo ocorre com a ingestão de NDT, que também aumenta 0,24 kg para cada unidade percentual de inclusão de PB.

Tabela 4. Ingestão, digestibilidade e fluxos fecal e omasal dos carboidratos

Item	Nível de proteína ( $\text{g.kg}^{-1}$ )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
Fibra em detergente neutro corrigido para proteína									
Ingestão <sup>a</sup>	2,85	3,41	3,52	3,55	1	0,13	<0,01	<0,01	0,10
Fluxo omasal <sup>a</sup>	1,19	1,36	1,36	1,42	ns	0,16	0,15	0,18	0,23
DR <sup>b</sup>	0,58	0,60	0,61	0,61	ns	0,92	0,37	0,25	0,20
Fluxo fecal <sup>a</sup>	1,10	1,30	1,32	1,37	ns	0,13	0,18	0,21	0,26
DI <sup>b</sup>	0,08	0,04	0,03	0,04	ns	0,36	0,96	0,71	0,90
Fibra em detergente ácido									
Ingestão <sup>a</sup>	1,46	1,81	1,88	1,91	2	0,07	<0,01	<0,01	0,10
Fluxo omasal <sup>a</sup>	0,81	0,89	0,98	1,02	ns	0,09	0,13	0,14	0,28
DR <sup>b</sup>	0,45	0,51	0,48	0,46	ns	1,12	0,13	0,89	0,09
Fluxo fecal <sup>a</sup>	0,74	0,83	0,90	0,92	ns	0,67	0,12	0,14	0,23
DI <sup>b</sup>	0,08	0,06	0,08	0,10	ns	0,40	0,17	0,15	0,11
Carboidratos totais									
Ingestão <sup>a</sup>	4,29	5,15	5,07	5,07	ns	0,25	0,05	0,31	0,64
Fluxo omasal <sup>a</sup>	1,75	1,78	1,71	1,74	ns	0,23	0,11	0,14	0,34
DR <sup>b</sup>	0,59	0,65	0,66	0,66	ns	0,47	0,83	0,77	0,43
Fluxo fecal <sup>a</sup>	1,58	1,58	1,53	1,54	ns	0,31	0,21	0,46	0,54
DI <sup>b</sup>	0,10	0,11	0,11	0,12	ns	0,45	0,56	0,28	0,93
Carboidratos não fibrosos									
Ingestão <sup>a</sup>	1,93	2,19	2,09	2,01	ns	0,12	0,32	0,78	0,12
Fluxo omasal <sup>a</sup>	0,72	0,77	0,74	0,76	ns	0,19	0,21	0,32	0,38
DR <sup>b</sup>	0,63	0,66	0,65	0,67	ns	1,14	0,22	0,25	0,68
Fluxo fecal <sup>a</sup>	0,63	0,68	0,62	0,66	ns	0,82	0,23	0,42	0,32
DI <sup>b</sup>	0,12	0,11	0,16	0,13	ns	0,45	0,31	0,10	0,82

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; <sup>a</sup> -  $\text{kg.dia}^{-1}$ ; <sup>b</sup> -  $\text{kg.kg}^{-1}$ ; DR = Digestibilidade ruminal. DI = Digestibilidade intestinal; CNF =  $100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%EE + \%FDN + \% \text{ cinzas}]$ ; 1-  $2,26 + 0,11X$  R<sup>2</sup> = 0,2215; 2 -  $1,06 + 0,07X$  R<sup>2</sup> = 0,3775; ns - não significativo.

Da mesma forma, Valadares et al. (1997), observaram relação linear entre o nível de proteína da dieta e a ingestão de NDT. Entretanto, Pereira et al. (2007), ao avaliarem níveis crescentes de PB no concentrado em dietas com proporção

volumoso:concentrado de 70:30, não observaram aumento da ingestão de nutrientes com o aumento do nível de PB (110,3 a 140,4 g.kg<sup>-1</sup> PB) nas dietas. Para esses autores as diferentes respostas na ingestão, principalmente de MS, com o aumento do nível de PB da dieta pode estar relacionada à densidade energética e à fração fibrosa da dieta.

Segundo Van Soest (1994), a reciclagem de nitrogênio é um dos fatores-chave para os menores efeitos da suplementação proteica sobre a digestão quando a dieta apresenta, no mínimo 70 g.kg<sup>-1</sup> de PB, uma vez que, essa é a exigência mínima de nitrogênio para a microbiota ruminal. Assim, tanto o menor nível de PB quanto os demais propostos neste estudo não alteraram a digestibilidade total dos nutrientes (P>0,05) (exceção sobre a digestibilidade da PB), uma vez que a exigência de nitrogênio no rúmen foi atendida (Tabela 5).

Tabela 5. Digestibilidade total da MS e dos demais nutrientes

Item	Nível de proteína (g.kg <sup>-1</sup> )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
DTMS	0,62	0,63	0,64	0,65	ns	0,71	0,10	0,07	0,15
DTMO	0,65	0,65	0,65	0,68	ns	0,84	0,10	0,07	0,80
DTPB	0,57	0,69	0,75	0,77	1	2,17	0,01	0,01	0,07
DTEE	0,85	0,89	0,89	0,91	ns	0,76	0,21	0,13	0,25
DTFDN	0,61	0,62	0,63	0,61	ns	1,14	0,24	0,09	0,26
DTFDA	0,51	0,52	0,53	0,56	ns	1,23	0,41	0,13	0,61
DTCHT	0,62	0,61	0,65	0,66	ns	1,05	0,65	0,25	0,96
DTCNF	0,67	0,68	0,71	0,73	ns	1,64	0,68	0,27	0,82
NDT	0,63	0,64	0,65	0,66	2	0,21	0,04	0,03	0,25

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; DTMS- Digestibilidade total da matéria seca (kg.kg<sup>-1</sup>); DTMO – Digestibilidade total da matéria orgânica (kg.kg<sup>-1</sup>); DTPB – Digestibilidade total da proteína bruta (kg.kg<sup>-1</sup>); DTEE- Digestibilidade total do extrato etéreo (kg.kg<sup>-1</sup>); DTFDN – Digestibilidade total da fibra em detergente neutro (kg.kg<sup>-1</sup>); DTFDA- Digestibilidade total da fibra em detergente ácido (kg.kg<sup>-1</sup>); DTCHT – digestibilidade total dos carboidratos totais (kg.kg<sup>-1</sup>); DTCNF – Digestibilidade total dos carboidratos não fibrosos (kg.kg<sup>-1</sup>); NDT- Nutrientes digestíveis totais (kg.kg<sup>-1</sup>)  
 1-  $Y = 106,49 + 1,68X$   $R^2 = 0,4813$ ; 2-  $Y = 4,71 + 0,28X$   $R^2 = 0,3209$ ; ns - não significativo

Houve efeito (P<0,05) dos níveis de PB sobre a digestibilidade ruminal da PB, com aumento de 1,68 unidades para cada unidade percentual de aumento na ingestão de PB. Embora tenha havido aumento no fluxo omasal da proteína (P<0,05) com o aumento nos teores de PB na dieta, no menor nível de PB o fluxo omasal foi maior que a quantidade ingerida e nos demais teores de PB o fluxo de PB para omaso foi menor em relação ao ingerido, o que significa perda de N na forma de amônia. Este aumento observado na digestibilidade ruminal da PB causado pelo incremento proteico nas dietas pode ser em razão do aumento na absorção de N amoniacal pelo epitélio do rúmen em

razão da menor relação energia:proteína da dieta, principalmente nos níveis de PB mais elevados.

Não foi observado efeito dos níveis de PB sobre a digestibilidade intestinal da PB ( $P>0,05$ ). Contudo, houve aumento linear ( $P<0,05$ ) na digestibilidade total da PB ocasionado pelo incremento na ingestão de PB uma vez que o fluxo fecal da PB ( $P>0,05$ ) foi semelhante entre as dietas. Estes resultados estão em acordo com Van Soest (1994) que demonstrou que teores de PB abaixo de  $70 \text{ g.kg}^{-1}$  na dieta refletem em alterações na digestibilidade, porém teor de PB acima desse valor não modifica este parâmetro.

Como supracitado, não houve efeito dos níveis de PB sobre cinética do líquido ruminal (Tabela 6).

Tabela 6. Dinâmica da fase líquida ruminal

Item	Nível de proteína ( $\text{g.kg}^{-1}$ )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
TP	10,79	13,05	11,52	12,46	ns	0,62	0,61	0,70	0,63
VR	79,38	79,34	79,22	80,09	ns	1,66	0,68	0,32	0,61
TR	9,76	8,39	8,83	8,06	ns	0,43	0,72	0,44	0,82
TF	8,41	10,23	9,16	9,97	ns	0,51	0,68	0,61	0,73
TRV	2,13	3,13	2,76	2,98	ns	0,15	0,61	0,70	0,63

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio;  $R^2$  - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; TP - Taxa de passagem ( $\text{h}^{-1}$ ); VR - Volume ruminal (L); TR - Tempo de reciclagem (h); TF - Taxa de fluxo ( $\text{L.h}^{-1}$ ); TRV - Taxa de reciclagem ( $\text{vezes.dia}^{-1}$ ); ns – não significativo.

A taxa de passagem de líquido, taxa de fluxo e taxa de reciclagem não diferiu entre as dietas e o volume ruminal representou 22% do PV das búfalas, valor ligeiramente acima do que é considerado ideal para bovinos, o qual varia de 15 a 21 % do PV (Owens & Goestch, 1988).

Alterações na taxa de passagem da fase líquida estão diretamente relacionadas a modificações na síntese de proteína microbiana (Silva, 2011). Da mesma forma, Isaacson et al. (1975) verificaram que, à medida que aumentava a taxa de passagem da fase líquida, aumentava-se também a quantidade de proteína microbiana sintetizada por unidade de carboidrato fermentado.

Essas afirmações estão em acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pois, muito embora os níveis de PB tenham influenciado a produção microbiana a taxa de diluição e a eficiência de síntese microbiana não sofreram efeito das dietas (Tabela 7).

Stern & Hoover (1979), afirmaram que, para o crescimento microbiano, são necessários 27g de N.kg<sup>-1</sup> de MODR. Para os níveis de 70 e 90 g.kg<sup>-1</sup> de PB foi observado valor um pouco abaixo, 20 e 25 g de N.kg<sup>-1</sup> de MODR, respectivamente, e para os maiores níveis de PB, 110 e 130 g.kg<sup>-1</sup>, os valores estão acima do exigido (31,5 e 37,5 g de N.kg<sup>-1</sup> de MODR). Sob esta perspectiva, Clark et al. (1992) afirmaram que, quando a concentração de amônia no fluido ruminal é maior que 2 a 5 mg.100mL<sup>-1</sup>, a passagem de N microbiano para o intestino está mais correlacionada à MODR que às concentrações de amônia no fluido ruminal. Considerando que a concentração de amônia no rúmen se encontrava igual ou acima do limite mínimo necessário para não restringir o crescimento microbiano, a ausência de efeito dos níveis de PB da dieta sobre a eficiência de síntese (expressa em relação à ingestão de NDT e a MODR), ocorreu devido à suposta falta de energia disponível no ambiente ruminal. Esta hipótese tem suporte nos dados de ingestão de NDT que foram influenciados pelas dietas, diminuindo a proporção deste com a ingestão de PB, à medida que houve incremento da PB na dieta.

Tabela 7. Eficiência de síntese de proteína microbiana

Item	Nível de proteína (g.kg <sup>-1</sup> )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
VU (L.dia <sup>-1</sup> )	2,44	2,43	2,75	3,04	ns	0,15	0,25	0,07	0,52
AcU (mmol.dia <sup>-1</sup> )	0,74	1,12	0,69	0,64	ns	0,13	0,56	0,53	0,42
ALA (mmol.dia <sup>-1</sup> )	23,08	33,90	34,48	34,74	1	1,30	<0,01	<0,01	0,50
DP (mmol.dia <sup>-1</sup> )	58,29	84,70	96,83	107,1	2	6,69	0,02	<0,01	0,32
Pur. Abs(mmol.dia <sup>-1</sup> )	53,89	75,20	86,89	93,56	3	5,59	0,01	<0,01	0,26
N mic (g.dia <sup>-1</sup> )	39,18	54,70	63,17	68,02	4	4,06	0,01	<0,01	0,26
PB mic (g.dia <sup>-1</sup> )	244,8	342,0	394,8	425,2	5	25,40	0,01	<0,01	0,26
gN.KgMODR <sup>-1</sup>	20,52	25,80	31,48	37,46	ns	5,63	0,02	0,04	0,36
ESPM NDT	74,66	82,70	87,35	92,03	ns	0,36	0,15	0,33	0,89
ESPM MODR	77,84	85,80	81,50	104,1	ns	0,34	0,11	0,24	0,54

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; VU – volume urinário; ALA – alantoína; AcU – ácido úrico; DP – derivativos purina; Pur. abs – purinas absorvidas; N mic – nitrogênio microbiano; PB mic – proteína bruta microbiana; gN.Kg<sup>-1</sup>MODR – Ingestão de nitrogênio (g) por Kg de matéria orgânica degradada no rúmen; ESPM NDT – eficiência de síntese de proteína microbiana (g PB microbiana.kg<sup>-1</sup> de NDT consumido); ESPM MODR – eficiência de síntese de proteína microbiana (g PB microbiana.kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica degradada no rúmen); 1- Y = 13,72 + 1,78X R<sup>2</sup> = 0,6210; 2- Y = 7,45 + 7,92X R<sup>2</sup> = 0,4674; 3- Y = 12,02 + 6,73X R<sup>2</sup> = 0,4555; 4- Y = 8,73 + 4,75X R<sup>2</sup> = 0,4555; 5- Y = 54,62 + 4,70X R<sup>2</sup> = 0,4555; ns – não significativo.

O aumento dos níveis de PB na dieta provocou efeito linear crescente para a excreção de alantoína e derivativos de purina na urina (P<0,05), como também houve

tendência ( $P=0,07$ ) de aumentar o volume urinário, o que sugere desperdício de nitrogênio e gasto de energia para teores de PB acima das exigências do animal. Pereira (2007), observou o mesmo efeito no volume urinário dos búfalos ao alimentá-los com dietas contendo níveis crescentes de concentrado e, conseqüentemente, de PB.

Segundo Kitamura et al. (2010), os rins têm um papel importante na eliminação da amônia do organismo; Foi conduzido um experimento no qual foram induzidas intoxicações por amônia em bovinos, utilizando cloreto de amônio, e observou relação positiva entre a administração do cloreto de amônio e a produção de urina. Além disso, os animais que foram expostos à intoxicação por amônia produziram, em média, 10L de urina a mais que os animais do tratamento controle, sugerindo que o organismo animal aumenta a produção de urina quando há excesso de amônia no organismo, como um mecanismo de defesa para tentar evitar que ocorra intoxicação.

Houve efeito linear crescente ( $P<0,05$ ) dos níveis de PB sobre a concentração média de N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal, ureia no soro e proteínas totais no soro (Tabela 8). As concentrações de N-NH<sub>3</sub> do líquido ruminal e de uréia no soro apresentaram comportamento linear crescente, uma vez que a quantidade de amônia produzida no rúmen é proporcional à quantidade de ureia formada no fígado (Van Soest, 1994) e, conseqüentemente, tem relação com a concentração de ureia plasmática, todos esses parâmetros estão diretamente relacionados ao aporte proteico da dieta. Neste estudo, o valor médio obtido para o menor teor de PB foi de 5,1 mg de N-NH<sub>3</sub>.100 mL<sup>-1</sup>. Portanto, o aporte proteico das dietas, provavelmente, não foi o limitador do crescimento microbiano, como já discutido anteriormente.

De acordo com a equação de regressão, para cada unidade percentual de aumento da PB da dieta, houve aumento de 0,75 unidades na concentração de N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal, 0,01 unidades na concentração de proteínas totais no soro e 4,86 unidades na concentração de ureia no soro.

Geralmente os metabólitos sanguíneos mais utilizados para avaliar o perfil metabólico proteico são as proteínas totais, ureia e albumina. A albumina é considerada um indicador mais sensível para avaliar o status proteico dos animais, porém suas respostas se dão a longo prazo (Contreras, 2000). Assim, a análise de albumina não se ajustaria ao modelo experimental e aos objetivos do trabalho. Entretanto as concentrações de proteínas totais também são relacionadas com a ingestão de proteína e suas respostas se dão em curto prazo. Franzolin (2001) observou valores médios de proteínas totais no soro de bubalinos de 7,85 g.dL<sup>-1</sup>; Do mesmo modo, Gomes (2010)

selecionou 125 búfalos criados no estado de São Paulo para avaliar os seus constituintes bioquímicos e obteve valores médios variando de 6,8 a 8,6 g.dL<sup>-1</sup>.

Dessa forma, as concentrações proteínas totais e ureia obtidas estão dentro dos valores de referência, exceto para o tratamento com 70 g.kg<sup>-1</sup> de PB, que ficou um pouco abaixo, o que permite supor que o organismo animal estaria em desequilíbrio proteico. Entretanto, não foi observado prejuízo ao desempenho animal, uma vez que em nenhum tratamento as búfalas perderam peso, entretanto deve ser levado em conta o curto período de tempo que os animais ficaram expostos às dietas, à fase fisiológica dos animais, que estavam em crescimento, e ao confinamento imposto.

Tabela 8. pH ruminal, concentração de amônia (N-NH<sub>3</sub>) no líquido ruminal e parâmetros sanguíneos.

Item	Nível de proteína (g.kg <sup>-1</sup> )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
N-NH <sub>3</sub> (mg.dL <sup>-1</sup> )	5,10	6,72	9,27	13,39	1	0,51	< 0,01	< 0,01	0,34
pH	6,60	6,59	6,61	6,63	ns	0,02	0,98	0,57	0,86
PPT (g.dL <sup>-1</sup> )	6,50	7,40	7,40	7,40	2	0,01	< 0,01	< 0,01	0,37
Ureia soro (mg.dL <sup>-1</sup> )	8,80	20,73	29,90	38,19	3	0,01	< 0,01	< 0,01	0,59

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; N-NH<sub>3</sub>- Nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, PPT- proteínas totais no soro sanguíneo; 1-  $Y = 2,82 + 0,75X$  R<sup>2</sup> = 0,9682; 2 -  $Y = 0,58 + 0,01X$  R<sup>2</sup> = 0,3638; 3-  $Y = 24,26 + 4,86X$  R<sup>2</sup> = 0,8311; ns- não significativo.

Não houve efeito (P>0,05) dos níveis de PB sobre o pH ruminal (Tabela 8 e Figura 1). Os dados observados para pH apresentaram comportamento quadrático ( $pH = 0,0056h^2 - 0,034h + 6,61$ , R<sup>2</sup>= 0,5366), e o valor mínimo estimado foi de 6,52 observado 2,80 horas após a alimentação.

Fisiologicamente, o pH do fluido ruminal pode variar de 5,5 a 7,4 dependendo do tipo de alimentos ingeridos, da forma como esses são ofertados e do tempo de coleta do fluido ruminal após a última refeição. É uma informação que pode ser utilizada com facilidade para diagnosticar alterações que ocorreram no ambiente ruminal.

Segundo Valadares Filho & Pina (2011), pH abaixo da faixa de 6,0 pode inibir as bactérias fermentadoras de celulose e diminuir significativamente a eficiência de síntese de proteína bruta microbiana.

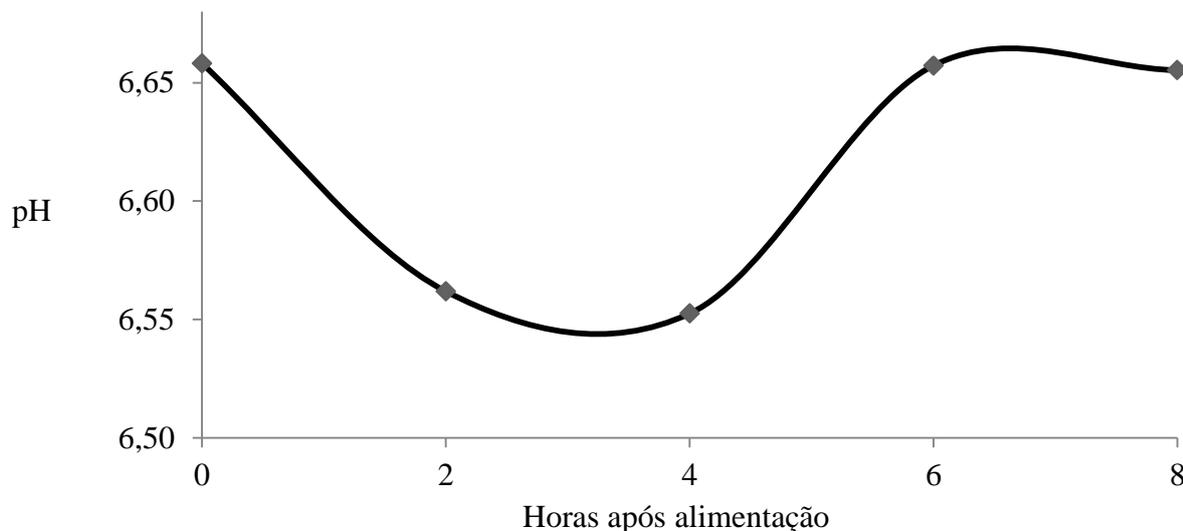


Figura 1. pH do líquido ruminal em função de horas após a alimentação

Esse fato ocorre devido à sensibilidade dos microrganismos fibrolíticos ao ambiente ácido. O pH ótimo para atividade das celulases é de 6,8, podendo variar 0,5 unidades, sem causar grandes prejuízos. Portanto, os valores de pH obtidos não prejudicou a fermentação ruminal, e tampouco a digestão da fração fibrosa da dieta.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos níveis de PB sobre a concentração de amônia ( $N-NH_3$ ) do líquido ruminal (Figura 2). A dieta contendo  $70 \text{ g.kg}^{-1}$  de PB apresentou valor mínimo de  $3,95 \text{ mg.100mL}^{-1}$  antes do fornecimento da alimentação, valor pouco abaixo do recomendado por Satter & Slyter (1974), que é de  $5 \text{ mg.100mL}^{-1}$  para que não haja limitação da síntese microbiana. Entretanto, considerando que a amônia é rapidamente absorvida pelo epitélio ruminal, ou fixada pelos microrganismos e essa concentração foi observada antes do fornecimento da alimentação, é plausível que a concentração de  $N-NH_3$  se encontrasse baixa.

Outrossim, Pradhan (1997), verificou que a bactéria ruminal *Prevotella ruminicola*, responsável pela rápida clivagem de peptídeos, não foi encontrada ou esteve presente em pequena quantidade em búfalos, o que pode explicar as baixas concentrações de  $N-NH_3$  observadas, principalmente para os maiores níveis de PB.

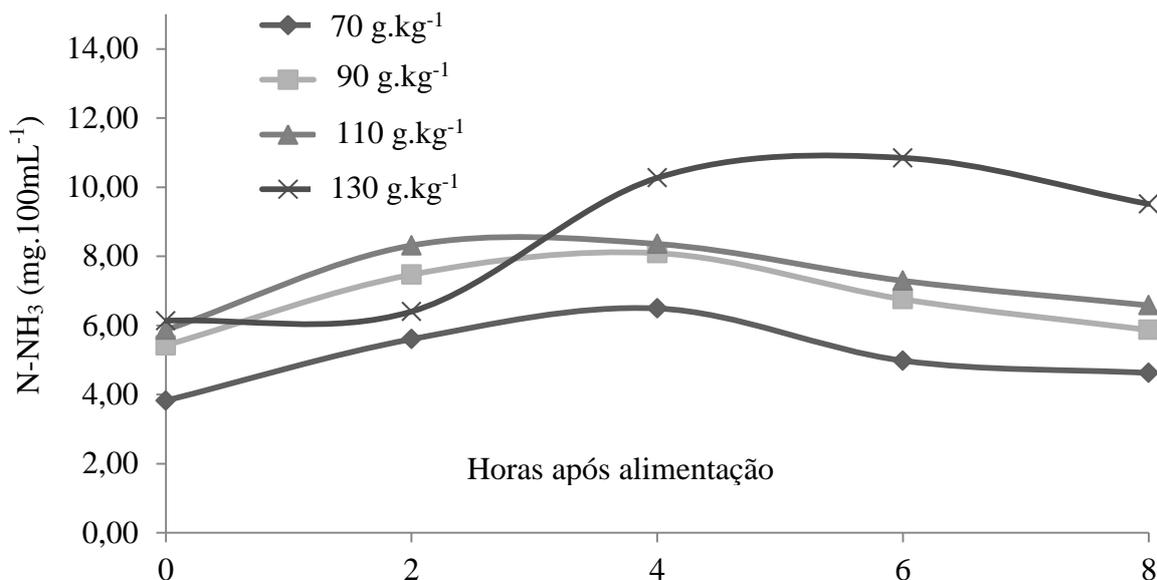


Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) em mg.100mL<sup>-1</sup> no líquido ruminal em relação ao tempo após a alimentação em função dos tratamentos.

Houve efeito ( $P < 0,01$ ) dos níveis de PB sobre a ingestão de N, o mesmo efeito ocorreu na excreção de N na urina e também nas fezes, quando expressos em g.dia<sup>-1</sup> (Tabela 9).

Tabela 9. Balanço de compostos nitrogenados

Item	Nível de proteína (g.kg <sup>-1</sup> )				ER	EPM	P		
	70	90	110	130			PB	L	Q
Quantidade de N (g.dia <sup>-1</sup> )									
NIPM	0,79	1,17	1,46	1,80	1	1,46	< 0,01	0,04	0,24
NI	63,60	99,20	125,6	153,6	2	8,96	< 0,01	< 0,01	0,34
NF	22,05	30,47	30,92	36,44	3	1,86	0,01	< 0,01	0,51
NU	8,14	22,98	34,07	43,63	4	3,65	< 0,01	< 0,01	0,45
BN	33,40	45,75	60,61	73,52	5	4,30	< 0,01	< 0,01	0,94
NU:NF	0,37	0,75	1,10	1,10	6	2,54	< 0,01	< 0,01	0,49
Quantidade de N (g.kg <sup>-1</sup> ingerido)									
NF	346,7	307,1	246,1	237,2	ns	1,93	0,09	0,12	0,21
NU	128,0	231,7	271,2	284,0	7	6,53	0,02	0,03	0,32
BN	519,6	462,2	480,6	479,7	ns	1,21	0,48	0,40	0,31

ER- Equação de regressão; EPM – Erro padrão médio; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; P - Efeito geral dos níveis de PB; L - Efeito linear; Q - Efeito quadrático; NIPM – Nitrogênio ingerido(g.kg<sup>-1</sup>PV<sup>0,75</sup>); NI- Nitrogênio ingerido, NF - Nitrogênio fecal, NU- Nitrogenio urinário, BN- Balanço de nitrogênio; NU:NF – Relação entre nitrogênio urinário e nitrogênio fecal; 1 – Y = 0,42 + 0,17X R<sup>2</sup>= 0,9420; 2 – Y = 37,70 + 1,48X R<sup>2</sup> = 0,9114; 3 – Y = 8,16 + 2,18X R<sup>2</sup> = 0,4576; 4 – Y = 31,57 + 5,67X R<sup>2</sup> = 0,8617; 5 – Y = 6,76 + 1,42X R<sup>2</sup> = 0,8209; 6 – Y = 0,62 + 0,15X R<sup>2</sup> = 0,5690; 7 – Y = 2,55 + 2,54X R<sup>2</sup> = 0,5972; ns- não significativo

Quando os valores são expressos em relação à ingestão dos compostos nitrogenados, a excreção de N via urina, sofreu aumento linear, já a excreção fecal sofreu decréscimo com aumento dos teores de PB na dieta, da mesma forma, as razões observadas entre o N excretado na urina e nas fezes apresentaram variações de 0,37 a 1,10:1. Segundo Van Soest (1994), aumentos na ingestão de N estão associados à maior produção de ureia no fígado e à maior excreção de ureia via urina, enquanto o baixo teor de ingestão de N acarreta na redução da excreção de ureia através da urina para manutenção do *pool* de ureia plasmático, que está sob controle fisiológico homeostático.

Os efeitos observados na excreção de N refletiram em aumento no balanço de nitrogênio, quando expressos em  $\text{g.dia}^{-1}$ . Porém, este efeito ( $P>0,05$ ) não foi observado quando os valores foram expressos em relação à quantidade ingerida, sugerindo que ocorreu maior conservação dos compostos nitrogenados quando se utiliza dietas com menores concentrações de PB, uma vez que dietas com níveis elevados de PB ocasionam maior perda de compostos nitrogenados via urina.

O aumento do balanço de N, expresso em  $\text{g.dia}^{-1}$ , foi de 1,42 unidades para cada unidade percentual de aumento na ingestão de PB. Estes resultados estão de acordo com Tatsapong et al. (2010), que trabalharam com bubalinos em crescimento, com peso corporal médio de 209 kg, recebendo dietas com níveis crescentes de PB (50, 70, 90 e 110  $\text{g.kg}^{-1}$ ). Também Verás et al. (2007), que trabalharam com bovinos recebendo dietas contendo 70; 100,130 e 150  $\text{g.kg}^{-1}$  de PB e Pereira et al. (2007), que trabalharam com bubalinos e bovinos, recebendo dietas contendo 80; 110; 140 e 170  $\text{g.kg}^{-1}$  de PB, observaram aumento linear nos dados de balanço de compostos nitrogenados com o acréscimo PB dietética, devido a maior ingestão de N na dieta.

A exigência de proteína para manutenção é igual às perdas inevitáveis de proteína por descamação, perdas na urina e nas fezes. Apesar da excreção do N elevar-se com o aumento de N ingerido, apenas parte destas perdas são relacionada às perdas endógenas.

A Figura 3 apresenta a exigência líquida de proteína para manutenção que foram obtidas como sendo o intercepto da regressão entre o balanço de nitrogênio e o nitrogênio consumido. Multiplicando-se o valor de 0,4809 por 6,25, obteve-se o valor de 3,0  $\text{g PB.PV}^{-0,75}$ .

Para converter as exigências líquidas de proteína em exigência de proteína metabolizável para manutenção de bubalinos em crescimento, nas condições brasileiras de produção, utilizou-se o fator 0,648, que foi obtido através da relação entre o nitrogênio retido e nitrogênio absorvido (Figura 4). Esse valor está de acordo com o recomendado

pele NRC (2000) que é de 0,64 a 0,80. Portanto, o teor de PM para manutenção foi igual a  $4,63\text{g PB.PV}^{-0,75}$  ou  $0,75\text{g N.PV}^{-0,75}$ , que, nas condições deste experimento, equivale a aproximadamente  $60\text{ g.kg}^{-1}$  de PB na dieta.

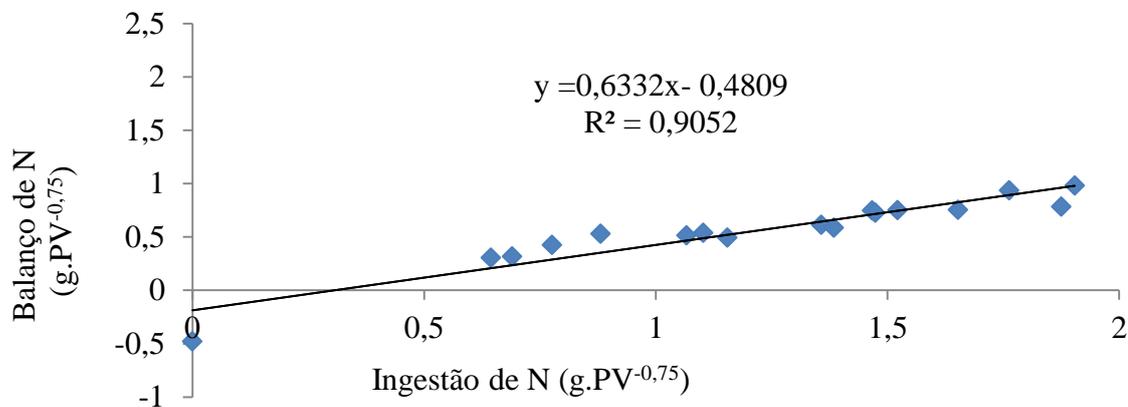


Figura 3. Relação entre balanço de N e ingestão de N.

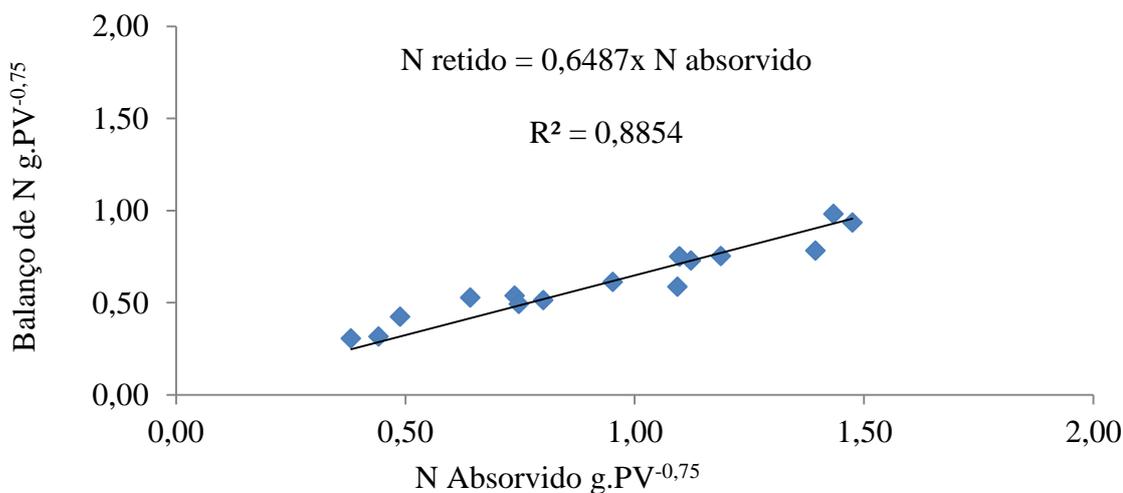


Figura 4. Relação entre balanço de N e N absorvido.

Estes valores são semelhantes aos observados por Tatsapong (2010) para bubalinos em crescimento, e muito próximos aos valores sugeridos por Paul & Lal (2010), de aproximadamente  $4,95\text{ g PB.PV}^{-0,75}$  para bubalinos em crescimento. Entretanto, Kearl (1982) reuniu informações acerca das exigências nutricionais de búfalos e obteve valores médios para exigência de PB de  $5,22\text{gPB.PV}^{-0,75}$ , 12% maior que os valores obtidos. Essa diferença pode ser explicada pelo pequeno número de animais avaliados por Kearl (1982), e também pelo fato de as exigências de proteína

para a manutenção dos animais serem dependentes das condições climáticas, raça, tamanho corporal, composição do tecido corporal, qualidade da alimentação e da taxa de crescimento (Marai & Haeeb, 2009).

### **Conclusão**

O aumento do nível de proteína na dieta aumenta a ingestão de matéria seca e nutrientes sem alterar a digestibilidade; com exceção da digestibilidade total da proteína, das perdas de N amoniacal no rúmen e da excreção de nitrogênio fecal e urinário, que aumentam com o incremento proteico das dietas.

O balanço de nitrogênio foi semelhante para todos os níveis de PB quando expressos em relação à ingestão de N, sugerindo que os búfalos são eficientes na utilização do nitrogênio.

A exigência de PB para manutenção estimada para búfalas em crescimento foi de  $4,63 \text{ g de PB.kgPV}^{-75}$  que corresponde a  $60 \text{ g.kg}^{-1}$  de PB na dieta.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, T. C. **Desenvolvimento ponderal, características da carcaça e eficiência da nutrição energética e protéica no metabolismo ruminal de búfalos e produção de gases *in vitro***. 2010. 146f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- AOAC, 1990. **Official Methods of Analysis**. 15th ed, AOAC, Washington, DC, USA.
- CHEN, X.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. Bucksburn: **Rowett Research Institute**, 21p. 1992.
- CHEN, X. B.; SAMARAWEEERA, L.; KYLE, D. J. et al. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine special reference to differences between buffaloes and Bos taurus cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 397-407, 1996.
- 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, p.2304-2323, 1992.
- CONTRERAS, P.A; PHIL, M. Indicadores do metabolismo proteico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLES, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. **Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, p.23-30, 2000.
- DIPU, M. T.; GEORGE, S. K.; SINGH, P.; et al. Measurement of microbial protein supply in Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*) using urinary purine derivatives excretion and PDC Index. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, V.19, n. 3, p.347-355, 2006.
- FERNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.249-251, 1965.
- FRANZOLIN, R.; SILVA, J.R.; OCAMPOS, D. Níveis de Energia na Dieta para Bubalinos em Crescimento Alimentados em Confinamento: Desempenho e Bioquímica de Nutrientes Sanguíneos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 6, p. 1872-1879, 2001.
- GOMES, V.; MADUREIRA, K.M.; BLAGITZ, M.G.; GALDINO, J.; VANTIM, G.; BENESI, F.J. Valores de Referência e influência do fator etário sobre os parâmetros bioquímicos utilizados para avaliação da função hepática de bubalinos hípidos da raça Murrah. **Ars Veterinária, Jaboticabal**. v. 26, n.3, p. 128-131, 2010.
- GONÇALVES, L.C.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. **Alimentação de gado de leite**. Belo Horizonte, FEPMVZ editora, 412p, 2009.

- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen** . Gainesville: University of Florida, p.A-25 (Bulletin, 339), 2000.
- ISAACSON, H. R.; HINDS, F. C.; BRYANT, M. P.; OWENS, F. N. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n.11, p. 1.645-1.659, 1975
- KEARL, L.C. **Nutrient Requirements of Ruminants in Developing Countries**. International Feedstuffs Institute, Utah Agricultural Experiment Station, Utah State, 1982.
- KITAMURA, S.S.; ANTONELLI, A.C.; MARUTA, C.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; MORI, C.S.; YONEZAWA, L.A.; MICHIMA, L.E.S.; SOARES, P.C.; ORTOLANI, E.L. Avaliação laboratorial do uso de solução salina hipertônica e isotônica e de furosemida no tratamento da intoxicação por amônia em bovinos. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**, v.40, n. 8, p. 1779-1785, 2010.
- LEÃO, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; AZEVEDO, J.A.G. Técnica de coleta de digesta omasal para estudos de digestão parcial em bovinos. In: **Reunião Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 39. Recife, 2002. Anais... Recife: SBZ, CD ROM. Nutrição de ruminantes, 2002.
- MARAI, I.F.M .; A.A.M. HAEEB. Buffalo's biological function as affected by heat stress-A review. **Livestock Science.**, v. 127, n.2, p. 89-109, 2009.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.* 85, 1217–1240, 2002
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7 rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C.: 242p, 2000.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The ruminant animal digestive physiology and metabolism**. New Jersey: Prentice Hall. p.145-171, 1988.
- PAIXÃO, M.P.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I. Ureia 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.
- PAUL, S.S.; LAL, D. **Nutrient requirements of buffaloes**. Delhi: Satish Serial Publishing House, 2010. 137p
- PAUL, S.S. Nutrient requirements of buffaloes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, p. 93-97, 2011.

- PEREIRA, K. P.; VÉRAS, A.S.C.; FERREIRA, M.A.; BATISTA, A.M.V.; MARQUES, K.A.; FOTIUS, A.C.A. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.29, n.4, p.433-440, 2007.
- PRADHAN, K.; BHATIA, S.K.; SANGWAN, D.C. Feed consumption pattern, ruminal degradation, nutrient digestibility and physiological reactions in buffalo and cattle. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.2, p.149-151, 1997.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition, Cambridge**, v. 32, n. 2, p. 199-205, 1974.
- SENO, L.O.; ASPILUCUETA-BORQUIS, R.R.; MATOS, M.C.; MARTÍN, J.F.; TONHATI, H. **Estratégias de seleção na bubalinocultura leiteira**. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 10., 2013, Uberaba –MG.
- SILVA, J.J.; SALIBA, E.O.S.; AROEIRA, L.J.M.; RODRIGUÉZ, N.M.; SILVA, A.G.M. Indicadores de Cinética Ruminal em Vacas Holandês x zebu em Lactação. **Ciência Animal Brasileira, Goiania**, v. 12, n.1, p.1-7, 2011.
- STERN, M.D., HOOVER, W.H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. **Journal of Animal Science**, v.49, n.6, p.1590-1603, 1979.
- TATSAPONG, P.; PEANGKOUM, P.; PIMPA, O.; HARE, M. D. Effects of Dietary Protein on Nitrogen Metabolism and Protein Requirements for Maintenance of Growing Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Calves. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n.8, p. 1216-1222, 2010.
- UDEN, P., COLUCCI, P.E., VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. **Journal of Science of Food Agriculture**, v.31, p. 625-632. 1980.
- VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D. S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. 2ed. **Nutrição de Ruminantes**. FAPESP: Jaboticabal, SP, 2011. p.161-189.
- VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M.; SAMPAIO, I.B.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 1. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1252-1258, 1997.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. London: Comstock Publishing Associates, 1994. 476p.
- VÉRAS, R.M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; RENNÓ, L.N.; PAULINO, P.V.R.; SOUZA, M.A. Balanço de compostos nitrogenados e estimativa das exigências de proteína de manutenção de bovinos Nelore de três condições sexuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p. 1212-1217, 2007.

VIEIRA, D.M.; MACLEOD, G.K.; BURTON, J.H. Nutrition of the weaned Holstein calf.0020II. Effect of dietary protein level on nitrogen balance, digestibility and feed intake. **Journal of Animal Science**, v.50, p.945-951, 1980.

WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: **Cornel Nutrition Conference for Feed Manufacturers**. Proc, Ithaca: Cornell University. 61, 176-185, 1999.

WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; IISMA, O. The determination of chromic oxide in feces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agricultural Science**. v.59, p.381-385, 1962.