TIAGO ANTÔNIO DEL VALLE

**Metabolismo de nitrogênio e de ácidos nucleicos de vacas leiteiras
alimentadas com lipídios**

Pirassununga

2018

TIAGO ANTÔNIO DEL VALLE

**Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em
vacas leiteiras alimentadas com lipídios**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção de Ruminantes

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Pirassununga

2018

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3686
FMVZ

Del Valle, Tiago Antônio
Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com lipídios / Tiago Antônio Del Valle. – 2018.
107 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Proteína microbiana. 2. Purinas. 3. Salis de cálcio. 4. Urina. 5. 15N. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Metabolismo de nitrogênio e de ácidos nucleicos de vacas leiteiras alimentadas com lipídios", protocolada sob o CEUA nº 8785220917, sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Tiago Antonio Del Valle** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/12/2017.

We certify that the proposal "Nitrogen and nucleic acids metabolism in dairy cows fed with lipid source", utilizing 8 Bovines (8 females), protocol number CEUA 8785220917, under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Tiago Antonio Del Valle** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/06/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2017** a **12/2017**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 9 anos**

N: **8**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **580 a 710 kg**

Resumo: A nutrição proteico-energética de ruminantes apresenta-se como principal fator gerador de custo da alimentação de ruminantes. Especial interesse tem-se dado ao estudo do metabolismo ruminal do nitrogênio em vacas leiteiras, haja visto os custos das fontes proteicas nas dietas. No entanto, as técnicas de avaliação do metabolismo proteico ruminal e especialmente de estimativa da síntese proteica microbiana tem sido questionadas, principalmente pelas dificuldades encontradas para estimativa do fluxo pós ruminal de aminoácidos. Por outro lado, a suplementação lipídica tem se tornado uma realidade para facilitar o atendimento das exigências energéticas de vacas de alta produção. A literatura é escassa de informações a respeito do metabolismo ruminal do nitrogênio e especialmente do metabolismo pós absorção dos ácidos nucleicos, quando fontes lipídicas são adicionadas a dieta de vacas leiteiras. Alguns trabalhos sugerem redução da degradabilidade da proteína da dieta e da síntese microbiana, com aumento da eficiência de síntese, quando fontes lipídicas são utilizadas na dieta. Além disso, com a alteração do metabolismo, em decorrência do aumento da densidade energética da dieta e da concentração sérica de colesterol, pode haver alteração da turnover proteico e da síntese de ATP celular, podendo levar a alterações no metabolismo dos ácidos nucleicos, alterando a composição dos compostos excretados na urina e a contribuição endógena dos derivados purina excretados. O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da suplementação lipídica de dietas isonitrogenadas contendo diferentes proporções de proteína degradável no rúmen sobre o desempenho produtivo, fermentação ruminal, digestibilidade aparente total e o fluxo de proteína microbiana, estimado através do fluxo abomasal de purinas ou 15N e da recuperação urinária de derivados purina. Pretende-se ainda calcular a relação entre purinas e N total dos microrganismos ruminais e os fatores de recuperação dos derivados na urina, assim como a contribuição endógena para a excreção urinária de derivados purina.

Local do experimento: As vacas serão alojadas em um confinamento adaptado do tipo tie stall, contendo camas individuais de maravalha de madeira com dimensões de 2,5 x 2,5 m (6,25 m²). Todos os procedimentos serão realizados nesta instalação, com exceção da ordenha que será realizada em instalação apropriada, localizada ao lado do referido confinamento.

São Paulo, 06 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DEL VALLE, Tiago Antônio

Título: Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com lipídios

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por permitir que esta jornada fosse possível.

À minha família, que tem me apoiado muito, especialmente nos momentos mais difíceis. Meus pais, Celina e João Carlos, pelo apoio incondicional e por ser quem sou.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (processo 2016/02855-1) e do auxílio ao projeto (2016/11760-4), que foram fundamentais para que a realização deste estudo fosse possível.

Aos colegas de pós-graduação que fizeram esta caminhada um tanto quanto mais agradável. Em especial àqueles que me ajudaram de maneira indescritível durante a condução do experimento. Não tenho palavras para descrever àquilo que eu jamais havia visto tomar tal proporção: Elissandra Zilio, Lucas Ghizzi, Júlia Marques, Johnny Souza, Mauro Sérgio, Tássia Barrera, Larissa Gheller, Guilherme Gomes e Nathália Trevisan.

Ao amigo e técnico da Universidade Federal de Viçosa, Joelcio de Paula Fialho, por toda a ajuda durante a realização das coletas omasais.

À minha namorada e companheira desta e de tantas outras batalhas, Elissandra Zilio. Esta foi fundamental em todas as partes deste projeto, colaborando de maneira ímpar para a realização deste.

A todos os ex-colegas pós graduandos: Jefferson Gandra, Elmeson Ferreira de Jesus, Rafael Barletta, Vitor Bettero, Pablo de Paiva, Gustavo Almeida, Cybele Araújo, Rodolfo Mingoti, Caio Takiya, Filipe Zanferari, Rodrigo Gardinal, Gustavo Calomeni, Thiago Silva, Thiago Vendramini, José Ésler, Lenita Verdurico, Tiago Menezes, que tanto contribuíram para a minha formação.

Aos IC's e estagiários, que se tornaram grandes amigos ao longo destes anos de pós-graduação. Aqueles que me ajudaram diretamente durante a realização do experimento: Lucas Sakamoto, Alanne Tenório, Eduardo Grolli, Any Zollet, Liniker Nunes, Amanda Silva, Beatriz Giordano, Felipe Benfatti, Gabriel Faria, Beatriz Gomes. Apesar de correr o risco de cometer injustiças, alguns nomes não podem deixar de ser citados: Artur Costa, Dado Consentini, Jesus Osório e Guilherme Cabral.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite e ao Prof. Francisco Palma Rennó, por possibilitarem toda infraestrutura necessária e ainda permitirem e incentivarem o desenvolvimento de novas metodologias e práticas. Ainda ao Prof. Francisco Rennó, por toda a confiança depositada nestes sete anos. Com certeza, chego a este estágio muito amadurecido e mais preparado para a vida em função de seus ensinamentos e das inúmeras oportunidades oferecidas. Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite por todo o auxílio durante toda esta jornada: Diogo Martinelli, Lucas,

Carlos Schmidt, Denis, Marcos José, Lupercio Marchetti (Toco), Fernandes Marques, Wilson, Mairo (Bigode).

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Agradeço aos professores e aos secretários (João Paulo, Alessandra e Fábria) por todo o conhecimento e disponibilidade.

Aos Funcionários e Docentes do Departamento de Biotecnologia e Produção Animal e Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. Além de permitirem que eu iniciasse esta jornada, conciliando as atividades com o de professor substituto naquela instituição, sempre tiveram imensa proximidade, deixando a universidade de portas abertas. Gostaria de agradecer de maneira especial ao Prof. Dr. Jozivaldo Moraes e à Dra. Mariana Campana pela amizade, confiança e disponibilidade: sem dúvidas, me ajudaram muito no meu crescimento profissional e pessoal. Ainda, gostaria de agradecer à Profa. Dra. Luciana Dias, ex-chefe de departamento, colega de disciplina, conselheira e amiga. Aos demais colegas professores do DBPVA/CCA/UFSCAR, à Varlene Gaspari e à Profa. Dra. Janaína Della Torre por todo o apoio.

Aos Me. Luiz Felipe Mattos e ao Prof. Reinaldo Bastos, da UFSCar-Araras, por abrirem seu laboratório e colaborarem significativamente para a realização deste e outros trabalhos.

À Cargill, pela doação do *Soypass* utilizado durante o estudo.

Ao "Centro de Isótopos Estáveis Professor Carlos Ducatti" do Instituto de Biociências da UNESP Botucatu; ao Prof. Dr. Vladimir Costa e ao técnico Evandro Tadeu, por todos os esclarecimentos e pela realização das análises de ^{15}N .

Ao Laboratório de Instrumentação Nuclear, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP; ao técnico Eduardo Almeida e ao Prof Dr. Hudson Carvalho, pelas avaliações de Co e Yb.

À república Colmeia e todos que aqui viveram e compartilharam o dia-a-dia: Jefferson, Rafael, Elmeson, Gustavo, Pablo, Vicente, Ceará, Alexandre, Juliana, Julia, Igor, Vitinho, Toddynho (Gustavo) e Colombia (Jesus).

A todos aqueles que não colaborando diretamente, enviaram boas vibrações e que de uma forma ou outra, souberam ouvir-nos e dar sua contribuição indireta.

RESUMO

DEL VALLE, T. A. Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com lipídios (Nitrogen, nucleic acids and fatty acids metabolism in dairy cows fed fat diet). 2018. 107 p. Tese de doutorado (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) e de diferentes teores de proteína degradável no rúmen (PDR) na dieta de vacas leiteiras sobre: consumo, fermentação e metabolismo de nitrogênio ruminal, desempenho produtivo e balanço de nitrogênio; as estimativas de síntese microbiana utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores microbianos, a composição dos *pellets* de bactéria, a recuperação de derivados purina (DP) na urina e a excreção urinária de DP de origem endógena; o fluxo omasal de ácidos graxos, a extensão de bio-hidrogenação e o perfil lipídico das bactérias. Oito vacas em lactação, multíparas e canuladas no rúmen foram usadas em um delineamento em quadrado Latino 4×4 replicado, distribuídas em arranjo fatorial 2×2 de tratamentos. Os tratamentos foram obtidos pela combinação da adição de SCAG (-SCAG: sem suplementação; e +SCAG: com 3,32% matéria seca (MS) de SCAG) e os teores de PDR (BPDR: baixo PDR, com 9,8% MS de PDR; e APDR: alto PDR: com 11,0% de PDR na MS da dieta). A suplementação lipídica reduziu ($P \leq 0,049$) o consumo, tendeu ($P = 0,076$) a aumentar o tempo de ruminação e aumentou ($P = 0,015$) o pH ruminal. A adição de SCAG diminuiu ($P \leq 0,013$) a digestibilidade aparente ruminal da MS e matéria orgânica, e tendeu a reduzir ($P = 0,096$) a digestibilidade ruminal da fibra em detergente neutro (FDN) e reduziu ($P = 0,043$) o nitrogênio (N) verdadeiramente digerido no rúmen. Apesar de afetar ($P = 0,039$) negativamente o fluxo de nitrogênio não amoniacal (NNA) associado com as grandes partículas, SCAG não afetou ($P \geq 0,634$) o fluxo total de NNA e o fluxo de NNA microbiano, e aumentou ($P = 0,032$) a eficiência de síntese proteica microbiana. Animais alimentados com SCAG apresentaram maior ($P = 0,043$) produção de leite, com menor ($P < 0,001$) teor de gordura, maior ($P < 0,001$) eficiência alimentar e de uso do N. Animais alimentados com BPDR tenderam ($P \leq 0,096$) a apresentar maior consumo de proteína bruta e relação entre as concentrações ruminiais de acetato e propionato. Ainda, APDR elevou ($P \leq 0,048$) a digestibilidade aparente total do amido e a digestibilidade ruminal verdadeira do N. O nível de PDR não afetou ($P \geq 0,719$) a síntese de proteína microbiana e a eficiência de síntese, enquanto que BPDR aumentou ($P \leq 0,055$) a produção de leite e reduziu o teor de proteína do leite. O alto nível de PDR tendeu ($P \leq 0,088$) a reduzir a excreção fecal e o balanço de N, enquanto aumentou ($P = 0,021$) a excreção urinária relativa ao consumo de N. As bactérias associadas à partícula (BAP) apresentaram menor ($P \leq 0,008$) enriquecimento com ^{15}N e relação N purinas: N total microbiano do que as bactérias associadas à fase líquida (BAL). A utilização de BP como indicador superestimou ($P \leq 0,002$) o fluxo microbiano, especialmente de BAL. No entanto, para o fluxo microbiano associado à partícula, houve tendência à interação ($P = 0,067$) entre os efeitos de indicador e da

suplementação lipídica. Na presença de SCAG, BP e ^{15}N apresentaram ($P > 0,05$) estimativas similares, enquanto que na ausência de SCAG, BP subestimou ($P \leq 0,05$) o fluxo de BAP, em relação ao ^{15}N . O aumento do nível de PDR da dieta tendeu a reduzir ($P = 0,061$) o fluxo omasal de BP e reduziu ($P = 0,007$) a recuperação urinária desta. A recuperação urinária de DP foi extremamente variável (33,9% de coeficiente de variação). As estratégias nutricionais avaliadas não afetaram ($P \geq 0,108$) a excreção urinária de creatinina e DP de origem endógena. As excreções diárias de creatinina e DP de origem endógena foram de 0,262 mmol/kg e 640 mmol/kg^{0,75}, respectivamente. O aumento do nível de PDR da dieta resultou na redução ($P < 0,001$) do consumo dos ácidos graxos C4:0, C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0, e tendeu ($P = 0,068$) a reduzir o consumo de C18:1 *trans*. Houve interação ou tendência ($P \leq 0,095$) à interação entre os efeitos do nível de PDR e adição de SCAG sobre o fluxo omasal de ácidos graxos totais e alguns ácidos graxos específicos (C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9 *cis*-12, C18:3 *cis* e C22:0). Nas dietas contendo SCAG, nenhum efeito do nível de PDR foi observado sobre o fluxo omasal de ácidos graxos ($P > 0,05$), enquanto que nas dietas -SCAG, o aumento do nível de PDR aumentou ($P \leq 0,05$) o fluxo omasal total de ácidos graxos. Consequentemente, o aumento do nível de PDR reduziu ($P \leq 0,05$) a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 *cis* e C18:3 nas dietas -SCAG, sem efeitos ($P > 0,05$) nas dietas +SCAG. A adição de SCAG aumentou ($P \leq 0,001$) a extensão de bio-hidrogenação do C18:2, assim como o teor de AG dos *pellets* de bactéria. O nível de PDR da dieta não afetou ($P \geq 0,116$) o perfil de ácidos graxos dos microrganismos, nem o perfil de ácidos graxos do leite. A adição de SCAG reduziu ou tendeu ($P \leq 0,080$) a reduzir os teores de C15:0, C16:0, C16:1, C17:0 e C18:0, e aumentou ($P \leq 0,005$) as concentrações de ácidos graxos insaturados de 18 carbonos nos microrganismos. Além disso, a adição de SCAG reduziu ($P \leq 0,009$) a concentração de todos os ácidos graxos menores do que 18 carbonos e a razão entre saturados e insaturados na gordura do leite, bem como aumentou ($P \leq 0,001$) as concentrações dos ácidos graxos com 18 carbonos ou mais e dos ácidos graxos insaturados. Desta forma, a adição de SCAG na dieta reduz o consumo, aumenta o tempo de ruminação, a eficiência microbiana e a produção de leite, sem afetar o fluxo microbiano. O aumento do nível de PDR da dieta reduz as perdas fecais de N e a produção de leite. As BP superestimam o fluxo microbiano, especialmente das BAL, pela presença de BP de origem dietética. A suplementação lipídica afeta a relação entre as estimativas de fluxo de BAP utilizando ^{15}N e BP, levando à baixa correlação entre as estimativas com as duas técnicas. A recuperação urinária dos DP foi extremamente variável e aumentou com o aumento do nível de PDR da dieta. As excreções de creatinina e a excreção endógena de DP não são afetadas pela suplementação lipídica e pelo teor de PDR da dieta. A suplementação lipídica afeta consideravelmente o consumo e fluxo omasal de ácidos graxos, assim como o perfil lipídico dos microrganismos e o perfil de ácidos graxos do leite. Apesar de potencialmente aumentar o fluxo de alguns ácidos graxos insaturados e reduzir a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 e C18:3, nas dietas sem SCAG, o nível de PDR tem poucos efeitos sobre o perfil de ácidos graxos das bactérias e do leite.

Palavras-chave: Proteína microbiana, purinas, sais de cálcio, urina, ^{15}N .

ABSTRACT

DEL VALLE, T. A. Nitrogen, nucleic acids and fatty acids metabolism in dairy cows fed fat diet (Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com lipídios). 2018. 107 p. Tese de doutorado (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

This study aimed to evaluate the effects of calcium salts of fatty acids (CSFA) addition and different levels of rumen degradable protein (RDP) in the diet of dairy cows on: feed intake, ruminal fermentation and nitrogen metabolism, productive performance and nitrogen balance; microbial protein synthesis estimates using ^{15}N and purines basis (PB) as microbial markers, composition of bacterial *pellets*, urinary recovery of purines derivatives (PD) and endogenous PD excretion; omasal flow of fatty acids (FA), the bio-hydrogenation extent and FA profile of bacteria. Eight lactating, multiparous and rumen cannulated cows were used in a replicated 4×4 Latin square design, with a 2×2 factorial arrangement of treatments. The treatments were obtained by the combination of CSFA addition (-CSFA: without supplementation, and +CSFA: with 3.32% CSFA per kg dry matter - DM) and the RDP level (LRDP: low RDP, with 9.8% MS of RDP, and HRDP, high RDP: with 11.0% RDP of diet DM). Fat supplementation reduced ($P \leq 0.049$) feed intake, while tended ($P = 0.076$) to increase rumination time, and increased ($P = 0.015$) ruminal pH. In addition, CSFA supplementation decreased ($P \leq 0.013$) DM and organic matter ruminal digestibility, and tended ($P \leq 0.096$) to reduce NDF ruminal digestibility, and reduced ($P = 0.043$) N truly digested in the rumen. Besides negative effect ($P = 0.039$) on non-ammonia nitrogen (NAN) associated with large phase, CSFA showed no effect ($P \geq 0.634$) on total NAN and microbial NAN flow, and increased ($P = 0.032$) microbial efficiency. Animals fed CSFA had higher ($P = 0.043$) milk yield, with lower ($P < 0.001$) fat content, and improved ($P < 0.001$) feed efficiency and N usage efficiency, in relation to those animals fed with non-supplemented diets. Animals fed LRDP tended to show higher ($P \leq 0.096$) CP intake, and acetate to propionate ruminal ratio, in relation to animals fed HRDP. In addition, HRDP increased ($P \leq 0.048$) starch total tract apparent digestibility and ruminal truly digestibility of N. The level of RDP showed no effect ($P \geq 0.719$) on microbial N synthesis and microbial efficiency, and lower RDP level increased ($P \leq 0.055$) milk yield and decreased milk protein content. Decreased RDP level tended ($P = 0.074$) to reduce N fecal excretion, and increased ($P = 0.021$) fractional urinary excretion. Particle-associated bacteria (PAB) showed lower ($P \leq 0.008$) enrichment with ^{15}N and purines N to total microbial N ratio, than liquid associated bacteria (LAB). Purine basis overestimated ($P \leq 0.002$) microbial flow, especially LAB flow. However, there was interaction ($P = 0.067$) between the effects of marker and lipid supplementation on PAB flow. In diets containing CSFA, PB and ^{15}N showed similar ($P > 0.05$) estimates, whereas in the absence of CSFA, PB underestimated ($P \leq 0.05$) PAB flow, in relation to ^{15}N . Increased dietary RDP levels tended ($P = 0.061$) to reduce omasal PB flow and decreased ($P = 0.007$) its urinary recovery. Urinary recovery of PD was extremely variable (33.9%

variation coefficient). Different evaluated factors had no effect ($P \geq 0.108$) on urinary excretion of creatinine, and PD of endogenous origin. Daily excretions of creatinine and endogenous PD were 0.262 mmol/kg and 640 mmol/kg^{0.75}, respectively. Higher RDP level resulted in reduced ($P < 0.001$) C4:0, C12:0, C14:0, C16:0 and C18:0 FA intake, and tended ($P = 0.068$) to reduce C18:1 *trans* intake. There was an interaction ($P \leq 0.095$) between effects of the RDP and CSFA on the omasal flow of total FA and some specific FA (C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9 *cis*-12, C18: 3 *cis* and C22:0). This interaction occurred due to the higher ($P \leq 0.05$) omasal flow as consequence of increased RDP level, in the diets without CSFA. In diets containing CSFA, no effect ($P > 0.05$) of the RDP level was observed on the omasal flow of FA. Consequently, the increase of RDP reduced ($P \leq 0.05$) the bio-hydrogenation extent of these FA in the diets -CSFA, with no effects ($P > 0.05$) on the diets +CSFA. The addition of CSFA increased ($P \leq 0.001$) C18:2 bio-hydrogenation extent, as well as FA content of bacterial *pellets*. Dietary level of RDP had no effect ($P \geq 0.116$) on microorganisms and milk FA profile. The addition of CSFA decreased or tended ($P \leq 0.080$) to decrease the levels of C15:0, C16:0, C16:1, C17:0 and C18:0 FA, while increased ($P \leq 0.005$) the concentrations of 18-carbon unsaturated fatty acids in the microorganisms. In addition, CSFA reduced ($P \leq 0.009$) the concentration of all FA lower than 18 carbons, saturated and unsaturated ratio in milk fat, and increased ($P \leq 0.001$) the concentrations of FA with 18 carbons or more, as well as unsaturated fatty acids. Thus, CSFA dietary addition decreases feed intake, increases rumination time, microbial efficiency, and milk yield. Higher level of RDP reduces N fecal losses and milk yield, and increases urinary losses of N. Purine basis overestimate microbial flow, especially LAB flow, by the presence of PB of dietary origin. Lipid supplementation affects the relationship between PAB flow estimates using ¹⁵N and PB, leading to a low correlation between the estimates with the two techniques. The urinary recovery of the PD was extremely variable and increased with the increase of the dietary RDP level. Creatinine excretions and endogenous excretion of PD are not affected by evaluated treatments. Lipid supplementation affects FA intake and omasal flow, as well as microorganisms and the milk FA profile. Although potentially increase the flow of some unsaturated FA and reduce the extent of bio-hydrogenation of C18:1 and C18:3 FA in the diets without CSFA, the level of RDP has no effects on microorganisms and milk FA profile.

Key words: Calcium salts, microbial protein, purines, urine, ¹⁵N.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Correlação entre as estimativas de fluxo de NNA microbiano obtidas utilizando a média da relação entre N purinas e N total microbiano e o valor observado para cada unidade experimental.	68
Figura 3.2 - Correlação entre as estimativas de fluxo de NNA aderido à partícula utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.	71
Figura 3.3 - Correlação entre as estimativas de fluxo de N microbiano total utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.....	71
Figura 3.4 - Correlação entre o volume urinário estimado usando a creatinina como indicador e os valores observados.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais	36
Tabela 2.2 - Consumo de matéria seca e nutrientes e fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	43
Tabela 2.3 - Fluxo omasal e digestibilidade aparente ruminal e no trato total da MS, MO, FDN e PB de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen.....	44
Tabela 2.4 - Metabolismo ruminal do nitrogênio em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	46
Tabela 2.5 - Produção e composição do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	47
Tabela 2.6 - Balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	48
Tabela 3.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais	61
Tabela 3.2 - Composição dos <i>pellets</i> de bactéria aderida à partícula e associada à fase líquida de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen.....	69
Tabela 3.3 - Comparação de ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores de fluxo microbiano em vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen.....	72
Tabela 3.4 - Excreção urinária de creatinina e derivados purina de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	74
Tabela 4.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais	88
Tabela 4.2 - Perfil de ácidos graxos dos ingredientes das dietas experimentais	91
Tabela 4.3 - Consumo de ácidos graxos de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	93
Tabela 4.4 - Fluxo omasal de ácidos graxos de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	94

Tabela 4.5 - Teor e fluxo de ácidos graxos totais de cada fase do omaso de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	95
Tabela 4.6 - Perfil de ácidos graxos das bactérias presentes na digesta omasal de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	96
Tabela 4.7 - Perfil de ácidos graxos do leite de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen	97
Tabela 4.8 - Correlação de Pearson entre o teor de nitrogênio não amoniacal e o perfil de ácidos graxos dos pellets de bactéria e entre as extensões de bio-hidrogenação e os componentes microbianos do fluxo omasal.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	Metabolismo de proteínas e síntese de proteína microbiana ruminal	13
1.2	Técnicas de estimativa da síntese microbiana	16
1.2.1	Fluxo de bases purinas e excreção urinária de derivados de purinas	16
1.2.2	Excreção de creatinina e estimativa do volume urinário	20
1.2.3	¹⁵ N para a estimativa do fluxo de proteína microbiana	21
1.3	Suplementação lipídica	22
1.4	Referências bibliográficas.....	25
2	METABOLISMO DE NITROGÊNIO E DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO TEORES DE PROTEÍNA DEGRADÁVEL NO RÚMEN E SUPLEMENTADAS COM SAIS DE CÁLCIO DE ÁCIDOS GRAXOS	31
2.1	Resumo	31
2.2	Abstract.....	32
2.3	Introdução	33
2.4	Material e métodos.....	34
2.4.1	Animais, delineamento e dietas experimentais.....	35
2.4.2	Procedimentos experimentais, infusões e coletas.....	35
2.4.3	Análises laboratoriais	39
2.4.4	Cálculos e análises estatísticas	41
2.5	Resultados	43
2.6	Discussões.....	48
2.7	Conclusões	52
2.8	Referências.....	53
3	AValiação de ¹⁵N e bases purinas como indicadores de fluxo microbiano, fração endógena e recuperação urinária de derivados de purinas em vacas leiteiras alimentadas com lipídios	57
3.1	Resumo	57
3.2	Abstract.....	58
3.3	Introdução	59
3.4	Material e métodos.....	60

3.4.1	Animais, delineamento e dietas experimentais.....	60
3.4.1	Procedimentos experimentais, infusões e coletas.....	62
3.4.2	Análises laboratoriais	63
3.4.3	Cálculos e análises estatísticas	66
3.5	Resultados.....	67
3.5.1	Composição dos <i>pellets</i> de bactéria associada à fase líquida ou aderida à partícula	67
3.5.2	Comparação entre ^{15}N e bases purinas como indicadores do fluxo microbiano.....	68
3.5.3	Fluxo de bases purinas, fração endógena e excreção urinária de creatinina e derivados de purinas	73
3.1	Discussões.....	75
3.2	Conclusões	79
3.3	Referências bibliográficas.....	79
4	CONSUMO, FLUXO OMASAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS E DO LEITE DE VACAS ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO SAIS DE CÁLCIO E TEORES DE PROTEÍNA DEGRADÁVEL NO RÚMEN.....	83
4.1	Resumo	83
4.2	Abstract.....	84
4.3	Introdução	86
4.4	Material e métodos.....	87
4.4.1	Animais, delineamento e dietas experimentais.....	87
4.4.2	Procedimentos experimentais, infusões e coletas.....	87
4.4.3	Análises laboratoriais	89
4.4.4	Cálculos e análises estatísticas	92
4.5	Resultados.....	93
4.6	Discussões.....	98
4.7	Conclusões	102
4.8	Referências bibliográficas.....	103
5	CONCLUSÃO GERAL	107

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os sistemas de produção de bovinos de leite têm passado por profundas transformações nas últimas décadas. Segundo Potts, Shaughness e Erdman (2017), desde a década de 1970, a produção de leite por vaca mais que dobrou nos Estados Unidos. Este aumento de produtividade tem sido alcançado com o aumento do consumo de matéria seca (MS), embora a digestibilidade no trato total tenha caído. Neste contexto, desenvolver estratégias nutricionais que facilitem o atendimento das exigências é fundamental. Dentre estas estratégias, aquelas que impactem diretamente sobre a nutrição proteico-energética têm se destacado, tendo em vista a importância quantitativa destas nas dietas de vacas leiteiras.

A eficiência global de utilização do nitrogênio na produção animal é pouco maior que 10%. Na bovinocultura leiteira, a excessiva excreção de nitrogênio ganha relevância, uma vez que a eficiência de utilização do nitrogênio por vacas leiteiras é geralmente baixa (KOHN et al., 2005), resultando em eficiência média de aproveitamento do nitrogênio dietético no leite de aproximadamente 25% (HUHTANEN; HRISTOV, 2009). É possível otimizar a eficiência do uso do nitrogênio pela manipulação da dieta. No entanto, apenas o melhor entendimento dos componentes e mecanismos envolvidos no metabolismo do nitrogênio em vacas leiteiras permitirá ganhos nesta eficiência (REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008).

1.1 METABOLISMO DE PROTEÍNAS E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

De acordo com o NRC (1985), o nitrogênio é nutriente fundamental para ruminantes, pois é o componente chave dos aminoácidos. Os ruminantes não usam o aminoácidos da dieta diretamente no tecido, uma vez que estes sofrem modificações em decorrência da atividade microbiana. No entanto, os microrganismos podem usar o nitrogênio não proteico (principalmente amônia) para o seu crescimento (RUSSEL et al., 1992). Estes são subsequentemente digeridos pelo animal e suas proteínas são utilizadas para atender as exigências de aminoácidos para a manutenção e produção animal.

A proteína microbiana sintetizada no rúmen é a principal fonte de aminoácidos que chega ao intestino delgado em animais em crescimento e vacas leiteiras (CLARK;

SHAUGHNESS; ERDMAN, 1992). Segundo Tas e Susenbeth (2007), mais de 50% das exigências proteicas de vacas de alta produção são atendidas pelo fluxo de proteína microbiana para o abomaso. Assim, a mensuração do fluxo intestinal de proteína microbiana é fundamental para correta estimativa do fornecimento de proteína metabolizável (BRODERICK et al., 2010). Além disso, os modernos sistemas de formulação e avaliação de dietas têm especial interesse na síntese microbiana ruminal e no fluxo de proteína não degradável no rúmen, uma vez que alterações neste fracionamento dificultam as estimativas da composição aminoacídica da proteína metabolizável, impossibilitando estimativas acuradas das exigências de aminoácidos suplementares (OWENS; QI; SAPIENZA, 2014).

A síntese de proteína microbiana (SPM), nos sistemas de formulação de dietas, tem sido estimada a partir do consumo de nutrientes digestíveis totais (130 g por kg de NDT; NRC 1996, NRC, 2001). Desta forma, toda vez que se inclui uma fonte lipídica na dieta, os sistemas sugerem que o usuário inclua fontes proteicas de maior degradabilidade para atender à exigência para a SPM. No entanto, os ácidos graxos de cadeia longa presentes nos alimentos, apesar de contribuírem significativamente para o teor de NDT da dieta, são pouco utilizados para o crescimento microbiano (KOZLOSKI, 2011). Desta forma, na última atualização do NRC para gado de corte (NASEM, 2016), as estimativas de SPM passaram a ser obtidas de maneiras diferentes em função da concentração de extrato etéreo (EE) da dieta. Nas dietas com EE menor que 39 g/kg, a estimativa ainda considera o consumo de NDT [$SPM (g/d) = 42,73 + 0,087 \times CNDT (g/d)$]. Já para dietas com EE maior que 39 g/kg, o sistema passou a estimar a SPM a partir do consumo de NDT corrigido para o teor de extrato etéreo [$SPM (g/d) = 53,33 + 0,096 \times CNDTc (g/d)$]. Esta alteração reforça a importância dos efeitos dos lipídios sobre a SPM.

A SPM resulta da passagem de bactérias, protozoários e fungos, do rúmen para o intestino delgado. Os protozoários, apesar de contribuírem significativamente para a massa microbiana ruminal, tem participação menor quando comparado às bactérias no que tange ao fluxo microbiano, em função de sua menor taxa de renovação, contribuindo significativamente para a reciclagem do nitrogênio no rúmen (LENG; DELLOW; WAGHORN, 1986; PUNIA; LEIBHOLZ; FAICHNEY, 1992). A suplementação lipídica das dietas de vacas leiteiras tem a capacidade de alterar o crescimento microbiano (DOUREAU; FERLAY, 1995). Os protozoários, por exemplo, são sensíveis à adição de lipídios na dieta e esta sensibilidade depende da composição

da fonte lipídica e da forma como estes lipídios são liberados no rúmen (CLARK; KLUSMEYER; CAMERON, 1992). Valinote et al. (2006) mostraram que sais de cálcio de ácido linoleico não alteram as populações de protozoários ciliados. Experimentos *in vitro* mostraram, no entanto, que esses microrganismos são sensíveis aos ácidos graxos insaturados C18:3, C18:2 e C18:1, nesta ordem de importância (MACHMÜLLER et al., 1998; HRISTOV et al., 2004).

De acordo com Russel et al. (1992), a predação de protozoários sobre bactérias aumenta o *turnover* de bactérias no rúmen, levando a redução de 40 a 50% no potencial de SPM (5 g de célula seca por g de carboidrato). Assim, os efeitos tóxicos dos lipídios sobre protozoários podem aumentar a eficiência de síntese proteica ruminal. Eugène, Archimede e Sauvant (2004), em estudo metanalítico, observaram que a defaunação decresce a digestibilidade da matéria orgânica (MO) e da FDN, proporciona maior passagem de nitrogênio microbiano ao duodeno e aumenta a eficiência de SPM (g/g de matéria orgânica verdadeiramente digestível), com redução da concentração de amônia ruminal. No entanto, a suplementação lipídica pode reduzir o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000; BARLETTA et al., 2016), o que teoricamente reduz o substrato disponível para o crescimento microbiano.

Outro importante fator a ser considerado na avaliação da SPM e principalmente da eficiência de síntese é a concentração de amônia ruminal. Slyter, Satter e Dinius (1979) observaram que concentrações entre 2 e 5 mg/dL de nitrogênio amoniacal são suficientes para permitir o máximo do crescimento microbiano ruminal. De acordo com Russel et al. (1992), bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos utilizam exclusivamente amônia como fonte de nitrogênio, enquanto que as fermentadoras de carboidratos não fibrosos utilizam além da amônia também os peptídeos.

Reynal e Broderick (2005) avaliaram os efeitos da inclusão de diferentes teores de PDR na dieta (10,6; 11,7; 12,3; 13,2% MS) de vacas leiteiras sobre a SPM. O aumento da concentração da PDR resultou em aumento linear da SPM e da eficiência de síntese (g/kg de MO digestível). Além disso, foi observado aumento linear na concentração de proteína verdadeira no leite e da excreção de nitrogênio na urina. Apesar de a amônia ser a principal fonte de nitrogênio para o crescimento dos microrganismos ruminais, se a taxa de produção exceder a taxa de utilização, a excreção de nitrogênio, com custo energético da síntese de ureia, pode aumentar (RUSSEL et al., 1992). O excedente de amônia ruminal, obtido pela ação de ureases ruminais, é absorvido pela parede ruminal e assim como o nitrogênio advindo do processo de

deaminação nos tecidos, é convertido em ureia no ciclo da ornitina nos hepatócitos, sendo excretado no leite e principalmente na urina (OBITSU et al., 2011). O excedente de ureia circulante implica em aumento da demanda energética para a conversão hepática da amônia em ureia (SANTOS; PEDROSO, 2011), e resulta em aumento das concentrações séricas de ureia, das excreções de N ureico no leite e na urina, a qual pode ainda acarretar em falhas reprodutivas (BUTLER, 1998; RABOISSON et al., 2017).

Griswold et al. (1996) demonstraram que a utilização de outras fontes de N (além da amoniacal, não proteica) são necessárias, não apenas para o máximo crescimento microbiano, como também para adequada digestão ruminal da fibra. Algumas populações microbianas, e especialmente os protozoários, são importantes na degradação ruminal de proteínas (JOUANY; USHIDA, 1999) e de acordo Clark, Klusmeyer e Cameron (1992), a inclusão de lipídios nas dietas inibe o crescimento destas populações microbianas. Assim, espera-se redução da degradabilidade ruminal da proteína e das concentrações de amônia ruminal nos animais alimentados com dietas contendo fontes lipídicas.

1.2 TÉCNICAS DE ESTIMATIVA DA SÍNTESE MICROBIANA

A variabilidade das estimativas de SPM *in vivo*, em consequência das limitações das técnicas de estimativa tem dificultado o desenvolvimento de modelos precisos para estimativa de SPM a partir das características da dieta (GALYEAN; TEDESCHI, 2014). Dentre as técnicas mais conhecidas e utilizadas para a estimativa da SPM estão o ^{15}N , as bases purinas (BP) e a excreção urinária de derivados de purinas (DP) (BLUMMEL; LEBZIE, 2001; BELENGUER et al., 2002; MA et al., 2014; ROTTA et al., 2015).

1.2.1 Fluxo de bases purinas e excreção urinária de derivados de purinas

As metodologias para avaliação do fluxo microbiano têm evoluído consideravelmente. No entanto, a maioria dos estudos ainda utiliza a metodologia de DP, por ser mais simples, não invasiva e menos onerosa (REYNAL, BRODERICK; BEARZI, 2005). Entretanto, as equações utilizadas são demasiadamente antigas e desenvolvidas em modelos animais que nem sempre refletem as reais condições dos

estudos. O fluxo microbiano pode ser estimado a partir da avaliação dos ácidos nucleicos que chegam ao intestino delgado e também pelos produtos finais do metabolismo destes ácidos, os quais são excretados principalmente pela urina, na forma de DP (MCALLAN, 1980).

De acordo com McDonald et al. (2011), os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são moléculas orgânicas que contêm as informações genéticas dos indivíduos. Estruturalmente são compostos por polímeros de nucleotídeos, sendo estes compostos por ácido fosfórico, um açúcar (desoxirribose no DNA e ribose no RNA) e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas presentes nos ácidos nucleicos são divididas em pirimidinas e purinas, sendo estas, por sua vez, adenina ou guanina. Como a maioria dos ácidos nucleicos de origem exógena dietética sofre metabolização ruminal, sendo resintetizados na SPM, o fluxo de ácidos nucleicos a partir do rúmen pode ser utilizado para a estimativa da SPM (TAS; SUSENBETH, 2007). A concentração de ácidos nucleicos nos alimentos comumente utilizados para ruminantes é baixa, representando entre 1 e 2% em concentrados e de 5 à 10% do N total em volumosos (FUJIHARA; SHEM, 2011). Já nos microrganismos ruminais, os ácidos nucleicos representam 10 a 25% do N total, sendo 70 a 80% destes na forma de RNA.

Segundo Ring e Buttery (1978), o conteúdo de DNA e RNA em bactérias é aproximadamente constante e maior que em protozoários. Para a estimativa da SPM a partir do fluxo de BP, há de se conhecer a exata relação entre N purinas e N total das culturas microbianas (TAS; SUSENBETH, 2007). Assim, fatores dietéticos, como a suplementação lipídica e a concentração de amônia potencialmente afetam o crescimento das diferentes populações microbianas, afetando a razão entre os teores de N na forma de purinas e o N total dos microrganismo.

A partir do conhecimento da relação entre as concentrações de N purinas e N total dos microrganismos, é possível estimar a SPM à partir do fluxo de BP (REYNAL, BRODERICK; BEARZI, 2005). Da mesma forma, para o cálculo do fluxo de proteínas a partir da utilização de ^{15}N é necessário conhecer a relação entre ^{15}N e N total dos microrganismos e o fluxo de ^{15}N não amoniacal. Assim, métodos que considerem esta relação fixa para todos os animais em avaliação podem incorrer em alguns erros, uma vez que diversos fatores (especialmente fermentação ruminal) podem influenciar a composição das populações microbianas (CHEN; GOMES, 1992).

Para vacas leiteiras, Smith e McAllan (1974) sugerem as relações N purinas: N total de 0,126 e 0,112 quando as vacas são alimentadas apenas com feno ou com feno e

concentrado, respectivamente. Os mesmos autores obtiveram relações de 0,108 para bovinos defaunados e 0,077 para faunados. Chen e Gomes (1992), na descrição de seu método, sugerem a utilização do fator fixo de 0,116 de N purinas em relação ao N total de cultura mista de microrganismos ruminais.

Os ácidos nucleicos de origem microbiana deixam o rúmen e passam pelo abomaso aparentemente sem sofrer digestão (CHEN; GOMES, 1992). No intestino delgado, os nucleotídeos são hidrolisados pela ação de ribonucleases pancreáticas, sendo absorvidos no intestino. Os coeficientes de digestibilidade de RNA e DNA no intestino delgado são de 80 a 90% e 75 a 85%, respectivamente (MCALLAN, 1980). No entanto, nas diferentes referências consultadas, o coeficiente de digestibilidade dos ácidos nucleicos é variável. Smith e McAllan (1974) sugerem coeficiente de digestibilidade dos ácidos nucleicos em bovinos de 0,80, enquanto Chen e Gomes (1992) sugerem o uso de um coeficiente de 0,83.

As enzimas que degradam os ácidos nucleicos estão presentes nas secreções pancreáticas no lúmen intestinal e na mucosa do intestino delgado (NAKAYAMA et al., 1981). Os ácidos nucleicos microbianos são hidrolisados pelas enzimas pancreáticas através da ação de polinucleases, nucleosídeses e fosfatases (MCDONALD et al., 2011). Estas enzimas catalisam a quebra da ligação éster entre o açúcar e o ácido fosfórico, liberando o nucleosídeo. Os nucleosídeos são quebrados na ligação entre o açúcar e as bases nitrogenadas, gerando purinas e pirimidinas livres. Se o nucleosídeo não é diretamente absorvido, as BP são provavelmente degradadas até ácido úrico e/ou alantoína - principais produtos finais do seu metabolismo em ruminantes - enquanto que as pirimidinas são degradadas à alanina e ácido aminoisobutírico (MCDONALD et al., 2011). A estimativa da digestibilidade das BP microbianas ruminais depende da avaliação do fluxo ileal de BP, resultando em baixa disponibilidade de dados na literatura, apesar de Tas e Susenbeth (2007) considerá-la como importante ponto limitante para a obtenção de estimativas confiáveis da SPM a partir da excreção urinária de DP.

No catabolismo das BP, o monofosfato de adenosina (AMP; adenosina 5-fosfato) é convertido em adenosina (adenina ligada à uma ribose) ou inosina monofosfato (IMP: hipoxantina + ribose + fosfato), pela ação das enzimas AMP aminohidrolase ou 5'-nucleotidase, respectivamente. A IMP é convertida à inosina (hipoxantina ligada a uma ribose) em uma reação catalisada pela 5'-nucleotidase. Por outro lado, a adenosina é convertida em inosina, pela ação da adenosina deaminase.

Então, a inosina sofre ação da nucleosídeo fosforilase, formando hipoxantina, que pela ação da xantina oxidase será convertida em xantina e posteriormente ácido úrico (CHEN; GOMES, 1992). Este processo é pouco entendido, no entanto, sabe-se que os nucleosídeos purinas, bases livres e possíveis produtos da degradação são absorvidos do lúmen intestinal e degradados na mucosa intestinal (VERBIC et al., 1990).

De acordo com Fujihara e Shem (2011), na mucosa intestinal dos bovinos, os ácidos nucleicos absorvidos sofrem ação da guanina deaminase, adenosina deaminase e xantina oxidase, dando origem ao ácido úrico, a partir de xantina e hipoxantina. As concentrações de xantina e hipoxantina no sangue portal são menores em bovinos do que em ovinos e isto está relacionado a menor atividade de xantina oxidase na mucosa intestinal e no tecido hepático de ovinos (BALCELLS et al., 1991). Consequentemente a absorção de purinas exógenas em ovinos é maior, assim como a sua incorporação nos tecidos.

Estudos *in vivo* usando RNA (adenina ou guanina) marcados com ^{14}C , mostraram incorporação direta de ácidos nucleicos nos tecidos corporais como fígado, rins e baço (SMITH; MOUSSA; HAWKINS, 1974). O metabolismo pós-absortivo de ácidos nucleicos em ruminantes é semelhante ao metabolismo destes em monogástricos, e a excreção ocorre principalmente via urina, na forma de ureia, ácido úrico, alantoína, xantina e hipoxantina (TOPPS; ELLIOTT, 1965). Já a recuperação urinária dos ácidos nucleicos desaparecidos do intestino delgado não é completa. Chen e Gomes (1992) propõem que das BP, 84% em ovinos e 85% em bovinos, podem ser recuperados na urina, na forma de DP.

Segundo Fujihara e Shem (2011), os dois principais processos pelos quais os ruminantes obtêm seus ácidos nucleicos são através da síntese *de novo* e da reutilização de ácidos nucleicos de origem exógena. A síntese *de novo* ocorre a partir da utilização de glicina, glutamina e ácido aspártico, enquanto que a reutilização ocorre pela conversão em um intermediário comum, o inosina 5'-monofosfato. Após o atendimento das exigências celulares por nucleotídeos, o resíduo, assim como as bases livres advindas dos processos catabólicos, são convertidas em DP.

Os DP excretados na urina são, majoritariamente advindos da digestão e absorção de BP exógenas, mas contêm também, em menor proporção, BP originárias do *turnover* do trifosfato de adenosina (ATP) e dos ácidos nucleicos dos tecidos corporais, não recuperados e reutilizados, sendo catabolizados e excretados na urina, como DP de origem endógena (FUJIHARA; SHEM, 2011).

Em bovinos, 82 a 93% da excreção de DP ocorre na forma de alantoína e o restante é excretado majoritariamente na forma de ácido úrico. Consequentemente, a relação entre estes compostos na excreção de DP é praticamente constante (CHEN et al. 1990; VERBIC et al. 1990). Segundo Rennó et al. (2000), em bovinos de corte, apenas 2% dos DP são excretados na forma de xantina e hipoxantina e isso se deve a grande atividade de xantina oxidase nesta espécie. De acordo com Chen, Ørskov e Hovell (1990) e Verbic et al. (1990), os DP endógenos ou exógenos que estão presentes no sangue são filtrados a taxa constante de aproximadamente 30% por hora, sendo que a excreção urinária é a principal rota de eliminação.

1.2.2 Excreção de creatinina e estimativa do volume urinário

Outra limitação para a utilização da excreção urinária de DP como preditor da SPM é a correta avaliação do volume urinário. A coleta total de urina, durante alguns dias do período experimental, é a metodologia mais acurada. Segundo Chen e Gomes (1992), para reduzir erros associados às variações na produção urinária, as coletas de urina deveriam ser feitas durante pelo menos cinco dias. No entanto, diferentes tempos de coleta de urina têm sido descritos na literatura, variando de 24 horas (CHIZZOTTI et al., 2008), três dias (GONZÁLEZ-ROQUILLO et al., 2003) até nove dias (SIDONS et al. 1985). Entretanto, este procedimento relativamente simples pode se tornar complexo em ensaios realizados em fêmeas, com grande número de animais ou em condições em que a infraestrutura é limitante.

Para a coleta total de urina em fêmeas, o cateterismo vesical é a técnica mais comumente utilizada. Contudo, cateteres urinários apresentam problemas específicos, tais como a considerável dificuldade de inserção, infecções secundárias na bexiga e perda de urina, que muitas vezes pode ser considerável (KURIEN; EVERDS; SCOFIELD, 2004). Deste modo, tal procedimento pode representar dificuldades operacionais e desconforto aos animais. Com base nas dificuldades apresentadas, alternativas à coleta total têm sido avaliadas para estimativa da produção urinária nessas condições. Dentre as alternativas, a técnica de amostragem pontual de urina, também conhecida como amostragem *spot*, é um dos métodos mais estudados em ruminantes (VALADARES et al., 1999; CHEN; JAYASURIYA; MAKKAR, 2004; KOZLOSKI et al., 2005; CHIZZOTTI et al., 2008; MA et al., 2014), cujo princípio se baseia na utilização da creatinina como indicador interno.

A creatinina é um metabólito formado no tecido muscular pela remoção não enzimática e irreversível de água do fosfato de creatina, a qual se origina do metabolismo celular (HARPER; RODWELL; MAYES, 1982). Pelo fato da creatinina ser excretada de forma relativamente constante por quilograma de massa muscular do animal, este tem sido o indicador mais utilizado para estimativas da excreção diária de urina, a partir da avaliação da sua concentração em amostras pontuais (KOZLOSKI et al., 2005; CHIZZOTTI et al., 2008). A facilidade de realização de amostragens pontuais, até mesmo em condições de campo, certamente contribui para disseminação desta técnica. Sendo assim, o volume urinário pode ser estimado pela razão entre a excreção de creatinina padronizada (calculada a partir de uma constante em função do peso corporal) e a concentração de creatinina na urina.

No entanto, a aplicação da técnica de amostragem pontual de urina tem gerado controvérsias na literatura, cuja divergência principal refere-se à constância de excreção da molécula de creatinina. Enquanto alguns estudos com bovinos demonstraram que a excreção de creatinina, como proporção do peso corporal, foi constante e semelhante entre os animais (RENNÓ et al., 2000; CHIZZOTTI et al., 2008; SILVA et al., 2012), outros afirmaram haver significativas variações na excreção de creatinina (PUERTA et al., 2010).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (ZANFERARI et al., 2015; DEL VALLE et al., 2017), observou-se aumento da excreção urinária estimada com o fornecimento de fontes lipídicas aos animais. Chen, Jayasuriya e Makkar (2004) ponderam que variações na excreção de creatinina entre os animais podem estar ligadas à diferenças nas condições patológicas e fisiológicas de cada indivíduo. Ao que tudo indica, as excreções diárias de creatinina estão diretamente ligadas ao *turnover* da proteína muscular (LAMP et al., 2015) e esta pode estar associada à suplementação lipídica pelo potencial aumento do consumo de energia metabolizável.

1.2.3 ^{15}N para a estimativa do fluxo de proteína microbiana

Isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, o que lhes confere diferentes massas atômicas. Por apresentarem o mesmo número de elétrons, pode-se inferir que os isótopos são elementos que apresentam as mesmas propriedades químicas do átomo que lhe deu origem. Diz-se que o ^{15}N é um isótopo estável por ocorrer na natureza, não

oferecendo riscos à saúde. No ar atmosférico, 0,366% do N encontrado está na forma de ^{15}N (DUCATTI et al., 2011).

O sulfato de amônio enriquecido com isótopos estáveis ^{15}N tem sido utilizado para estimar a SPM ruminal (REYNAL; BRODERICK, 2005). O sulfato de amônio tem a capacidade de se difundir pelo ambiente ruminal e pode ser incorporado à proteína microbiana. De acordo com Ahvenjärvi, Vanhatalo e Huhtanen (2002), os valores de δ de ^{15}N são semelhante na digesta e nos microrganismos. Então, a partir do δ de ^{15}N da digesta, antes do início das infusões pode-se calcular o aumento de δ de ^{15}N no nitrogênio não amoniacal do fluxo. A razão entre a δ de ^{15}N no nitrogênio não amoniacal da digesta (corrigido para δ de ^{15}N basal) e δ de ^{15}N no *pellet* de bactérias nos indica a proporção da proteína que tem origem microbiana.

Como discutido acima, para a obtenção da proporção de proteína microbiana no fluxo pós ruminal é necessário o conhecimento de δ de ^{15}N no *pellet* de bactéria, o qual é obtido por uma série de centrifugações, dependendo do tipo de bactéria a ser isolada (REYNAL; BRODERICK, 2005). Segundo Martin-Orué et al. (1998), o ^{15}N se distribui uniformemente por toda a célula microbiana, enquanto que a ocorrência de lise microbiana durante o processo de isolamento pode resultar em perda de BP do citoplasma da célula. Consequentemente, a relação N purina: N total se reduz, o que resulta em uma superestimativa do fluxo microbiano calculado a partir do fluxo de BP em relação ao calculado a partir do enriquecimento com ^{15}N . Segundo Reynal, Broderick e Bearzi (2005) e Ipharraguerre et al. (2007), quando se coleta amostra de digesta omasal para estimativa da SPM, o ^{15}N é recomendado em relação aos DP. Os mesmos autores não observaram diferenças entre os indicadores quando as amostras foram coletadas no duodeno.

1.3 SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA

A suplementação lipídica de dietas de vacas leiteiras tem sido utilizada com o intuito de: aumentar a ingestão de energia, reduzindo a ingestão de matéria seca e o incremento calórico em decorrência do aumento parcial da eficiência de produção de leite; substituir carboidratos rapidamente fermentáveis, otimizando o consumo de forragem e a fermentação ruminal; alterar a composição da gordura do leite e de tecidos para melhorar a aceitação pelo consumidor; e aumentar a absorção de nutrientes lipossolúveis (NRC 2001; PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Os recentes avanços no conhecimento do metabolismo ruminal de lipídios estão focados principalmente na manipulação de eventos físico-químicos no rúmen visando dois resultados práticos: 1) controle dos efeitos antimicrobianos dos ácidos graxos, quando fontes lipídicas são adicionadas à dieta, sem alterações nos processos de fermentação ruminal e digestão e 2) regulação da bio-hidrogenação ruminal. Várias propriedades dos lipídeos determinam os seus efeitos antimicrobianos no rúmen, incluindo o grupo funcional, grau de insaturação, formação de sais de carboxilato e associações físicas dos lipídios com as superfícies de partículas de alimentos e microrganismos (JENKINS, 1993).

Segundo Allen (2000), um dos principais efeitos observados com a suplementação lipídica dietética de vacas leiteiras é a redução do consumo de matéria seca. De acordo com este autor, as causas desta redução do consumo parecem relacionadas a aceitabilidade da fonte lipídica, liberação de hormônios intestinais (especialmente a colecistoquinina) e a oxidação hepática de lipídios. A maioria das fontes lipídicas de origem vegetal atualmente utilizadas na dieta de ruminantes no Brasil são ricas em triglicerídeos. Após a ingestão, os triglicerídeos passam pelo processo de lipólise ruminal (85 a 95%), liberando glicerol e ácidos graxos (DOREAU; FERLAY, 1995). Os ácidos graxos livres interagem com a membrana dos microrganismos, inibindo seu crescimento (MAIA et al., 2010; RICO et al., 2015). Os microrganismos têm a capacidade de biohidrogenar (adicionar hidrogênios às moléculas, reduzindo as insaturações) os ácidos graxos insaturados, tornando-os mais estáveis no ambiente ruminal (JENKINS, 1993). Caso o consumo de ácidos graxos exceda a capacidade de biohidrogenação ruminal, os ácidos graxos insaturados passam a se acumular, determinando efeitos negativos sobre o crescimento microbiano e digestibilidade ruminal, especialmente da fibra (JENKINS, 1993). Os efeitos práticos observados são: redução da digestibilidade aparente ruminal, da concentração total de ácidos graxos de cadeia curta e da relação entre as concentrações ruminiais de propionato e acetato (BARLETTA et al., 2016). O uso de lipídios poli-insaturados na forma de sementes de oleaginosas (KNAPP; GRUMMER; DENTINE, 1991; DEPETERS; BATH, 1986) ou sais de cálcio de ácidos graxos, traz menores efeitos sobre a fermentação ruminal e o consumo de matéria seca, provavelmente porque os ácidos graxos são liberados lentamente da matriz proteica da semente e da sua ligação com o cálcio, respectivamente. Além disso, a suplementação lipídica tem sido associada ao aumento

da digestibilidade do extrato etéreo e consequentemente a aumento das concentrações séricas de colesterol (BARLETTA et al., 2016).

As bactérias e protozoários podem incorporar ou sintetizar ácidos graxos de cadeia longa, principalmente os ácidos graxos de 15, 16, 17 e 18 carbonos (PATTON; MCCARTHY; GRIEL, 1970). Os microrganismos podem reduzir o número de carbonos dos ácidos graxos através da alfa oxidação; sintetizar ácidos graxos ramificados a partir de aminoácidos ramificados ou produzir isômeros *trans* monoinsaturados através da dessaturação de ácidos graxos saturados (DOREAU; FERLAY, 1995). Como a síntese lipídica ruminal é processo importante para a manutenção das populações microbianas, sendo responsável por 10 a 15% da composição dos microrganismos ruminais (VIVIANI, 1970), o fluxo intestinal de ácidos graxos é invariavelmente maior que o seu consumo, tendo em vista que a absorção ruminal é praticamente nula.

Segundo Doreau e Ferlay (1995), estudos *in vitro* demonstram efeitos negativos dos ácidos graxos sobre a degradabilidade ruminal de proteínas e a SPM. Estudos *in vivo*, no entanto, são contraditórios, levando, a redução ou não afetando a degradabilidade proteica ruminal e a SPM (DOREAU; FERLAY, 1995). Vale ressaltar que as técnicas de estimativa de degradabilidade e fluxo microbiano evoluíram desde a realização dos trabalhos revisados por estes autores.

Oldick e Firkins (2000) avaliaram a SPM em função da adição de fontes lipídicas com diferentes graus de insaturação, e observaram redução linear da contagem de protozoários. Além disso, a adição de lipídios reduziu a digestibilidade ruminal da fibra e aumentou a eficiência de SPM, medida pela relação entre a SPM e o consumo de carboidratos verdadeiramente digestíveis, sem alterar a SPM.

Diante do exposto, no presente estudo foi desenvolvido um experimento no qual vacas leiteiras foram alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen. Para facilitar a apresentação e discussão dos resultados, estes foram divididos e apresentados nos próximos capítulos: no segundo capítulo são apresentados os efeitos das dietas sobre o consumo, fermentação e metabolismo ruminal de N, desempenho produtivo e balanço de N; no terceiro capítulo foi apresentada a comparação entre ^{15}N e BP como indicadores de fluxo microbiano, e os efeitos dos fatores dietéticos sobre a composição do *pellet* de bactérias, a recuperação urinária dos DP e a contribuição endógena para esta exceção; no quarto e último capítulo são apresentados os resultados de consumo de ácidos

graxos, fluxo omasal e bio-hidrogenação ruminal de ácidos graxos poli-insaturados, assim como o perfil de ácidos graxos dos microrganismos e da gordura do leite.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2176-2187, 2002.

BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; CASTRILLO, C.; GASA, J. Urinary-excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. **Journal of Agricultural Science**, v. 116, n. 2, p. 309-317, 1991.

BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; BETTERO, V. P.; ARAÚJO, C. E.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; FERREIRA DE JESUS, E.; MINGOTI, R. D.; BENEVENTO, B. C.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: Oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, n. 9, p. 111-121, 2016.

BELENGUER, A.; YANEZ, D.; BALCELLS, J.; OZDEMIR BABER, N. H.; GONZÁLEZ RONQUILLO, M. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 2-3, p. 127-135, 2002.

BUTLER, W. R. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 1998.

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

BRODERICK, G. A.; HUHTANEN, P.; AHVENJÄRVI, S.; REYNAL, S. M.; SHINGFIELD, K. J. Quantifying ruminal nitrogen metabolism using the omasal sampling technique in cattle - A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3216-3230, 2010.

CHEN, X. B.; JAYASURIYA, M. C. N.; MAKKAR, H. P. S. Measurement and application of purine derivatives:creatinine ratio in spot urine samples of ruminants. In: MAKKAR, H.P.S.; CHEN, X.B. (Ed) **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2004. p.167-179.

CHEN, X. B.; ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. Excretion of purine derivatives by ruminants - endogenous excretion, differences between cattle and sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 121-129, 1990.

CHEN, X. B.; 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, Aberdeen, Rowett Research Institute. 1992. 22 p.

CHIZZOTTI, M. L. VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling to assess purine derivative excretion. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 2-3, p. 23-

23, 2007.

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, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

DEL VALLE, T. A.; PAIVA, P. G.; FERREIRA DE JESUS, E.; ALMEIDA, G. F.; ZANFERARI, F.; COSTA, A. G. B. B.; BUENO, I. C. S.; RENNÓ, F. P. Dietary chitosan improves nitrogen use and feed conversion in diets for mid lactation dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 201, n. 7, p. 22-29, 2017.

DEPETERS, E. J.; BATH, D. L. Canola-meal versus cottonseed meal as the protein-supplement in dairy diets. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 1, p. 148-154, 1986.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen-metabolism in the rumen - a review. **Livestock Production Science**, v. 43, n. 2, p. 97-110, 1995.

DUCATTI, C.; MARTINS, C. J.; ARRIGONI, M. B.; MARTINS, M. B.; VIEIRA JÚNIOR, L. C.; DENADAI, J. C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 68-75, 2011.

EUGENE, M.; ARCHIMEDE, H.; SAUVANT, D. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. **Livestock Production Science**, v. 85, n. 1, p. 81-97, 2004.

FUJIHARA, T.; SHEM, M. N. Metabolism of microbial nitrogen in ruminants with special reference to nucleic acids. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 2, p. 198-208, 2011.

GALYEAN, M. L.; TEDESCHI, L. O. Predicting microbial protein synthesis in beef cattle: Relationship to intakes of total digestible nutrients and crude protein. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 11, p. 5099-5111, 2014.

GONZALEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. Technical note: Evaluation of urinary purine derivatives in comparison with duodenal purines for estimating rumen microbial protein supply in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 884-891, 2017.

GRISWOLD, K. E.; HOOVER, W. H.; MILLER, T. K.; THAYNE, W. V. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 483-491, 1996.

HARPER, H. A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 5th ed. Sao Paulo, Brazil. 1982.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; MCALLISTER, T. A. *In vitro* effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 9, p. 2693-2704, 2004.

HUHTANEN, P.; HRISTOV, A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3222-3232, 2009.

IPHARRAGUERRE, I. R.; REYNAL, S. M.; LIÑEIRO M.; BRODERICK, G. A.; CLARK, J. H. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1904-1919, 2007.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JOUANY, J. P.; USHIDA, K. The role of protozoa in feed digestion - Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 12, n. 1, p. 113-128, 1999.

KNAPP, D. M.; GRUMMER, R. R.; DENTINE, M. R. The response of lactating dairy-cows to increasing levels of whole roasted soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2563-2572, 1991.

KOHN, R. A., DINNEEN, M. M.; RUSSEK-COHEN, E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen 2 excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 4, p. 879-889, 2005.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 216 p.

KOZLOSKI, G.V., FIORENTINI, G.; HARTER, C. J.; SANCHEZ, L. M. B. Uso de creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 98-102, 2005.

KURIEN, B. T.; EVERDS, N. E.; SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. **Laboratory Animals**, v. 38, v. 4, p. 333-361, 2004.

LAMP, O.; DERNO, M.; OTTEN, W.; MIELENZ, M.; NURNBERG, G.; KUHLA, B. Metabolic Heat Stress Adaption in Transition Cows: Differences in Macronutrient Oxidation between Late-Gestating and Early-Lactating German Holstein Dairy Cows. **Plos One**, v. 10, n. 5, UNSPe0125264, 2015.

LENG, R. A.; DELLOW, D.; WAGHORN, G. Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle fed on diets of freshly cut grass. **British Journal of Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 455-462, 1986.

MA, T.; DENG, K. D.; TU, Y.; ZHANG, N. F.; JIANG, C. G.; LIU, J.; ZHAO, Y. G.; DIAO, Q. Y. Effect of dietary forage-to-concentrate ratios on urinary excretion of purine derivatives and microbial nitrogen yields in the rumen of Dorper crossbred sheep. **Livestock Production Science**, v. 160, n. 2, p. 37-44, 2014.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK, C. S.; RICHARDSON, A. J.; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 52-62, 2010.

MARTIN-ORUE, S. M.; BACELLS, J.; ZAKRAOUI, F.; CASTRILLO, C. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta, effect of detachment procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, n. 3-4, p. 269-282, 1998.

MCALLAN, A. B. The degradation of nucleic-acids in, and the removal of breakdown products from the small-intestines of steers. **British Journal of Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 99-112, 1980.

MCDONALD, P.; EDWARD, R.A.A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G. **Animal Nutrition**. 7th ed. Essex, UK, Pearson Education Limited, 2011. 714 p.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D. A.; WANNER, M.; KREUZER, M. Potential of various

fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v.71, n. 1-2, p.117-130, 1998.

NAKAYAMA, J.; FUJIYOSHI, T.; NAKAMURA, M.; ANAI, M. Purification and properties of an endodeoxyribonuclease from nuclei of bovine small intestinal mucosa. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1636-1642, 1981.

NASEM. 2016. **Nutrient requirements of beef cattle**. 8 rev. ed. Washington, DC: The National Academics Press.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washinton, D.C.: NRC, 2001. 381 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of beef cattle**. 7. rev. ed. Washinton, D.C.: NRC, 1996. 138 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Ruminant nitrogen usage**. 1. rev. ed. Washinton, D.C.: NRC, 1985. 242 p.

OBITSU, T; KAMIYA, M.; KAMIYA, Y.; TANAKA, M.; SUGINO, T.; TANIGUCHI, K. Effects of high ambient temperature on urea-nitrogen recycling in lactating dairy cows. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 4, p. 531-536, 2011.

OLDICK, B. S.; FIRKINS, J. L. Effects of degree of fat saturation on fiber digestion and microbial protein synthesis when diets are fed twelve times daily. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 9, p. 2412-2420, 2000.

OWENS, F. N.; QI, S.; SAPIENZA, D. A. Invited review: Applied protein nutrition of ruminants - Current status and future directions. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2, p. 150-179, 2014.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. cap. 10, p. 299-322.

PATTON, R. A.; MCCARTHY, R. D.; GRIEL, L. C. Jr. Lipid Synthesis by Rumen Microorgnisms. II. Further Characterization of the Effects of Methionine. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 4, p. 460-465, 1970.

POTTS, S. B.; SHAUGHNESS, M.; ERDMAN, R. A. The decline in digestive efficiency of US dairy cows from 1970 to 2014. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5400-5410, 2017.

PUERTA, L. E.; VERGARA, D. M. B.; GARCÍA, D. E. Uso de la excreción de creatinina como método alternativo a la colecta total de orina en vacas Holstein. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 63 p. 5567- 5576, 2010.

PUNIA, B. S.; LEIBHOLZ, J.; FAICHNEY, G. J. Rate of production of protozoa in the rumen and the flow of protozoal nitrogen to the duodenum in sheep and cattle given a pelleted diet of lucerne hay and barley. **Journal of Agricultural Science**, v. 118, n. 2, p. 229-236, 1992.

RABOISSON, D.; ALBAAJ, A.; NONNE, G.; FOUCRAS, G. High urea and pregnancy or conception in dairy cows: A meta-analysis to define the appropriate urea threshold. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7581-7587, 2017.

RENNO, L. N.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; CECON, P. R.; DIAS, H. L. C.; COSTA, M. A. L.; OLIVEIRA, R.

V. Microbial protein production obtained by the urinary purine derivatives in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1223-1234, 2000.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, 2005a.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4065-4082, 2005b.

REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 4, p. 293-305, 2008.

RICO, D. E.; PRESTON, S. H.; RISSER, J. M.; HARVATINE, K. J. Rapid changes in key ruminal microbial populations during the induction of and recovery from diet-induced milk fat depression in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 3, p. 358-367, 2015.

RING, J. R.; BUTTERY, P. J. The simultaneous use of ribonucleic acid, 35S, 2, 6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers of microbial nitrogen entering duodenum of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 39, n. 1, p. 165-179, 1978.

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

RUSSEL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: I - Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3581, 1992.

SANTOS, F. A. P.; PEDROSO, A. M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. cap. 9, p. 265-298.

SIDDONS, R. C.; PARADINE, J.; BEEVER, D. E.; CORNELL, P. R. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. **British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 509-519, 1985.

SILVA, L.F.C.; VALADARES FILHO, S. C.; CHIZZOTTI, M. L.; ROTTA, P. P.; PRADOS, L. F.; VALADARES, R. F. D.; ZANETTI, D.; BRAGA, J. M. S. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nelore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.3, p.807-810, 2012.

SLYTER, L. L.; SATTER, L. D.; DINIUS, D. A. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen-utilization by steers. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 4, p. 906-912, 1979.

SMITH, R. H.; MCALLAN, A. B. Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. **British Journal of Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 27-34. 1974.

SMITH, R. C.; MOUSSA, N. M.; HAWKINS, G. E. Utilization of the nucleic acids of Escherichia coli and rumen bacteria by sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 529-537, 1974.

TAS, B. M.; SUSENBETH, A. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. **Livestock Production Science**, v. 111, n. 3, p. 181-192, 2007.

TOPPS, J. H.; ELLIOTT, R. C. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. **Nature**, v. 205, n. 4970, p. 498-499, 1965.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2686-2696, 1999.

VALINOTE, A. C.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LEME, P. R.; SILVA, S. L.; CUNHA, J. A. Effects of feeding monensin and different sources of fat on the ruminal population of ciliate protozoa in Nellore steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1418-1423, 2005.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ØRSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants - effect of microbial nucleic-acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

VIVIANI, R. Metabolism of long-chain fatty acids in the rumen. **Advances in Lipid Research**, v. 8, p. 267-346, 1970.

ZANFERARI, F., DEL VALLE, T. A.; VENDRAMINI, T. H. A.; SILVA, T. H.; RENTAS, M. F.; GARDINAL, R.; CALOMENI, G. D.; RENNÓ, F. P. Avaliação do uso da creatinina como indicador para estimativas da excreção urinária em vacas leiteiras. In: **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**. p. 62-96, 2015.

2 METABOLISMO DE NITROGÊNIO E DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO TEORES DE PROTEÍNA DEGRADÁVEL NO RÚMEN E SUPLEMENTADAS COM SAIS DE CÁLCIO DE ÁCIDOS GRAXOS

2.1 RESUMO

O experimento foi conduzido com objetivo de avaliar os efeitos da adição de sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) em dietas com diferentes teores de proteína degradável no rúmen (PDR) sobre o consumo, fermentação e metabolismo de nitrogênio (N) ruminal, balanço de N e desempenho produtivo de vacas em lactação. Foram utilizadas oito vacas em lactação, da raça Holandesa, múltiparas e canuladas no rúmen, distribuídas em um delineamento experimental em quadrado Latino 4×4 replicado, com os tratamentos em arranjo fatorial 2×2 . Os tratamentos foram obtidos pela combinação da suplementação com SCAG (-SCAG: sem suplementação e +SCAG: com 3,32% matéria seca - MS de SCAG); e o nível de PDR (BPDR: baixo PDR, com 9,8% MS de PDR; e APDR: alto PDR com 11,0% de PDR na MS da dieta). A síntese de proteína microbiana foi avaliada utilizando a técnica de coleta omasal, sistema de triplo indicador para o fluxo de digesta e o ^{15}N como indicador microbiano. Não houve interação ($P \geq 0,154$) entre SCAG e PDR para as variáveis analisadas. A suplementação lipídica reduziu ($P \leq 0,049$) o consumo, tendeu ($P = 0,076$) a aumentar o tempo de ruminação e o aumentou ($P = 0,015$) o pH ruminal. A suplementação com SCAG reduziu ($P \leq 0,013$) a digestibilidade aparente ruminal da MS e matéria orgânica, e tendeu a reduzir ($P = 0,096$) a digestibilidade ruminal da fibra em detergente neutro (FDN) e reduziu ($P = 0,043$) o N verdadeiramente digerido no rúmen. Apesar de afetar ($P = 0,039$) negativamente o fluxo de nitrogênio não amoniacal (NNA) associado com as grandes partículas, SCAG não afetou ($P \geq 0,634$) o fluxo total de NNA e o fluxo de NNA microbiano, e aumentou ($P = 0,032$) a eficiência de síntese proteica microbiana. Animais alimentados com +SCAG apresentaram maior ($P = 0,043$) produção de leite, menor ($P < 0,001$) teor de gordura e maior ($P < 0,001$) eficiência alimentar e de uso do N, em relação àqueles consumindo -SCAG. Animais alimentados com BPDR tenderam ($P \leq 0,096$) a apresentar maior consumo de proteína bruta e relação entre as concentrações ruminiais de acetato e propionato, em relação àqueles alimentados com

APDR. Ainda, APDR elevou ($P \leq 0,048$) a digestibilidade aparente total do amido e digestibilidade ruminal verdadeira do N em relação às dietas BPDR. O nível de PDR não afetou ($P \geq 0,719$) a síntese de proteína microbiana e a eficiência de síntese, enquanto que BPDR aumentou ($P \leq 0,055$) a produção de leite e reduziu o teor de proteína do leite, em relação a APDR. O alto nível de PDR tendeu ($P \leq 0,088$) a reduzir a excreção fecal e o balanço de N, e aumentou ($P = 0,021$) a excreção urinária relativa ao consumo de N. Desta forma, a adição de SCAG na dieta reduz o consumo, aumenta o tempo de ruminação, a eficiência microbiana e a produção de leite, sem afetar o fluxo microbiano. O aumento do nível de PDR da dieta reduz as perdas fecais de N e a produção de leite, e aumenta as perdas urinárias de N.

Palavras-chave: Degradação ruminal, farelo de soja, fermentação ruminal, gordura, nitrogênio não amoniacal, proteína microbiana.

2.2 ABSTRACT

The experiment was conducted to evaluate the effects of calcium salts of fatty acids (CSFA) in diets with different ruminal degraded protein (RDP) on feed intake, ruminal fermentation and nitrogen (N) metabolism, animal performance and nitrogen balance in lactating cows. Eight rumen cannulated lactating multiparous Holstein cows were used in a replicated 4×4 Latin square design, with a 2×2 factorial arrangement of treatments. Treatments included a combination of calcium salts of fatty acids (-CSFA: without supplemental CSFA; and +CSFA: with 3.32% dry matter - DM of CSFA) and ruminal degraded protein level (LRDP: low RDP level, with 9.8% of RDP; and HRDP: high level of RDP, with 11.0% of RDP in diet DM). Microbial protein synthesis was evaluated using omasal sampling technique, triple marker system of digesta flow and ^{15}N as microbial marker. There was no ($P \geq 0.154$) interaction effect between CSFA and RDP in analyzed variables. Fat supplementation reduced ($P \leq 0.049$) feed intake, while tended ($P = 0.076$) to increase rumination time, and enhanced ($P = 0.015$) ruminal pH. In addition, CSFA supplementation decreased ($P \leq 0.013$) DM and organic matter ruminal digestibility, and tended ($P = 0.096$) to reduce neutral detergent fiber ruminal digestibility, and reduced ($P = 0.043$) N truly digested in the rumen. Besides negative effect ($P = 0.039$) on non-ammonia nitrogen (NAN) associated with large phase, CSFA showed no effect ($P \geq 0.634$) on total NAN and microbial NAN flow, and increased (P

= 0.032) microbial efficiency. Animals fed CSFA had higher ($P = 0.043$) milk yield, with lower ($P < 0.001$) fat content and improved ($P < 0.001$) feed efficiency and N usage efficiency, in relation to those animals fed with non-supplemented diets. Animals fed LRDP tended to show higher ($P \leq 0.096$) CP intake, and acetate to propionate ruminal ratio, in relation to animals fed HRDP. In addition, HRDP increased ($P \leq 0.048$) starch total tract apparent digestibility and ruminal digestibility of N. The level of RDP showed no effect ($P \geq 0.719$) on microbial N synthesis and microbial efficiency, and lower level increased ($P \leq 0.055$) milk yield and decreased milk protein content, in relation to higher level. Decreased RDP level tended ($P = 0.074$) to reduce N fecal excretion, and increased ($P = 0.021$) fractional urinary excretion. Thus, CSFA dietary addition decreases feed intake, increases rumination time, microbial efficiency, and milk yield. Higher level of RDP reduces N fecal losses, and milk yield, and increases urinary losses of N.

Keywords: Fat, ruminal degradation, ruminal fermentation, microbial protein, non-ammonia nitrogen, soybean meal.

2.3 INTRODUÇÃO

A proteína microbiano (PM) sintetizada no rúmen é uma fonte proteica muito importante em ruminantes, suprimindo de 50 a 100% das exigências de proteína metabolizável, dependendo do nível de proteína não degradável no rúmen (PNDR) da dieta (NRC, 1985). Desta forma, uma estimativa acurada da síntese de PM é fundamental nos modelos de formulação e avaliação de dietas, embora a variação entre as estimativas obtidas entre laboratórios tenha contribuído significativamente para reduzir a acurácia e a precisão dos modelos atuais de formulação e avaliação de dietas (OWENS; QI; SAPIENZA, 2014). Assim, o modelo atual do NRC para gado de leite (2001) tem superestimado o fornecimento de nitrogênio não amoniacal e não microbiano (NNANM) em 18% e subestimado a PM em 14% (WHITE et al., 2017).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) têm sido utilizados para a estimativa da síntese de PM no sistema do NRC (2001), apesar de a maioria das bactérias ruminais não utilizar proteínas e lipídios como fontes de energia (RUSSEL et al., 1992). Doureau e Ferlay (1995) revisaram os efeitos dos lipídios no metabolismo ruminal de nitrogênio. Estes autores destacam pequenos efeitos dos lipídios na degradação ruminal da proteína

e na síntese de PM, enquanto que a eficiência de crescimento microbiano é dependente da natureza do ácido graxo, aumentando com a redução da matéria orgânica (MO) digerida no rúmen.

Os sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) são utilizados na alimentação de vacas leiteiras como fonte lipídica inerte no rúmen. Os sais de cálcio de óleo de soja podem ainda ser utilizados para promover os efeitos positivos da suplementação com ácidos graxos essenciais sobre o metabolismo animal (GANDRA et al., 2016; GARDINAL et al., 2018). Apesar dos avanços no conhecimento acerca dos efeitos da suplementação lipídica na digestão, metabolismo e composição do leite (BARLETTA et al., 2016; GARDINAL et al., 2018), o efeito desta sobre o metabolismo de N não tem sido avaliado utilizando métodos atuais de avaliação. Ademais, o viés nas estimativas da partição de proteínas nos modelos atuais ocorrem em decorrência da ausência de padrões metodológicos (OWENS; QI; SAPIENZA, 2014). Para isso, foram utilizadas técnicas experimentais mais atuais, como a coleta omasal (HUHTANEN; BROTZ; SATTER, 1997; AHVENJÄRVI et al., 2000; ROTTA et al., 2014a), sistema de três indicadores para o fluxo de digesta (FRANCE; SIDONS, 1986; ROTTA et al., 2014a) e ^{15}N como indicador microbiano (REYNAL, BRODERICK; BEARZI, 2005; ROTTA et al., 2014b).

Desta forma, a hipótese avaliada no presente estudo foi de que a adição de SCAG reduz o consumo, a degradação ruminal da proteína e a síntese de proteína microbiana, alterando os efeitos dos diferentes teores de PDR sobre o metabolismo de N e o desempenho animal. O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de SCAG em dietas de vacas leiteiras contendo diferentes teores de proteína degradável no rúmen (PDR) sobre o consumo de matéria seca (MS) e nutrientes, fermentação e metabolismo de ruminal de nitrogênio, digestibilidade, produção e composição do leite, e balanço de nitrogênio.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), de 24 de agosto a 15 de novembro de 2017. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de

Uso de Animais na Experimentação da FMVZ/USP (número de protocolo: 8785220917).

2.4.1 Animais, delineamento e dietas experimentais

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa, canuladas no rúmen, com $207 \pm 23,6$ (media $\pm$ desvio padrão) dias em lactação, $618 \pm 39,0$ kg de peso corporal e $33,4 \pm 2,45$ kg/d de produção de leite, no início do experimento. Para adaptação às condições ambientais, uma semana antes do início do experimento, os animais foram alojados nas instalações experimentais. Foi utilizado sistema *Tie Stall*, com camas de serragem, medindo $2,50 \times 2,50$ m, bebedores semiautomáticos individuais e ventilação forçada. Os animais foram agrupados de acordo com a produção de leite, o consumo de matéria seca (CMS) e o peso corporal. Dentro de cada grupo, os animais foram aleatoriamente alocados a uma das quatro sequências de dietas experimentais, de acordo com delineamento em quadrados Latinos 4×4 , contemporâneos e balanceados para efeito residual. Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação (MACHADO et al., 2016) e sete dias para a coleta de amostras e dados.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as exigências do NRC (2001), utilizando 50% de silagem de milho como única fonte de forragem (Tabela 2.1). As dietas foram obtidas de um arranjo fatorial 2×2 , no qual os efeitos de SCAG (0 e 3,32% da MS da dieta) e diferentes teores de PDR [9,80 e 11,0% da MS da dieta, de acordo com as estimativas do NRC (2001)] foram avaliados. Os sais de cálcio de óleo de soja (Megalac-E®, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil) foram adicionados para aumentar o teor de extrato etéreo da dieta de 2,54 para 5,3%. Os diferentes teores de PDR foram obtidos utilizando farelo de soja *bypass* (5,46% da MS, Soypass BR®, Cargill, Uberlândia, Brasil) no baixo teor e ureia (0,30% MS) no alto teor. As dietas foram isoproteicas (16,4% de proteína bruta).

2.4.2 Procedimentos experimentais, infusões e coletas

Para analisar a composição das dietas, amostras de milho moído, farelo de soja, farelo de soja *bypass*, SCAG e premix mineral foram coletadas a cada semana de avaliação e congeladas. As dietas foram ofertadas duas vezes ao dia (8:00 e 13:00 h), *ad libitum*. A quantidade ofertada foi ajustada diariamente para manter uma porcentagem

de sobras entre 5 e 10% da matéria natural ofertada. Silagem de milho e as sobras foram coletadas diariamente durante o período de coletas, agrupadas (uma amostra para cada animal em cada período) e congeladas até a realização das análises químicas.

Tabela 2.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	BPDR ¹		APDR ²	
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴
<i>Composição, % MS</i>				
Silagem de milho	50,0	50,0	50,0	50,0
Milho moído	21,4	18,6	23,0	20,2
Farelo de soja	15,6	16,1	19,2	19,6
Farelo de soja <i>Bypass</i> ⁵	5,47	5,45	0,00	0,00
Polpa cítrica	3,97	3,96	3,97	3,96
Sais de cálcio de ácidos graxos	0,00	3,32	0,00	3,32
Premix mineral ⁶	1,55	1,54	1,55	1,54
Calcário	1,00	0,00	1,00	0,00
Bicarbonato de sódio	0,80	0,80	0,80	0,80
Ureia	0,00	0,00	0,30	0,30
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Composição química, % MS</i>				
Matéria seca, % matéria natural	39,6	39,6	39,6	39,6
Matéria orgânica	92,1	92,3	92,2	92,4
Carboidratos não fibrosos ⁷	37,2	35,0	36,9	34,8
Amido	27,7	25,8	28,8	26,9
Fibra em detergente neutro (FDN)	35,9	35,5	35,7	35,4
Fibra em detergente ácido	22,6	22,8	22,3	22,4
FDN indigestível	13,2	13,4	13,1	13,3
Proteína bruta (PB)	16,4	16,4	16,4	16,4
PB não ureia	16,4	16,4	15,6	15,6
PDR ⁸	9,80	9,80	11,0	11,0
PNDR ^{8,9}	6,60	6,60	5,40	5,40
PIDN ¹⁰	3,16	3,12	2,87	2,83
PIDA ¹¹	1,23	1,22	1,16	1,15
Extrato etéreo	2,53	5,29	2,56	5,32
Lignina	4,46	4,46	4,30	4,31
ELL _{3x} ^{8,12} , Mcal/kg	1,60	1,69	1,61	1,69

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil).

⁵Farelo de soja *bypass* (Soypass BR®, Cargill, Uberlândia, Brasil);

⁶Cada kg contém: 235 g de Ca; 70 g de Na; 60 g de P; 20 g de S; 20 g de Mg; 2500 mg de Zn; 1600 mg de Mn; 700 mg de Cu; 600 mg de F; 40 mg de I; 20 mg de Se; 15 mg de Co; 10 mg de Cr; 200000 IU de Vit. A; 50000 IU de Vit. D2; e 1500 IU de Vit. E;

⁷Estimado de acordo com Hall (2000);

⁸Calculado de acordo com o modelo do NRC (2001);

⁹PNDR: proteína não degradável no rúmen.

¹⁰Proteína insolúvel em detergente neutro;

¹¹Proteína insolúvel em detergente ácido;

¹²Energia líquida de lactação ao nível de consumo de três manutenções.

O líquido ruminal foi coletado no 15º dia de cada período experimental, antes da alimentação matinal e 2, 4, 6, 8, 10, 14 e 16 horas após a alimentação matinal. A digesta ruminal foi coletada manualmente, em 5 pontos previamente estabelecidos (sacos craniodorsal, cranioventral, ventral, caudoventral e caudodorsal). Imediatamente após a coleta, o líquido ruminal foi obtido utilizando pano dessorador e o pH foi avaliado utilizando um potenciômetro digital (MB-10[®], Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). As amostras foram congeladas para as análises de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e N-NH₃. Além disso, foram utilizados nos animais colares eletrônicos de monitoramento da ruminação e atividade (HR Tags; SCR Dairy, Netanya, Israel). Os dados de ruminação foram registrados a cada 2 horas, das 00:00 h do D15 até as 00:00 h do D22. Os valores médios de cada horário foram utilizados nas análises estatísticas.

Os indicadores utilizados para avaliar o fluxo de digesta no canal omasal foram a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) para grandes partículas (GP; HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), YbCl₃ para pequenas partículas (PP; SIDDONS et al., 1985) e Co-EDTA para a fase fluida (FF; UDÉN; COLUCCI; VAN SOEST, 1980). O Co-EDTA foi preparado usando acetato de cobalto, Na-EDTA, NaOH e etanol (UDÉN; COLUCCI; VAN SOEST, 1980), enquanto que o YbCl₃ foi preparado usando Yb₂O₃ 99% (44,05 g), HCl (64 mL) e água destilada (para 1L; SIDDONS et al., 1985). As soluções de infusão foram preparadas utilizando 6,67 g/L de Co-EDTA e 8,33 mL/L de solução de Yb₂O₃, o que resultou na infusão diária de 2,91 g de Co e 2,38 g de Yb. As infusões contínuas foram realizadas utilizando duas bombas peristálticas (Modelo BP-600-4; Milan Equipamentos Científicos, Colombo, PR, Brasil) e uma taxa de 3,6 L/dia, das 09:00 h do D14 até a última coleta omasal (15:00 h do D20). Sulfato de amônio (10% de ¹⁵N, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado à solução de infusão às 08:00 h do D15 e também permaneceu até o final das coletas omasais, com uma taxa de 9 g/dia (192 mg de ¹⁵N por dia). Antes do início da infusão de ¹⁵N foi coletada uma amostra de conteúdo ruminal para a determinação do nível basal deste na digesta dos animais.

A digesta omasal foi coletada de acordo com a técnica descrita por Huhtanen, Brotz e Satter (1997) e adaptada por Leão et al. (2005), a partir das 00:00 h D18, à cada 9 horas, até as 15:00 h do D20. Em cada tempo de coleta, aproximadamente 500 mL de amostra foram obtidos. Uma subamostra (70 mL) foi usada para obter as bactérias

associadas à fase líquida (BAL) e as bactérias associadas à partícula (BAP), usando o método de Krizsan et al. (2010) que foi adaptado para menores volumes de amostra, em função da capacidade dos equipamentos: 70 mL de digesta omasal foi filtrada utilizando um pano dessorador; o sólido retido foi lavado com 44 mL de solução de NaCl 0,9% (peso/volume) e o filtrado foi centrifugado ($1000 \times g$ por 10 min. à 5 °C). O precipitado desta centrifugação e o sólido retido na primeira filtração foram diluídos em 42 mL de uma solução de NaCl 0,9% e Tween 80 0,1%; processado em liquidificador por 20 segundos e mantidos à 5 °C por 18 horas. Após este processo, as amostras foram filtradas em pano dessorador e centrifugadas ($1000 \times g$ por 10 min à 5 °C). Este sobrenadante e o sobrenadante da primeira centrifugação foram processados para a obtenção de BAP e BAL, respectivamente: as amostras foram centrifugadas à $11.250 \times g$ por 30 minutos à 5 °C; o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 50 mL de tampão McDougall. Os *pellets* de BAL e BAP foram obtidos após nova centrifugação ($16.250 \times g$ por 20 min à 5 °C). Este procedimento foi realizado a cada coleta e ao final de cada período experimental, as amostras foram agrupadas, obtendo uma amostra de BAL e outra de BAP para cada animal, em cada período de avaliação.

Outra subamostra (aproximadamente 400 mL) foi congelada e, ao final de cada período experimental, foram agrupadas em uma amostra composta (3,2 L) por vaca em cada período. Esta amostra foi filtrada em pano dessorador e lavada com 1 L de solução de NaCl 0,9%. O sólido retido no pano dessorador foi considerado GP. O filtrado foi centrifugado à $1000 \times g$ por 10 min à 5 °C, sendo o precipitado considerado PP e o sobrenadante definido como a FF (HUHTANEN; BROTZ; SATTER et al., 1997).

Todas as fezes dos animais foram coletadas das 08:00 h D15 até as 08:00 h do D18 para o cálculo da digestibilidade aparente no trato total. As fezes que tiveram contato com o chão foram classificadas como sujas, pesadas e descartadas, enquanto que as amostras que não tiveram contato com o chão foram pesadas e utilizadas nas amostragens, realizadas diariamente. Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h. A produção de leite foi registrada durante todo o período experimental, sendo apenas a produção da última semana de cada período de avaliação considerada nas análises estatísticas. Amostras de leite para avaliação da composição foram obtidas de todas as ordenhas realizadas nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental.

A coleta total de urina foi realizada usando sondas do tipo Foley (n° 24) implantadas com a utilização de espéculo vaginal e *probe* guia às 15:00 h do D18. A

coleta de urina foi realizada até as 15:00 h do D21. A urina colhida era direcionada para galões de 20 L contendo 500 mL de ácido sulfúrico 20% para promover a acidificação das amostras e evitar a precipitação dos derivados purina (CHEN; GOMES, 1992). Diariamente os galões foram pesados e amostras representativas foram coletadas.

2.4.3 Análises laboratoriais

Alimentos, sobras e fezes foram secos à 60 °C por 72 horas em estufa de ventilação forçada e processadas em moinho de facas (MA340, Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneiras de porosidade de 1 e 2 mm. As amostras de alimentos, sobras e fezes processadas à 1 mm foram analisados quanto aos teores de MS (100 °C por 24 h; AOAC 2000), matéria orgânica (1000-cinzas; método 942.05; AOAC, 2000), proteína bruta (PB, $N \times 6,25$; método de Kjeldahl 984.13; AOAC 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC 2000), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18; AOAC 2000). A fibra em detergente neutro (FDN) foi analisada usando α -amilase (UNDERSANDER; MERTENS; THEIX, 1992) e sem a adição de sulfito de sódio (Analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado de acordo com Hendrix (1993), com degradação enzimática (Amyloglucosidase®, Novozymes, Vuritiba, PR, Brasil) e leitura de glicose em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM, Barueri, SP, Brasil).

As amostras de líquido ruminal foram centrifugadas à $500 \times g$ por 15 min. Para a avaliação de $N-NH_3$, 2 mL do sobrenadante foi homogeneizado com 1 mL de ácido sulfúrico 1 N e analisado pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG-MEZNARICH, 1980). Para as análises de AGCC, 1,8 mL de amostra foi homogeneizada com 0,2 mL de ácido orto-fosfórico PA. Os AGCC foram determinados em cromatógrafo à gás (GC-2010 plus chromatograph, Shimadzu, Barueri, Brasil), equipado com amostrador automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm *df*, Restek®) e um detector de ionização de chama. Uma alíquota (1 μL) de cada amostra foi injetada utilizando uma razão de diluição 40:1, com hélio como gás carreador, a uma velocidade de 42 cm/s, em uma corrida cromatográfica de 11,5 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 300 °C, respectivamente, com a temperatura inicial da coluna de 40 °C. A rampa de temperatura da coluna começou com um aumento de 40 à 120 °C, a uma taxa de 40

°C/minuto, seguida de um aumento a uma taxa de 10 °C/minuto entre 120 e 180 °C, e de um aumento de 120 °C/minuto, entre 180 e 240 °C, permanecendo a esta temperatura por 3 minutos. A detecção dos picos foi realizada utilizando o software GCsolution v. 2.42.00.

As amostras das fases do omaso, do nível basal de ^{15}N ruminal e dos *pellets* de BAL e BAP foram liofilizadas (LH, Terroni, São Carlos, SP, Brasil) até a completa remoção da umidade. Para o fluxo omasal, uma subamostra das fases do omaso (GP, PP e FF) foi processada à 1-mm e os teores de MS, MO, PB e FDN foram determinados como previamente descrito. Outra subamostra foi processada à 150 μm , para avaliação das concentrações de Yb e Co, usando espectrofotometria de absorção (Spctr AA-800; Varian spectrometer, Harbor City, CA, USA). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP. O teor de FDNi das amostras (processadas à 2 mm) de cada fase do omaso, assim como dos alimentos e fezes foi obtido após 288 horas de incubação ruminal (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), em duas vacas previamente adaptadas a uma dieta com baixos teores de lipídios, usando saquinhos de tecido não tecido (TNT) 5×5 cm (CASALI et al., 2008). Após a incubação, as amostras foram lavadas em água corrente até total clareamento e o teor de FDN foi analisado como previamente descrito.

As análises de δ de ^{15}N (‰) foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis (CIE) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), em Botucatu/SP. As amostras (3000 a 4000 μg) foram pesadas (MX5, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, EUA) em cápsulas de estanho de 5×9 mm (Elemental Microanalysis, Okehampton, UK) e alcalinizadas pela adição de 50 μL de 72-mM K_2CO_3 . As capsulas foram mantidas em estufa à 60 °C por 24 h para volatilizar o N amoniacal. As amostras foram acondicionadas em um amostrador automático acoplado a um analisador elemental (EA 1108 – CHN – Fisons Instruments, Rodano, Italy), em que, na presença de oxigênio e óxido de cobre, o N é reduzido à N_2 . Os gases formados foram separados por uma coluna de cromatografia gasosa e analisados em espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

A composição do leite (gordura, lactose e proteína) foi analisada utilizando método ultrassônico (Lactoscan[®], Londrina, Brasil). Amostras de leite (20 mL) foram desproteinizadas com ácido tricloroacético (SHAHANI; SOMMER, 1951) e analisadas quanto ao teor de ureia, usando kit colorimétrico comercial (Bioclin[®], Belo Horizonte,

Brasil), em analisador semiautomático (SBA 200). Para a avaliação do balanço de N, as amostras de urina foram analisadas quanto ao teor de PB, de acordo com o método previamente descrito.

2.4.4 Cálculos e análises estatísticas

O fluxo omasal de nutrientes foi calculado usando os fatores de reconstituição da digesta propostos por France e Siddons (1986). A digestibilidade aparente (DA) foi calculada usando a seguinte equação:

$$DA (\%) = \left(\frac{Consumo_n - Fluxo_n}{Consumo_n} \right) \times 100\%,$$

onde: $Consumo_n$ é o consumo e $Fluxo_n$ é o fluxo (ou a excreção fecal) do nutriente n . Baseado na similaridade entre os teores basais de ^{15}N em microrganismos e na digesta (AHVENJÄRVI; VANHATALO; HUHTANEN, 2002), o nível basal de ^{15}N foi subtraído da proporção de ^{15}N nas amostras para calcular o enriquecimento de ^{15}N de cada fração. Desta forma, o fluxo de BAL e BAP foi calculado como:

$$BAL - NNA = FF_{fluxo} \times NNA_{FF} \times \left(\frac{FF_{enriq.}}{BAL_{enriq.}} \right),$$

em que: FF_{fluxo} é o fluxo de matéria seca associada à fase fluida; NNA_{FF} é o teor de nitrogênio não amoniacal na fase fluida; $FF_{enriq.}$ é o enriquecimento de ^{15}N da fase fluida e $BAL_{enriq.}$ é o enriquecimento de ^{15}N do *pellet* de bactérias associadas à fase líquida.

$$BAP - NNA = PP_{fluxo} \times NNA_{PP} \times \left(\frac{PP_{enriq.}}{BAP_{enriq.}} \right) + GP_{fluxo} \times NNA_{GP} \times \left(\frac{GP_{enriq.}}{BAP_{enriq.}} \right),$$

em que: é o fluxo de matéria seca associado às pequenas partículas; NNA_{PP} é o teor de nitrogênio não amoniacal nas pequenas partículas; $PP_{enriq.}$ é o enriquecimento de ^{15}N das pequenas partículas; $BAP_{enriq.}$ é o enriquecimento de ^{15}N das bactérias aderidas à partícula; GP_{fluxo} é o fluxo de matéria seca associado às grandes partículas; é o teor de nitrogênio não amoniacal nas grandes partículas; e $GP_{enriq.}$ é o enriquecimento de ^{15}N das grandes partículas.

O fluxo de NNANM foi considerado como o fluxo de proteína não degradável no rúmen, sendo corrigido para o fator 6,25. O N verdadeiramente digerido no rúmen

foi calculado utilizando o consumo de N e o fluxo de NNANM. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de teor de gordura, de acordo com Sklan et al. (1992).

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.3, SAS Instituto Inc., Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + v_{j:i} + P_k + PDR_l + SCAG_m + PDR \times SCAG_{lm} + e_{ijklm}$$

com: $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, e $e_{ijklm} \approx N(0; \sigma_e^2)$; onde: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quadrado Latino ($i = 1$ e 2); $v_{j:i}$ = efeito aleatório da vaca dentro de cada quadrado Latino ($j = 1$ à 8); P_k = efeito fixo do período experimental ($k = 1$ à 4); PDR_l = efeito fixo do nível de PDR ($l = 1$ e 2); $SCAG_m$ = efeito fixo do nível de SCAG ($m = 1$ e 2); $PDR \times SCAG_{lm}$ = efeito de interação; e_{ijklm} = erro residual aleatório; N = distribuição normal; σ_v^2 = variância associada ao efeito aleatório de animal dentro de quadrado Latino; σ_e^2 = variância residual.

Os dados de fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo, usando o PROC MIXED e o seguinte modelo:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + v_{j:i} + P_k + PDR_l + SCAG_m + PDR \times SCAG_{lm} + \omega_{ijklm} + T_n \\ + T \times PDR_{nl} + T \times SCAG_{nm} + T \times PDR \times SCAG_{nlm} + e_{ijklmn}$$

com: $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, $\omega_{ijklm} \approx N(0; \sigma_\omega^2)$ e $e_{ijklmn} \approx MVN(0; R)$; onde Y_{ijklmn} = variável dependente; $\mu, Q_i, v_{j:i}, P_k, PDR_l, SCAG_m$ e $PDR \times SCAG_{lm}$ foram previamente definidos; ω_{ijklm} = erro residual associado com as unidades experimentais (vaca em cada período experimental); T_n = efeito fixo do tempo de coleta ($n = 1$ a 9 para fermentação ruminal e 1 à 12 para o tempo de ruminação); $T \times PDR_{nl}$, $T \times SCAG_{nm}$, e $T \times PDR \times SCAG_{nlm}$ = efeitos de interação; e_{ijklmn} = erro experimental; N = distribuição normal; σ_v^2 = variância associada com o efeito de vaca; σ_ω^2 = variância associada com as unidades experimentais (vaca dentro de período); MVN = indica variâncias múltiplas com distribuição normal; e R = matriz de variância e covariância usada para modelar as variâncias das medidas repetidas. Foram avaliadas as matrizes CS, CSH, AR(1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1), sendo utilizado o critério Baisiano para identificar a mais adequada ao conjunto de dados. Para todas as análises, foi considerado um nível de significância de 5%, sendo valores entre 5 e 10% considerados como tendência.

2.5 RESULTADOS

Não houve interação ($P \geq 0,154$) entre os efeitos de PDR e SCAG sobre as variáveis relacionadas ao consumo e à fermentação ruminal (Tabela 2.2). A adição de SCAG reduziu ($P \leq 0,010$) o consumo de MS, MO, amido e PB, e aumentou ($P < 0,001$) o consumo de EE. O maior nível de PDR tendeu ($P = 0,096$) a reduzir o consumo de PB. A adição de SCAG aumentou ($P = 0,015$) o pH ruminal e tendeu ($P \leq 0,093$) a aumentar a concentração ruminal de butirato, assim como o tempo de ruminação. Com o aumento do nível de PDR da dieta houve aumento ($P < 0,001$) da concentração ruminal de N-NH₃ e tendência ($P = 0,057$) de redução da relação entre as concentrações ruminiais de acetato e propionato.

Tabela 2.2 - Consumo de matéria seca e nutrientes e fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
<i>Consumo, kg/d</i>								
Matéria seca	23,6	22,7	23,4	21,6	0,34	0,006	0,147	0,338
Matéria orgânica	21,7	21,0	21,6	20,0	0,31	0,007	0,166	0,278
FDN ⁶	7,88	7,49	7,69	7,10	0,121	0,010	0,104	0,538
Amido	6,74	6,00	7,00	5,95	0,097	<0,001	0,378	0,216
Proteína bruta	4,04	3,88	3,99	3,67	0,057	0,003	0,096	0,269
Extrato etéreo	0,604	1,26	0,611	1,21	0,0116	<0,001	0,137	0,154
<i>Metabolismo ruminal</i>								
pH	6,08	6,13	6,09	6,18	0,019	0,015	0,257	0,467
N-NH ₃ , mg/dL	17,6	17,1	22,0	21,0	0,37	0,273	<0,001	0,706
AGCC total ⁸ , mM	118	116	117	115	1,2	0,322	0,626	0,774
Acetato (A), mM	69,8	68,7	68,4	67,9	0,61	0,424	0,274	0,795
Propionato (P), mM	26,8	27,2	27,7	27,2	0,36	0,881	0,413	0,312
Razão A:P	2,63	2,56	2,52	2,55	0,022	0,509	0,057	0,163
Butirato, mM	15,8	15,3	16,0	15,0	0,32	0,093	0,870	0,575
AGCR ⁹ , mM	4,93	4,86	4,86	4,78	0,107	0,730	0,747	0,986
Ruminação, min/h	20,2	21,2	20,7	21,6	0,28	0,076	0,695	0,314

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

⁶FDN: fibra em detergente neutro;

⁷FDNi: fibra em detergente neutro indigestível;

⁸Concentração total de ácidos graxos de cadeia curta;

⁹Ácidos graxos de cadeia ramificada.

Apesar de APDR tender ($P = 0,080$) a reduzir o fluxo omasal de PB, o nível de PDR da dieta não afetou ($P \geq 0,155$) o fluxo omasal de MS, MO e FDN (Tabela 2.3). Por outro lado, a inclusão de SCAG reduziu ($P \leq 0,013$) a digestibilidade ruminal da MS e MO e tendeu ($P = 0,096$) a diminuir a digestibilidade ruminal da FDN, sem afetar ($P = 0,102$) a digestibilidade aparente ruminal da PB, em relação a -SCAG. Os fatores dietéticos avaliados não afetaram ($P \geq 0,157$) a digestibilidade aparente no trato total da MS, MO, PB e FDN. Os elevados teores de PDR e a adição de SCAG aumentaram ($P \leq 0,048$) a digestibilidade aparente total do amido.

Tabela 2.3 - Fluxo omasal e digestibilidade aparente ruminal e no trato total da MS, MO, FDN e PB de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
<i>Fluxo omasal, kg/d</i>								
Matéria seca	13,6	14,2	13,1	13,0	0,28	0,642	0,120	0,446
Matéria organica	9,95	10,3	10,0	9,67	0,17	0,965	0,327	0,256
FDN ⁶	5,14	4,95	4,94	4,72	0,093	0,173	0,155	0,911
Proteína bruta	3,55	3,55	3,40	3,28	0,068	0,565	0,080	0,592
<i>Digestibilidade aparente ruminal, %</i>								
Matéria seca	42,2	37,4	43,7	39,9	0,91	0,013	0,215	0,733
Matéria orgânica	54,1	51,1	53,7	51,6	0,46	0,003	0,931	0,551
FDN ⁶	34,8	33,9	36,0	33,4	0,62	0,096	0,794	0,482
Proteína bruta	11,8	8,52	15,0	10,8	1,39	0,102	0,224	0,825
<i>Digestibilidade aparente total, %</i>								
Matéria seca	68,2	67,1	68,3	67,9	0,56	0,352	0,636	0,718
Matéria orgânica	70,7	70,3	71,0	70,5	0,54	0,565	0,733	0,991
FDN ⁶	36,5	37,6	39,8	36,2	1,29	0,631	0,704	0,347
Amido	93,4	93,9	93,7	94,8	0,21	0,014	0,048	0,342
Proteína bruta	69,6	69,6	71,5	70,1	0,50	0,382	0,157	0,396

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

⁶FDN: fibra em detergente neutro;

Não houve interação ($P \geq 0,164$) entre os efeitos de SCAG e PDR sobre as variáveis relacionadas ao metabolismo ruminal de nitrogênio (Tabela 2.4). A adição de SCAG reduziu ($P = 0,039$) o fluxo de NNA na fase GP e não afetou ($P \geq 0,317$) o fluxo de NNANM e o fluxo total de NNA, apesar de ter aumentado ($P = 0,032$) a eficiência de crescimento microbiano medido pela relação entre o fluxo de NM e a matéria orgânica verdadeiramente digerida no rúmen. Ademais, a adição de SCAG reduziu ($P = 0,043$) o suprimento absoluto de PDR, sem afetar ($P = 0,616$) o teor de PDR, relativo ao consumo de matéria seca. Animais alimentados com APDR apresentaram menor ($P \leq 0,038$) fluxo de PNDR e de NNA associado com GP do que os animais consumindo BPDR. No entanto, não houve efeito ($P = 0,719$) do nível de PDR da dieta sobre a síntese de PM. Consequentemente, APDR aumentou ($P = 0,012$) a digestibilidade verdadeira do N e a proporção microbiana no NNA total, enquanto o fluxo total de NNA tendeu ($P = 0,068$) a reduzir com o aumento do nível de PDR da dieta. Os fatores dietéticos avaliados não afetaram ($P \geq 0,112$) a eficiência microbiana medida pela relação entre o fluxo de NM e o consumo de NDT ou NDT descontado de EE.

A adição de SCAG aumentou ($P = 0,043$) a produção de leite e reduziu ($P < 0,001$) a concentração de gordura no leite, resultando em redução ($P < 0,001$) da produção de gordura e da produção de leite corrigida para o teor de gordura (Tabela 2.5). Além disso, +SCAG aumentou ($P < 0,001$) a eficiência alimentar (razão entre produção de leite e consumo de matéria seca), em relação a -SCAG. A dieta contendo BPDR tendeu ($P \leq 0,072$) a aumentar a produção de leite e reduzir o teor de N ureico do leite. No entanto, o aumento do nível de PDR da dieta aumentou ($P \leq 0,003$) os teores de lactose e proteína no leite.

Tabela 2.4 - Metabolismo ruminal do nitrogênio em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Consumo N, g/d	646	620	639	588	9,0	0,003	0,094	0,267
PDR ⁶								
g/d	2643	2489	2741	2539	54,0	0,043	0,377	0,774
%CMS ⁷	11,2	11,0	11,8	11,7	0,14	0,616	0,022	0,754
Fluxo PNDR ⁸								
g/d	1397	1389	1255	1133	35,1	0,317	0,006	0,382
%CMS ⁷	5,91	6,11	5,31	5,23	0,135	0,826	0,008	0,584
N verdadeiramente digerido no rúmen								
g/d	423	398	439	406	8,6	0,043	0,377	0,773
% CN	65,5	64,3	68,9	69,2	0,80	0,768	0,012	0,618
Fluxo de NNA ⁹ , g/d								
FF ¹⁰	180	182	145	174	8,6	0,367	0,215	0,454
PP ¹¹	149	179	189	182	10,9	0,504	0,211	0,265
GP ¹²	262	229	229	190	8,3	0,039	0,038	0,849
Total	591	591	563	545	11,2	0,634	0,068	0,650
NNANM ¹³								
g/d	224	222	201	181	5,6	0,317	0,006	0,382
% NNA ⁹	37,6	37,5	35,2	33,3	0,60	0,409	0,012	0,449
NNA BAL ¹⁴								
g/d	154	161	126	154	7,6	0,276	0,270	0,513
% NNA mic.	41,8	43,0	35,1	41,7	1,58	0,171	0,162	0,334
NNA BAP ¹⁵								
g/d	214	208	236	210	6,0	0,032	0,099	0,164
% NNA mic.	58,2	57,0	64,9	58,3	1,58	0,171	0,162	0,334
NNA microbiano								
g/d	368	369	362	363	7,8	0,938	0,719	0,986
% NNA	62,4	62,5	64,8	66,7	0,60	0,408	0,012	0,449
Eficiência microbiana								
g NNA/ kg MOVDR ¹⁶	26,6	28,9	26,9	29,4	0,59	0,032	0,722	0,933
g NNA/ kg NDT	23,1	24,0	22,5	24,8	0,49	0,112	0,933	0,466
g NNA/kg NDTd	28,9	29,5	27,9	30,3	0,63	0,239	0,939	0,453

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeito de SCAG e PDR;⁶Proteína degradável no rúmen;⁷Consumo de matéria seca;

- ⁸Proteína não degradável no rúmen;
⁹Nitrogênio não amoniacal;
¹⁰Fase fluida;
¹¹Pequenas partículas;
¹²Grandes partículas;
¹³Nitrogênio não amoniacal e não microbiano;
¹⁴Bactéria associada à fase líquida;
¹⁵Bactéria associada à partícula;
¹⁶Materia orgânica verdadeiramente digerida no rúmen.

Tabela 2.5 - Produção e composição do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
<i>Produção, kg/d</i>								
Leite	31,7	33,0	30,8	31,8	0,625	0,043	0,055	0,776
3,5% PLC ⁶	31,1	28,7	30,6	27,6	0,722	<0,001	0,185	0,597
Lactose	1,51	1,57	1,49	1,53	0,030	0,113	0,285	0,679
Gordura	1,07	0,89	1,06	0,85	0,030	<0,001	0,334	0,553
Proteína	1,01	1,05	1,00	1,02	0,020	0,110	0,296	0,693
<i>Composição do leite %</i>								
Lactose	4,77	4,77	4,87	4,81	0,025	0,280	0,003	0,217
Gordura	3,41	2,71	3,50	2,69	0,057	<0,001	0,471	0,281
Proteína	3,18	3,18	3,24	3,21	0,017	0,321	0,002	0,244
NUL ⁷	16,8	17,2	18,4	18,2	0,49	0,863	0,072	0,641
PL:CMS ⁸	1,34	1,45	1,31	1,47	0,022	<0,001	0,710	0,466

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

⁶Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (SKLAN et al., 1992).

⁷Nitrogênio ureico do leite;

⁸Razão entre produção de leite e consumo de matéria seca.

A adição de SCAG na dieta não afetou ($P \geq 0,281$) as excreções de N na urina e nas fezes, aumentou ($P < 0,001$) a secreção de N no leite (% do consumo de N) e reduziu ($P \leq 0,036$) o balanço de N (Tabela 2.6). Adicionalmente, dietas com APDR tenderam ($P \leq 0,088$) a reduzir a excreção absoluta de N nas fezes e o balanço de N, além de reduzir ($P = 0,021$) a excreção relativa na urina.

Tabela 2.6 - Balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Consumo de N (CN)								
g/d	646	620	639	588	9,0	0,003	0,094	0,267
N fecal								
g/d	197	189	183	176	4,7	0,281	0,074	0,983
%CN	30,4	30,4	28,5	29,9	0,50	0,382	0,156	0,394
N urinário								
g/d	186	188	212	195	4,8	0,455	0,101	0,311
%CN	29,2	30,5	33,8	33,3	0,89	0,776	0,021	0,527
Volume, L/d	19,4	23,5	21,7	20,7	1,89	0,421	0,883	0,184
N leite								
g/d	161	167	159	163	3,2	0,109	0,295	0,690
%CN	24,8	26,9	24,7	27,7	0,38	<0,001	0,452	0,368
Balanço de N								
g/d	103	75,9	84,4	53,9	6,49	0,020	0,088	0,863
%CN	15,7	12,1	13,0	9,15	0,928	0,036	0,101	0,923

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

2.6 DISCUSSÕES

No presente estudo, a adição de SCAG na dieta reduziu o consumo de matéria seca. Vários estudos têm mostrado o efeito negativo da suplementação com fontes lipídicas ricas em ácidos graxos insaturados sobre o consumo em vacas leiteiras (BARLETTA et al., 2016; BETTERO et al., 2017; SOUZA; BATISTEL; SANTOS, 2017). De acordo com Allen (2000), a aceitabilidade da fonte lipídica, a liberação de hormônios intestinais e a oxidação hepática de lipídios são os principais fatores relacionados com a inibição do consumo. Choi, Palmquist e Allen (1996) destacam que o aumento da concentração de colecistoquinina e polipeptídeos pancreáticos estão associados com a redução do consumo de vacas alimentadas com dietas suplementadas com lipídios.

Bettero et al. (2017) mostraram uma relação direta entre a digestibilidade ruminal da FDN e o consumo de matéria seca em vacas leiteiras durante o período seco. No presente estudo, além de reduzir o consumo, a adição de SCAG tendeu a reduzir a digestibilidade ruminal da FDN e reduziu a digestibilidade ruminal da MS e MO. Em adição, a redução da produção de leite corrigida para o teor de gordura, associado ao aumento da densidade energética da dieta facilita o atendimento das exigências nutricionais com menores níveis de consumo, sem afetar o ganho de peso dos animais (dados não apresentados), como observado no presente estudo.

Harvatine e Allen (2006) associaram o aumento do tempo de ruminação nos animais alimentados com fontes lipídicas com o aumento da distensão do ruminoretículo. De acordo com Moallem et al. (2010), o tempo de ruminação necessário por unidade de MS consumida está fortemente relacionado à qualidade da fibra dietética. Desta forma, o aumento do tempo de ruminação e a redução da digestão ruminal da fibra observados no presente estudo, parecem associados. Ainda, o fluxo de saliva é maior durante a ruminação do que durante os períodos de alimentação e descanso (CASSIDA; STOKES, 1999). Considerando a elevada capacidade tampão da saliva, os animais alimentados com +SCAG apresentaram maior pH ruminal do que aqueles alimentados com -SCAG.

Apesar do efeito negativo da adição de SCAG sobre a digestibilidade ruminal dos nutrientes, nenhuma diferença foi observada na digestibilidade aparente no trato total. A digestão compensatória da FDN potencialmente digestível no pós-rúmen é a explicação mais aceita para esta diferença (HARVATINE; ALLEN, 2006). Desta forma, Weld e Armentano (2017) mostraram aumento de 3,2% na digestibilidade aparente total da FDN, em dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, em relação às dietas com baixos teores de lipídios. De acordo com estes autores, no entanto, o mecanismo envolvido neste processo não está completamente elucidado.

O aumento do nível de PDR reduziu o consumo de PB, o que parece associado com as diferenças na composição da dieta e do comportamento alimentar dos animais. Broderick e Reynal (2009) avaliaram teores crescentes de ureia na PDR da dieta e mostraram redução linear no consumo. No presente estudo, as dietas APDR e BPDR apresentaram similar consumo de MS ($P = 0,147$), apesar das médias observadas serem 0,55 kg/d (2,5%) menores nos animais alimentados com APDR. Em adição, os animais tendem a selecionar concentrados e alimentos proteicos, principalmente aqueles ricos

em proteína verdadeira, como o farelo de soja, em detrimento da ureia, favorecendo o consumo de proteína dos animais alimentados com BPDR.

A redução da relação entre as concentrações de acetato e propionato tem sido associada com o aumento da digestibilidade ruminal do amido (FREDIN et al., 2015). No presente estudo, os animais alimentados com APDR apresentaram maior digestibilidade aparente total do amido e menor relação entre as concentrações ruminais de acetato e propionato. Por outro lado, apesar de Broderick (1986) ter relacionado a concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada ruminal com a degradação ruminal da proteína, o nível de PDR e a adição de SCAG não afetaram a concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada no presente estudo.

A adição de SCAG reduziu o nitrogênio verdadeiramente digerido no rúmen e o suprimento de PDR, em valores absolutos, sem afetar ambas as variáveis, quando expressas em função do consumo. Doureau e Ferlay (1995) destacaram a ausência de evidências experimentais do efeito da suplementação lipídica sobre a degradação ruminal do N. Desta forma, as diferenças na quantidade de N verdadeiramente digerido no rúmen podem ser atribuídas à redução do consumo. A ausência de efeitos do SCAG sobre o suprimento de PNDR reforça esta teoria. De acordo com os mesmos autores, o aumento da eficiência de síntese microbiana estaria associado à suplementação com ácidos graxos saturados e monoinsaturados. No entanto, no presente estudo, a adição de uma fonte rica em ácidos graxos poli-insaturados resultou em aumento da eficiência de síntese microbiana. Os principais fatores associados a este aumento são a redução da população de protozoários ruminais, sabidamente ineficientes em fornecer PM e a redução da digestibilidade ruminal da MO (DOUREAU; FERLAY, 1995), o que também ocorreu no presente estudo.

Independentemente das dietas, BAL e BAP foram responsáveis por 40,4 e 59,6% do fluxo de PM. De maneira similar, Brito, Broderick e Reynal (2006) encontraram 45 e 55%, enquanto Broderick e Reynal (2009) encontraram 44 e 56% para a importância de BAL e BAP, respectivamente. Apesar da ausência de diferenças no fluxo omasal de NNA, os animais alimentados com +SCAG apresentaram menor fluxo de NNA associado com GP e menor fluxo de BAP. Este efeito parece estar associado ao mesmo mecanismo que reduz digestibilidade ruminal da fibra. Como a fibra é retida principalmente na GP, uma menor digestibilidade, associada à redução de consumo, atrasa o *turnover* ruminal e reduz o substrato para o crescimento de microrganismos aderidos. Independentemente da dieta, os valores observados de fluxo de NNA e PDR

foram maiores do que aqueles previamente estimados pelo modelo do NRC (2001). Reynal e Broderick (2005) mostraram estes mesmos erros nas estimativas de suprimento de PDR e a subestimativa da síntese de proteína microbiana neste sistema. De acordo com estes autores, estes erros de estimativa podem ser atribuídos a baixa acurácia da estimativa das taxas de degradação obtidas em ensaios *in situ* de avaliação de alimentos.

Uma das nossas hipóteses foi que a adição de SCAG poderia interagir com os diferentes teores de PDR da dieta, modificando o metabolismo ruminal do N. No entanto, nenhum efeito de interação foi observado para estas variáveis. Reynal e Broderick (2005) sugeriram que uma concentração de N-NH₃ de 11,8 mg/dL é capaz de maximizar a síntese proteica. Como nós encontramos 17,3 mg/dL, mesmo nas dietas BPDR, nenhuma diferença no fluxo de PM foi encontrada. Como esperado, as dietas com menor PDR apresentaram maior fluxo de PNDR, uma vez que as dietas eram isonitrogenadas. Este aumento do fluxo de PNDR resultou em aumento do fluxo de NNA na GP, visto que esta é a principal fração pela qual a proteína do farelo de soja *bypass* deixa o rúmen. Broderick (1986) também encontrou efeito positivo do tratamento térmico do farelo de soja sobre o escape ruminal do N, sugerindo que um menor consumo de farelo de soja *bypass* poderia atender às mesmas exigências nutricionais do que uma quantidade maior de farelo de soja tradicional. No presente estudo, o aumento da PNDR, observado nas dietas BPDR resultou em aumento do fluxo de NNA e tendência de aumento da produção de leite. Estudando diferentes teores dietéticos de PNDR na dieta de vacas leiteiras, Kaufman et al. (2018) encontraram efeito positivo na produção de leite, embora os teores de lactose e proteína tenham se reduzido em vacas pluríparas. Apesar do aumento do fluxo de NNA prover mais substratos para a síntese de compostos do leite, no presente estudo, as dietas com BPDR também resultaram em redução dos teores de lactose e proteína, o que pode ser atribuído a um efeito de diluição, uma vez que os animais produziram mais leite.

A adição de SCAG aumentou em 3,7% a produção de leite. O efeito positivo dos SCAG parece estar associado ao aumento da densidade energética da dieta e à redução do teor de gordura do leite. De acordo com Souza, Batistel e Santos (2017), a suplementação lipídica aumenta a densidade energética da dieta e a eficiência energética de vacas em lactação por promover a incorporação direta de ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite e gerar energia mais eficientemente do que a conversão a produção de AGCC. Em adição, a depressão da gordura do leite reduz a oxidação de

glicose para a síntese de gordura do leite, o que fornece substrato adicional para a síntese dos demais compostos (PALMQUIST; JENKINS, 1980). A depressão da gordura do leite em vacas alimentadas com fontes de ácidos graxos poli-insaturados é bem documentada na literatura (BAUMAN; GRIINARI, 2003; BARLETTA et al., 2016). Em uma meta-análise, Rabie et al. (2012) observaram aumento de 1,05 kg/d na produção de leite em resposta à suplementação lipídica, o que é muito similar ao 1,15 kg/d encontrado no presente estudo.

No presente estudo, a suplementação lipídica melhorou a eficiência de uso do N e reduziu o balanço de N. De acordo com Broderick et al. (2010), a eficiência de incorporação do N no leite é inversamente relacionada ao teor de PB da dieta e a taxa de degradação ruminal desta e diretamente relacionada à eficiência de síntese microbiana. A adição de SCAG reduziu o consumo, sem afetar a digestibilidade aparente do N no trato gastrointestinal. Como as dietas contendo SCAG apresentaram maior produção de leite, com similar teor de proteína, o balanço de N foi reduzido. O aumento da disponibilidade de glicose, associado com o aumento da produção de leite e a inibição da síntese *de novo* de ácidos graxos pode favorecer a síntese proteica, resultando em aumento da eficiência de secreção de proteínas no leite.

As dietas com APDR apresentaram aumento da excreção urinária de N, com redução das perdas fecais e do balanço de N, sem afetar a eficiência bruta de utilização do N. O processamento térmico do farelo de soja para a produção do farelo *bypass* aumenta os teores de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) e neutro (PIDN) das dietas (Tabela 2.1) e consequentemente reduz a disponibilidade do N no trato total. De acordo com Wang et al. (2014), a razão entre PDR e PNDR da dieta afeta diretamente a partição entre excreção fecal e urinária: uma alta razão aumenta as perdas urinárias, reduzindo as perdas fecais e vice-versa. O aumento do nível de PDR da dieta aumenta a digestibilidade ruminal e o nitrogênio é absorvido principalmente na forma amoniacal (MUTSVANGWA et al., 2016). Esta amônia é metabolizada até ureia no fígado, excretada na urina ou na forma de nitrogênio ureico do leite, os quais apresentaram maiores valores nas dietas APDR.

2.7 CONCLUSÕES

Animais alimentados com SCAG apresentam menor consumo e aumento no tempo de ruminação, na eficiência de síntese de proteína microbiana e na produção de

leite. O aumento do nível de PDR da dieta reduz o fluxo pós ruminal de NNA, as perdas fecais de N e a produção de leite, com aumento das perdas urinárias de N. Apesar dos resultados indicarem ausência de interação entre os fatores citados sobre o metabolismo ruminal do N e no desempenho animal, a adição de SCAG e a utilização de baixos teores de PDR na dieta podem maximizar o desempenho produtivo e aumentar a eficiência de uso dos nutrientes em vacas leiteiras.

2.8 REFERÊNCIAS

- AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; VARVIKKO, T. Determination of reticulorumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. **British Journal of Nutrition**, v. 83, n. 1, p. 67-77, 2000.
- AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2176-2187, 2002.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.
- BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; BETTERO, V. P.; ARAUJO, C. E.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; FERREIRA DE JESUS, E.; MINGOTI, R. D.; BENEVENTO, B. C.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, n. 9, p. 111-121, 2016.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 203-27, 2003.
- BETTERO, V. P.; DEL VALLE, T. A.; BARLETTA, R. V.; ARAÚJO, C. E.; FERREIRA DE JESUS, E.; ALMEIDA, G. F.; TAKIYA, C. S.; ZANFERARI, F.; PAIVA, P. G.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.. Use of protected fat sources to reduce fatty acid biohydrogenation and improve abomasal flow in dry dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 224, n. 2, p. 30-38, 2017.
- BRITO, A. F.; BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of varying dietary ratios of alfalfa silage to corn silage on omasal flow and microbial protein synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3939-3953, 2006.
- BRODERICK, G. A. Relative value of solvent and expeller soybean meal for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 11, p. 2948-2958, 1986.
- BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino-acids in ruminal fluid and in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 64-75, 1980.
- BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, 2009.
- BRODERICK, G. A.; HUHTANEN, P.; AHVENJÄRVI, S.; REYNAL, S. M.; SHINGFIELD, K. J. Quantifying ruminal nitrogen metabolism using the omasal sampling technique in cattle -

A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3216-3230, 2010.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.

CASSIDA, K. A.; STOKES, M. R. Eating and resting salivation in early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 5, p. 1282-1292, 1986.

CHOI, B. R.; PALMQUIST, D. L.; ALLEN, M. S. Effects of endogenous cholecystokinin (CCK) on feed intake, plasma insulin, pancreatic polypeptide (PP) and metabolite levels in heifers fed fat. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. S1, p. 169, 1996.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**, v. 43, n. 2, p. 97-110, 2005.

FRANCE J.; SIDDON, R. C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 121, n. 1, p. 105-119, 1986.

FREDIN, S. M.; FERRARETTO, L. F.; AKINS, M. S.; BERTICS, S. J.; SHAVER, R. D. Effects of corn-based diet starch content and corn particle size on lactation performance, digestibility, and bacterial protein flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 541-553, 2015.

GANDRA, J. R.; BARLETTA, R. V.; MINGOTI, R. D.; VERDURICO, L. C.; FREITAS JUNIOR, J. E.; OLIVEIRA, L. J.; TAKIYA, C. S.; KFOURY JR., J. R.; WILTBANK, M. C.; RENNÓ, F. P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4590-4606, 2016.

GARDINAL, R.; CALOMENI, G. D.; ZANFERARI, F.; VENDRAMINI, T. H. A.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; RENNÓ, F. P. Different durations of whole raw soybean supplementation during the prepartum period: Milk fatty acid profile and oocyte and embryo quality of early-lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 675-689, 2018.

HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, Gainesville p. A-25 (Bulletin, 339). 2000.

HARVATINE, K. J., ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on feed intake, and feeding and chewing behavior of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 1104-1112, 2006.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n. 3, p. 211-227, 1994.

HUHTANEN, P.; BROTZ, P. G.; SATTER, L. D. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1380-1392, 1997.

KAUFMAN, J. D.; POHLER, K. G.; MULLINIKS, J. T.; RÍUS, A. G. Lowering rumen-degradable and rumen-undegradable protein improved amino acid metabolism and energy utilization in lactating dairy cows exposed to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 386-395, 2018.

KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G. A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1138-1147, 2010.

- LE BLAY, G.; MICHEL, C.; BLOTTIÈRE, H. M.; CHERBU, C. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. **British Journal of Nutrition**, v. 82, n. 5, p. 419-426, 1999.
- LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; RENNÓ, L. N.; CECOM, P. R.; AZEVEDO, J. A. G.; GONÇALVES, L. C.; VALADARES, R. F. D. Intake and total and partial digestibility of total carbohydrates, neutral detergent fiber and nonfiber carbohydrates in steers under three ingestion regimes and two method of digesta collections: abomasal and omasal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 670-678, 2005.
- MACHADO, M. G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; BENTO, C. P. B.; MARCONDES, M. I.; ASSUNÇÃO, A. S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, n. 12, p. 132-148, 2016.
- MOALLEM, U.; LEHRER, H.; ZACHUT, M.; LIVSHITZ, L.; YACOBY, S. Production performance and pattern of milk fat depression of high-yielding dairy cows supplemented with encapsulated conjugated linoleic acid. **Animal**, v. 4, n. 4, p. 641-652, 2010.
- MUTSVANGWA, T.; DAVIES, K. L.; MCKINNON, J. J.; CHRISTENSEN, D. A. Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6298-6310, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC.: NRC, 1985. 148 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: NRC, 2001. 381 p.
- OWENS, F. N.; QI, S.; SAPIENZA, D. A. Invited review: Applied protein nutrition of ruminants - Current status and future directions. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2, p. 150-179, 2014.
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 1-14, 1980.
- RABIEE, A. R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDER, H. M.; BLOCK, E.; LEAN, I. J. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and metaregression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3225-3247, 2012.
- REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, 2005a.
- REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, v. 11, p. 4065-4082, 2005b.
- ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L. F.; PAULINO, M. F.; MARCONDES, M. I.; LOBO, A. A.; VILLADIEGO, F. A. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugarcane. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2996-3006, 2014a.
- ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S. C.; COSTA E SILVA, L. F.; DETMANN, E.; VILLADIEGO, F. A. C.; ENGLE, T. E.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, B. C.; PACHECO, M. V. C.; ZANETTI, D. Comparison of purine bases and ¹⁵N for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu crossbreed bulls. **Livestock Science**, v. 167, p. 144-153, 2014b.
- RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net

carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets – I: ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

SHAHANI, K. M.; SOMMER, H. H. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. I. Methods of analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 34, n. 10, p. 1010-1013, 1951.

SIDDONS, R. C.; PARADINE, J.; BEEVER, D. E.; CORNELL, P. R. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. **British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 509-519, 1985.

SKLAN, D. R.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463-2472, 1992.

SOUZA, J.; BATISTEL, F.; SANTOS, F. A. P. Effect of sources of calcium salts of fatty acids on production, nutrient digestibility, energy balance, and carryover effects of early lactation grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 1072-1085, 2017.

UDÉN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta - rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, n. 7, p. 625-632, 1980.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. Omaha: National Forage Testing Association, 1992. 139 p.

WANG, C.; LIU, J. X.; ZHAI, S. W.; LAI, J. L.; WU, Y. M. Effects of rumen-degradable-protein to rumen-undegradable-protein ratio on nitrogen conversion of lactating dairy cows. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 58, n. 2, p. 100-103, 2008.

WELD, K. A.; ARMENTANO, L. E. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1766-1779, 2017.

WHITE, R. R.; ROMAN-GARCIA, Y.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P.; VANDEHAAR, M. J.; TRAN, H.; MCGILL, T.; GARNETT, R.; HANIGAN, M. D. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations. 2. Rumen degradable and undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3611-3627, 2017.

3 AVALIAÇÃO DE ^{15}N E BASES PURINAS COMO INDICADORES DE FLUXO MICROBIANO, FRAÇÃO ENDÓGENA E RECUPERAÇÃO URINÁRIA DE DERIVADOS DE PURINAS EM VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM LIPÍDIOS

3.1 RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a utilização de ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores de fluxo microbiano em vacas leiteiras. Adicionalmente, avaliaram-se os efeitos da adição de sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) em dietas com diferentes teores de proteína degradável no rúmen (PDR) sobre o fluxo de BP, a recuperação de derivados purina (DP) na urina e a excreção de DP de origem endógena. Oito vacas em lactação, multíparas e canuladas no rúmen foram usadas em delineamento em quadrado Latino 4×4 , em arranjo fatorial 2×2 de tratamentos. Os tratamentos foram obtidos pela combinação da suplementação com SCAG (-SC: sem suplementação; e +SC: com 3,32% MS de SCAG); e o nível de PDR (BPDR: baixo PDR, com 9,8% MS de PDR; e APDR: alto PDR, com 11,0% de PDR na MS da dieta). O fluxo de digesta pós ruminal foi avaliado utilizando sistema de triplo indicador. As bactérias associadas à partícula (BAP) apresentaram menor ($P \leq 0,008$) enriquecimento com ^{15}N e relação N purinas: N total microbiano do que as bactérias associadas à fase líquida (BAL). O aumento da concentração de PDR da dieta reduziu ($P = 0,007$) o enriquecimento e tendeu ($P \leq 0,095$) a reduzir a concentração de BP nos *pellets* de bactéria. A utilização de BP como indicador superestimou ($P \leq 0,002$) o fluxo microbiano, especialmente de BAL. No entanto, para o fluxo microbiano associado à partícula, houve tendência à interação ($P = 0,067$) entre os efeitos de indicador e da suplementação lipídica. Na presença de SCAG, BP e ^{15}N apresentaram ($P > 0,05$) estimativas similares, enquanto que na ausência de SCAG, BP subestimou ($P \leq 0,05$) o fluxo de BAP, em relação ao ^{15}N . O aumento do nível de PDR da dieta tendeu a reduzir ($P = 0,061$) o fluxo omasal de BP e reduziu ($P = 0,007$) a recuperação urinária desta. A recuperação urinária de DP foi variável (33,9% de coeficiente de variação). As estratégias nutricionais avaliadas não afetaram ($P \geq 0,108$) a excreção urinária de creatinina e DP de origem endógena. As excreções diárias de creatinina e DP de origem endógena foram de 0,262 mmol/kg e 0,640 mmol/kg^{0,75}, respectivamente. As BP

superestimam o fluxo microbiano, especialmente das BAL, pela presença de BP de origem dietética. A suplementação lipídica afeta a relação entre as estimativas de fluxo de BAP utilizando ^{15}N e BP, levando à baixa correlação entre as estimativas com as duas técnicas. A recuperação urinária dos DP foi variável e aumentou com o aumento do nível de PDR da dieta. As excreções de creatinina e a excreção endógena de DP não foram afetadas pelos tratamentos avaliados.

Palavras-chave: Alantoína, bactéria, isótopo, proteína microbiana.

3.2 ABSTRACT

The present study evaluated the use of ^{15}N and purines basis (PB) as markers of microbial ruminal outflow in dairy cows. Additionally, the effects of calcium salts of fatty acids (CSFA) on diets with different levels of rumen degradable protein (RDP) on the PB omasal flow, urinary recover of purines derivatives (PD) and the excretion of endogenous PD. Eight Holstein lactating, multiparous, and rumen cannulated cows were used in a 4×4 Latin square design, with a 2×2 factorial arrangement of treatments. It was evaluated the following factors: CSFA addition (-CS: no supplementation, and +CS: with 3.32% DM CSFA); and the level of RDP (LRDP: low RDP, with 9.8% DM of RDP; and HRDP: high RDP, with 11.0% of RDP in diet DM). Post-ruminal flow was evaluated using a triple marker system. Particle-associated bacteria (PAB) showed lower ($P \leq 0.008$) enrichment with ^{15}N and purines N to total microbial N ratio, than liquid associated bacteria (LAB). Increasing dietary RDP concentration reduced ($P = 0.007$) enrichment and tended ($P \leq 0.095$) to reduce PB concentration in bacterial *pellets*. Purine basis overestimated ($P \leq 0.002$) microbial flow, especially LAB flow. However, there was interaction ($P = 0.067$) between the effects of marker and lipid supplementation on PAB flow. In diets containing CSFA, PB and ^{15}N showed similar ($P > 0.05$) estimates, whereas in the absence of CSFA, PB underestimated ($P \leq 0.05$) PAB flow, in relation to ^{15}N . Increased dietary RDP levels tended ($P = 0.061$) to reduce omasal PB flow and decreased ($P = 0.007$) urinary recovery. Urinary recovery of PD was variable (33.9% variation coefficient). Different evaluated factors had no effect ($P \geq 0.108$) on urinary excretion of creatinine, and PD of endogenous origin. Daily excretions of creatinine and endogenous PD were 0.262 mmol/kg and 0.640

mmol/kg^{0.75}, respectively. Purine basis overestimate microbial flow, especially LAB flow, by the presence of PB of dietary origin. Thus, lipid supplementation affects the relationship between PAB flow estimates using ¹⁵N and PB, leading to a low correlation between the estimates of these techniques. The urinary recovery of the PD was variable and increased with the increase of the dietary RDP level. Creatinine excretions and endogenous excretion of PD are not affected by evaluated treatments.

Key words: Allantoin, bacteria, guanine, isotope, microbial protein.

3.3 INTRODUÇÃO

A proteína microbiana sintetizada no rúmen é a principal fonte de proteína metabolizável absorvida pelos ruminantes (REYNAL; BRODERICK, 2005). Desta forma, a adequada quantificação destes compostos que deixam o rúmen, quando os animais são submetidos a diferentes condições dietéticas é de fundamental importância para otimizar o balanceamento proteico da dieta, reduzindo os custos alimentares e as perdas de nitrogênio (N) para o ambiente (OWENS; QI; SAPIEANZA, 2014).

Diversos indicadores têm sido utilizados para estimar o fluxo de proteína microbiana. Embora Broderick e Merchen (1992) tenham destacado que nenhum indicador é ideal, ¹⁵N e bases purinas (BP) têm sido os mais utilizados atualmente (ROTTA et al., 2014). Apesar de bem estabelecida, a utilização de ¹⁵N apresenta custos mais elevados e demanda equipamentos mais sofisticados do que a avaliação das BP. No entanto, na literatura ainda é muito controversa a respeito das estimativas de síntese microbiana obtidas com estes dois indicadores: alguns trabalhos mostram resultados similares (CALSAMIGLIA; STERN; FIRKINS, 1996; REYNAL; BRODERICK; BEARZI, 2005; MARIZ et al., 2018), enquanto outros mostram que a utilização de BP subestimou (FIRKINS et al., 1987; ROTTA et al., 2014) ou superestimou (CARRO; MILLER, 2002) a síntese microbiana, em relação ao ¹⁵N.

Outra forma, ainda menos invasiva e onerosa para avaliar a síntese microbiana é pela excreção urinária dos derivados purina (DP) (CHEN; GOMES, 1992). Esta técnica se baseia na premissa de que o conteúdo de BP dietético é baixo e a atividade microbiana reduz a zero as BP dietéticas. Desta forma, todo o fluxo seria de origem microbiana. Dentre as principais limitações para a aplicação desta técnica estão: o

conhecimento da real relação entre N purinas e o N total microbiano (TAS; SUSENBETH, 2007); da digestibilidade intestinal das BP e da recuperação urinária dos DP, assim como da contribuição endógena para a excreção destes derivados (FUJIHARA; SHEMA, 2011).

Os índices utilizados para a avaliação de síntese microbiana a partir da excreção de DP têm sido estabelecidos em experimentos envolvendo poucos animais (ORELLANA BOERO et al., 2001; GONZÁLEZ-ROQUILLO et al., 2003), por vezes de outras espécies (CHEN; GOMES, 1992), em diferentes condições nutricionais e metabólicas. Ademais, não é de nosso conhecimento nenhum estudo que tenha avaliado ^{15}N e BP como indicadores microbianos em dietas suplementadas com lipídios. Desta forma, a hipótese avaliada é de que ^{15}N e BP oferecem estimativas similares de síntese microbiana e os fatores dietéticos não afetem na relação N purina: N microbiano, nem a recuperação dos DP e na excreção endógena deste. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar ^{15}N e BP como indicadores do fluxo pós ruminal de proteína microbiana; o efeito da suplementação lipídica e dos diferentes teores de PDR da dieta sobre a razão N purinas:N total microbiano; a recuperação de DP na urina e a fração endógena desta.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais na Experimentação da FMVZ/USP (número de protocolo: 8785220917).

3.4.1 Animais, delineamento e dietas experimentais

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa, canuladas no rúmen, com $207 \pm 23,6$ (média $\pm$ desvio padrão) dias em lactação, $618 \pm 39,0$ kg de peso corporal e $33,4 \pm 2,45$ kg/d de produção de leite, no início do experimento, alojadas em sistema *Tie Stall*. O delineamento experimental adotado foi o quadrado Latino 4×4 replicado, com períodos de 21 dias, sendo 14 de adaptação e sete de coletas. As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações do NRC (2001) (Tabela 3.1). As dietas foram obtidas de uma arranjo fatorial 2×2 , no qual foram avaliados os efeitos da adição de SCAG [0 e 3,32% de SCAG (Megalac-E[®], Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil)]

da MS da dieta] e diferentes teores de PDR [9,80 e 11,0% da MS da dieta, de acordo com o NRC (2001)]. As dietas foram isonitrogenadas, utilizando farelo de soja *bypass* (Soypass BR[®], Cargill, Uberlândia, Brasil) e ureia para mudar o teor de PDR da dieta. Para mais detalhes acerca dos animais, instalações, delineamento e dietas experimentais, consultar o item 2.4.1 desta tese.

Tabela 3.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	BPDR ¹		APDR ²	
	-SC ³	+SC ⁴	-SC ³	+SC ⁴
<i>Composição, % MS</i>				
Silagem de milho	50,0	50,0	50,0	50,0
Milho moído	21,4	18,6	23,0	20,2
Farelo de soja	15,6	16,1	19,2	19,6
Farelo de soja <i>Bypass</i> ⁵	5,47	5,45	0,00	0,00
Polpa cítrica	3,97	3,96	3,97	3,96
Sais de cálcio de ácidos graxos	0,00	3,32	0,00	3,32
Premix mineral ⁶	1,55	1,54	1,55	1,54
Calcário	1,00	0,00	1,00	0,00
Bicarbonato de sódio	0,80	0,80	0,80	0,80
Ureia	0,00	0,00	0,30	0,30
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Composição química, % MS</i>				
Matéria seca, % matéria natural	39,6	39,6	39,6	39,6
Matéria orgânica	92,1	92,3	92,2	92,4
Carboidratos não fibrosos ⁷	37,2	35,0	36,9	34,8
Amido	27,7	25,8	28,8	26,9
Fibra em detergente neutro (FDN)	35,9	35,5	35,7	35,4
Fibra em detergente ácido	22,6	22,8	22,3	22,4
FDN indigestível	13,2	13,4	13,1	13,3
Proteína bruta (PB)	16,4	16,4	16,4	16,4
PB não ureia	16,4	16,4	15,6	15,6
PDR ⁸	9,80	9,80	11,0	11,0
PNDR ^{8,9}	6,60	6,60	5,40	5,40
PIDN ¹⁰	3,16	3,12	2,87	2,83
PIDA ¹¹	1,23	1,22	1,16	1,15
Extrato etéreo	2,53	5,29	2,56	5,32
Lignina	4,46	4,46	4,30	4,31
ELL _{3x} ^{8,12} , Mcal/kg	1,60	1,69	1,61	1,69

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SC: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SC: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil).

⁵Farelo de soja *bypass* (Soypass BR[®], Cargill, Uberlândia, Brasil);

⁶Cada kg contém: 235 g de Ca; 70 g de Na; 60 g de P; 20 g de S; 20 g de Mg; 2500 mg de Zn; 1600 mg de Mn; 700 mg de Cu; 600 mg de F; 40 mg de I; 20 mg de Se; 15 mg de Co; 10 mg de Cr; 200000 IU de Vit. A; 50000 IU de Vit. D2; e 1500 IU de Vit. E;

⁷Estimado de acordo com Hall (2000);

⁸Calculado de acordo com o modelo do NRC (2001);

⁹PNDR: proteína não degradável no rúmen.

¹⁰Proteína insolúvel em detergente neutro;

¹¹Proteína insolúvel em detergente ácido;

¹²Energia líquida de lactação ao nível de consumo de três mantenças.

3.4.1 Procedimentos experimentais, infusões e coletas

Para analisar a composição das dietas, amostras de milho moído, farelo de soja, farelo de soja *bypass*, SCAG e premix mineral foram coletadas a cada semana de avaliação e congeladas até as análises químicas. As dietas foram ofertadas duas vezes ao dia (8:00 e 13:00 h), *ad libitum*. A quantidade ofertada foi ajustada diariamente para manter uma porcentagem de sobras entre 5 e 10% da matéria natural ofertada. Amostras de silagem de milho foram coletadas diariamente durante o período de coletas, agrupadas (uma amostra por período) e congeladas até a realização das análises químicas.

Os indicadores utilizados para avaliar o fluxo de digesta no canal omasal foram a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) para grandes partículas (GP; HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), YbCl₃ para pequenas partículas (PP; SIDDONS et al., 1985) e Co-EDTA para a fase fluida (FF; UDÉN; COLUCCI; VAN SOEST, 1980). As soluções de infusão foram preparadas utilizando 6,67 g/L de Co-EDTA e 8,33 mL/L de solução de Yb₂O₃, o que resultou na infusão diária de 2,91 g de Co e 2,38 g de Yb. As infusões contínuas foram realizadas usando duas bombas peristálticas (Modelo BP-600-4; Milan Equipamentos Científicos, Colombo, PR, Brasil) e uma taxa de 3,6 L/dia, das 09:00 h do D14 até a última coleta omasal (15:00 h do D20). O sulfato de amônio (10% de ¹⁵N, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado à solução de infusão às 08:00 h do D15 e permaneceu até o final das coletas de urina (D21 às 15:00 h), com uma taxa de 9 g/dia (192 mg de ¹⁵N por dia). Antes do início da infusão de ¹⁵N, foi coletada amostra de conteúdo ruminal para a determinação do nível basal deste na digesta dos animais (AHVENJÄRVI; VANHATALO; HUHTANEN, 2002).

A digesta omasal foi coletada de acordo com a técnica descrita por Huhtanen, Brotz e Satter (1997) e adaptada por Leão et al. (2005), a partir das 00:00 h D18, a cada 9 horas, até as 15:00 h do D20. Em cada tempo de coleta, foram coletados aproximadamente 500 mL de amostra omasal. Uma subamostra (70 mL) foi usada para obter as bactérias associadas à fase líquida (BAL) e as bactérias associadas à partícula

(BAP), usando o método de Krizsan et al. (2010) que foi adaptado para menores volumes de amostra, como descrito no segundo capítulo desta tese.

Outra subamostra (aproximadamente 400 mL) foi congelada e, ao final de cada período experimental, foram agrupadas em amostra composta (3,2 L) por vaca em cada período. Esta amostra foi filtrada em pano dessorador e lavada com 1 L de solução de NaCl 0,9%. Os sólidos retidos no pano dessorador foram considerados GP. O filtrado foi centrifugado à $1000 \times g$ por 10 min à 5 °C, sendo o precipitado considerado PP e o sobrenadante definido como a FF (HUHTANEN; BROTZ; SATTER, 1997).

Coleta total de urina foi realizada usando sondas do tipo Foley (n° 24), implantadas com a utilização de espelho vaginal e probe guia às 15:00 h do D18. A coleta de urina foi realizada até as 15:00 h do D21. A urina coletada era direcionada para galões de 20 L contendo 500 mL de ácido sulfúrico 20% para promover a acidificação das amostras e evitar a precipitação dos DP (CHEN; GOMES, 1992). Diariamente os galões foram pesados e amostras representativas foram coletadas.

3.4.2 Análises laboratoriais

As amostras de alimentos foram pré secas à 60 °C por 72 horas em estufa de ventilação forçada e moídas em moinho de facas (MA340, Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneira de porosidade de 1 mm. As amostras foram analisadas quanto ao teor de MS (100 °C por 24 h; AOAC 2000), matéria orgânica (1000-cinzas; método 942.05; AOAC, 2000), proteína bruta (PB, $N \times 6,25$; método de Kjeldahl 984.13; AOAC 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC 2000), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18; AOAC 2000). A fibra em detergente neutro (FDN) foi analisada usando α -amilase (UNDERSANDER; MERTENS; THEIX, 1992) e sem a adição de sulfito de sódio (Analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado de acordo com Hendrix (1993), com degradação enzimática (Amyloglucosidase[®], Novozymes, Curitiba, PR, Brasil) e leituras de glicose em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM, Barueri, SP, Brasil).

As amostras das fases do omaso, do nível basal de ¹⁵N ruminal e dos *pellets* de BAL e BAP foram liofilizadas (LH, Terroni, São Carlos, SP, Brasil) até a completa remoção da umidade. Para o fluxo omasal, uma subamostra das fases do omaso (GP, PP e FF) foi processada à 1-mm e os teores de MS, MO, PB e FDN foram determinados

como previamente descrito. Outra subamostra foi processada à 150 μm , para avaliação das concentrações de Yb e Co, usando espectrofotometria de absorção (Spctr AA-800; Varian spectrometer, Harbor City, CA, USA). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP. O teor de FDNi das amostras de cada fase do omaso, assim como dos alimentos foi obtido após 288 horas de incubação ruminal (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), em duas vacas previamente adaptadas a uma dieta com baixos teores de lipídios, usando saquinhos de tecido não tecido (TNT) 5 $\times$ 5 cm (CASALI et al., 2008) e amostras processadas em peneiras de 2 mm. Após a incubação, as amostras foram lavadas em água corrente até total clareamento e o teor de FDN foi analisado como previamente descrito.

As amostras de urina foram analisadas quanto ao teor de alantoína (FUJIHARA; YAMAGUCHI, 1978), ácido úrico e creatinina, utilizando kit colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200). A alantoína da urina foi purificada de acordo com a metodologia proposta por Perez et al. (1998): as amostras foram hidrolisadas em pH 13,0, à 100 °C por 20 minutos, para a conversão da alantoína em ácido alantóico; previamente à separação, 30 g da resina de troca aniônica Amberlite IRA-400 foram adicionados a uma coluna de vidro de 300 mm $\times$ 20 mm (h $\times$ d) ocupando nessa coluna a altura até 120 mm; procedeu-se uma lavagem da coluna com 100 mL de água MilliQ, aplicando-se vácuo para obter velocidade de eluição de 3,75 mL/min; em seguida condicionou-se a coluna utilizando 75 mL de uma solução de ácido bórico a 0,05 M e pH 9,0, aplicando-se vácuo para obter uma velocidade de eluição de 2,0 mL/min. Após o condicionamento, 2,5 mL da amostra hidrolisada foi aplicada sobre a resina, na coluna, e deixados permear com a força da gravidade a uma velocidade estimada de 0,2 mL/min. Com a completa permeação da amostra na coluna, iniciou-se o processo de separação, primeiramente com 75 mL da solução 1 e vácuo, para manter a velocidade de eluição em 2,0 mL/min, em seguida utilizando-se 30 mL de uma solução tampão fosfato a 0,05 M e pH 6,0 na mesma velocidade. Para deslocar o ácido alantóico dos sítios ativos da resina e coletá-lo na saída da coluna, 60 mL de solução de cloreto de sódio a 1,0 M foram utilizados, deixando que permeassem com a força da gravidade a uma velocidade de aproximadamente 0,5 mL/min. Desprezaram-se os primeiros 20 mL coletados após o início da aplicação de solução de cloreto sódio, coletaram-se os próximos 30 mL em tubo Falcon de 50 mL. Para regeneração da coluna à condição

inicial (saturação com Cl), aplicaram-se 30 mL de solução de ácido clorídrico a 1,0 M com vácuo para obter uma velocidade de eluição de 2,0 mL/min, seguidos de lavagem com 100 mL de água MilliQ à mesma velocidade. As amostras obtidas (30 mL) foram congeladas e posteriormente liofilizadas para a avaliação da δ de ^{15}N (‰).

Para o isolamento das BP das amostras omasais foi utilizada a hidrólise e precipitação proposta por Aharoni e Tagari (1991): 500 mg de uma amostra de digesta reconstituída foi acondicionada em um tubo Falcon (50 mL); foram adicionados 0,5 mL de uma solução de NaCl (2 M) e 2,5 mL de ácido perclórico (75%); a solução foi levada ao banho-maria por 1 hora à 90 °C; após o resfriamento, foram adicionados 17,5 mL de ácido acético (0,1 M); após homogeneização, os tubos voltaram ao banho-maria (7 min. à 90 °C); para a precipitação, 3 mL do filtrado foram transferidos para outro tubo Falcon (50 mL) e foram adicionados 35 mL de ácido acético (0,2 M) e 3 mL de solução de nitrato de prata (0,4 M); os tubos foram selados e mantidos sob refrigeração por uma noite (12 h); no dia seguinte, os tubos foram centrifugados ($2000 \times g$ por 15 min.) e o sobrenadante foi descartado; o *pellet* foi ressuspenso em solução de ácido sulfúrico (0,005 N) e nitrato de prata (0,005 M); após nova centrifugação, o *pellet* foi coletado, congelado e posteriormente liofilizado.

As análises de δ de ^{15}N (‰) foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis (CIE) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), em Botucatu/SP. As amostras das fases (FF, PP e GP) e dos *pellets* de bactéria (BAL e BAP) foram pesadas (3000 a 4000 µg; MX5, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, EUA) em cápsulas de estanho de 5 × 9 mm (Elemental Microanalysis, Okehampton, UK) e o pH da amostra foi alcalinizado pela adição de 50 µL de 72-mM K_2CO_3 . As cápsulas foram mantidas em estufa à 60 °C por 24 h para volatilizar o N amoniacal. As amostras de ácido alantóico purificado foram pesadas (15.000 µg) e BP purificadas do fluxo omasal (2000 µg) também em cápsulas de estanho 5 × 9 mm. As amostras foram acondicionadas em um amostrador automático acoplado a um analisador elementar (EA 1108 – CHN – Fisons Instruments, Rodano, Italy), em que, na presença de oxigênio e óxido de cobre, o N é reduzido à N_2 . Os gases formados foram separados por uma coluna de cromatografia gasosa e analisados em espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Alemanha). Os teores de BP nos *pellets* de bactéria (BAL e BAP) e nas frações do omaso (FF, PP e GP) foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Makkar e Becker (1999), sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro manual (à 260 nm).

3.4.3 Cálculos e análises estatísticas

O fluxo omasal de nutrientes foi calculado usando os fatores de reconstituição da digesta propostos por France e Siddons (1986). Baseado na similaridade entre os teores basais de ^{15}N em microrganismos e na digesta (AHVENJÄRVI; VANHATALO; HUHTANEN, 2002), o nível basal de ^{15}N foi subtraído da proporção da ^{15}N nas amostras para calcular o enriquecimento de ^{15}N de cada fração. De maneira similar, a concentração de BP nas amostras foi utilizada para estimar a síntese microbiana. Desta forma, o fluxo de BAL e BAP foi calculado como:

$$BAL - NNA = FF_{fluxo} \times NNA_{FF} \times \left(\frac{FF_{ind.}}{BAL_{ind.}} \right)$$

$$BAP - NNA = PP_{fluxo} \times NNA_{SS} \times \left(\frac{PP_{ind.}}{BAP_{ind.}} \right) + GP_{fluxo} \times NNA_{GP} \times \left(\frac{GP_{ind.}}{BAP_{ind.}} \right)$$

Para a estimativa da contribuição endógena para a excreção de DP, foi utilizada a equação proposta por Perez et al. (1998):

$$\text{Contribuição endógena} = \left(1 - \frac{\text{Urina}_{^{15}\text{N enriquecimento}}}{\text{Purinas omasais}_{^{15}\text{N enriquecimento}}} \right)$$

Os dados de δ de ^{15}N basal, fluxo de BP e excreção de DP foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.3, SAS Instituto Inc., Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + v_{j:i} + PE_k + P_l + SC_m + P \times SC_{lm} + e_{ijklm}$$

com: $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, e $e_{ijklm} \approx N(0; \sigma_e^2)$; onde: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quadrado Latino ($i = 1$ e 2); $v_{j:i}$ = efeito aleatório da vaca dentro de cada quadrado Latino ($j = 1$ à 8); PE_k = efeito fixo do período experimental ($k = 1$ à 4); P_l = efeito fixo do nível de PDR ($l = 1$ e 2); SC_m = efeito fixo do nível de SCAG ($m = 1$ e 2); $P \times SC_{lm}$ = efeito de interação; e_{ijklm} = erro aleatório residual; N = distribuição normal; σ_v^2 = variância associada ao efeito aleatório de vaca (animal) dentro de quadrado Latino; σ_e^2 = variância aleatória do erro experimental.

Os dados de composição dos *pellets* de bactéria e de comparação dos indicadores de fluxo microbiano foram analisados como parcelas subdivididas, usando o PROC MIXED e o seguinte modelo:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + v_{j:i} + PE_k + P_l + SC_m + P \times SC_{lm} + \omega_{ijklm} + B_n + B \times P_{nl} \\ + B \times SC_{nm} + B \times P \times SC_{nlm} + e_{ijklmn}$$

com: $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, $\omega_{ijklm} \approx N(0; \sigma_\omega^2)$ e $e_{ijklmn} \approx MVN(0; R)$; onde Y_{ijklmn} = variável dependente; $\mu, Q_i, v_{j:i}, PE_k, P_l, SC_m$ e $P \times SC_{lm}$ foram previamente definidos; ω_{ijklm} = erro residual associado com as unidades experimentais (vaca em cada período experimental); B_n = efeito fixo do tipo de bactéria ou do indicador ($n = 1$ e 2); $B \times P_{nl}$, $B \times SC_{nm}$, e $B \times P \times SC_{nlm}$ = efeitos de interação; e_{ijklmn} = erro experimental; N = distribuição normal; σ_v^2 = variância associada com o efeito de vaca; σ_ω^2 = variância associada com as unidades experimentais (vaca dentro de período); MVN = indica variâncias múltiplas com distribuição normal; e R = matriz de variância e covariância usada para modelar as variâncias das medidas repetidas. Foram avaliadas as matrizes (CS, CSH, AR(1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1)), sendo utilizado o critério Baisiano para identificar a mais adequada ao conjunto de dados. Quando houve interação entre os efeitos avaliados, este foi desmembrado utilizando o teste de diferença mínima significativa de Fischer (LSD). Os valores observados foram regredidos em função das estimativas para o fluxo de nitrogênio microbiano (BAL, BAP, total, e utilizando diferentes relações N purinas: N total) e o volume urinário, utilizando o PROC REG do SAS. Para todas as análises, foi considerado um nível de significância de 5%, sendo valores entre 5 e 10% considerados como tendência.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Composição dos *pellets* de bactéria associada à fase líquida ou aderida à partícula

Não houve interação ($P \geq 0,211$) entre o tipo de *pellet* analisado (BAL e BAP) e os fatores dietéticos avaliados sobre a composição do *pellet* (Tabela 3.2). As dietas não afetaram ($P \geq 0,148$) δ de ^{15}N . As BAP apresentaram maior ($P \leq 0,008$) teor de NNA, com menor δ de ^{15}N , em relação à BAL. Não houve diferenças ($P = 0,761$) entre os teores de BP em BAL e BAP. Consequentemente, as BAL e BAP apresentaram razão N purina: N total microbiano de 119 e 109 (g/kg), respectivamente, diferindo entre si ($P = 0,008$). A suplementação lipídica não afetou ($P \geq 0,131$) nenhuma das variáveis

relacionadas à composição do *pellet* microbiano. No entanto, o aumento do nível de PDR da dieta reduziu ($P = 0,007$) δ de ^{15}N da amostra e tendeu ($P = 0,095$) a reduzir o teor de BP das mesmas. Nenhum dos fatores dietéticos avaliados afetou ($P \geq 0,168$) a relação N purina: N total microbiano. Desta forma, as estimativas de síntese de proteína microbiana usando os valores observados de razão N purinas: N total microbiano apresentaram elevada correlação com as estimativas utilizando as concentrações observadas ($R^2 = 0,855$; Figura 3.1).

Figura 3.1 - Correlação entre as estimativas de fluxo de NNA microbiano obtidas utilizando a média da relação entre N purinas e N total microbiano e o valor observado para cada unidade experimental.

3.5.2 Comparação entre ^{15}N e bases purinas como indicadores do fluxo microbiano

Independentemente da adição de SCAG e do método de avaliação, os teores de PDR não afetaram ($P \geq 0,147$) as estimativas de síntese microbiana (Tabela 3.3). De maneira geral, a utilização de BP como indicador superestimou ($P \leq 0,002$) a síntese microbiana em relação ao ^{15}N , sendo este efeito mais evidente para o fluxo de BAL. Para as estimativas do fluxo de BAP, houve tendência ($P = 0,067$) à interação entre os efeitos da adição de SCAG e do método: na presença de SCAG, os indicadores

Tabela 3.2 - Composição dos *pellets* de bactéria aderida à partícula e associada à fase líquida de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		Media	EPM	P ⁵						
	-SC ³	+SC ⁴	-SC ³	+SC ⁴			SC	P	SC×P	B	SC×B	P×B	SC×B×P
$\delta^{15}\text{N}$, ‰													
Base ruminal	2,82	2,52	2,88	2,89	2,78	0,081	0,325	0,148	0,305	-	-	-	-
BAL ⁶	140	138	126	127	133	3,6	0,862	0,007	0,835	<0,001	0,677	0,377	0,551
BAP ⁷	123	124	114	115	119	3,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bases purinas, mmol/kg</i>													
BAL ⁶	105	98,4	96,8	95,0	98,8	1,81	0,131	0,095	0,773	0,761	0,776	0,491	0,605
BAP ⁷	99,2	97,8	98,7	95,4	97,8	1,81	-	-	-	-	-	-	-
<i>NNA, g/kg MS</i>													
BAL ⁶	60,4	57,8	58,2	56,6	58,3	1,09	0,326	0,790	0,561	0,008	0,799	0,211	0,808
BAP ⁷	63,0	60,4	64,2	64,4	63,0	1,73	-	-	-	-	-	-	-
<i>Razão N purinas:NNA, g/kg</i>													
BAL ⁶	122	120	117	118	119	2,8	0,940	0,168	0,906	0,008	0,999	0,662	0,534
BAP ⁷	112	114	107	105	109	2,8	-	-	-	-	-	-	-

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SC: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SC: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SC: efeito da adição de sais de cálcio (-SC vs +SC); P: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); B: efeito do tipo de *pellet* de bactéria (BAL vs BAP); SC×P, SC×B, P×B e SC×B×P são efeitos de interação entre os fatores principais previamente definidos;

⁶Bactéria associada ao líquido;

⁷Bactéria aderida à partícula.

apresentaram estimativas similares ($P > 0,05$), enquanto que nas dietas não suplementadas, as BP subestimaram ($P \leq 0,05$) o fluxo de BAP, em relação ao ^{15}N (Figura 3.5).

Apesar de superestimar o fluxo microbiano de BAP, a utilização de BP como indicador microbiano resulta em elevada correlação ($R^2 = 0,683$) com aqueles valores observados utilizando ^{15}N (Figura 3.2). Ademais, o intercepto da regressão foi significativo ($P = 0,033$), e a inclinação ($0,583 \pm 0,0739$), apesar de diferir de zero ($P < 0,001$), também diferiu significativamente de um ($P < 0,001$). Para o fluxo microbiano associado à partícula e nitrogênio microbiano (NM) total, as estimativas utilizando ^{15}N e BP apresentaram menores correlações ($R^2 \leq 0,429$; Figuras 3.3 e 3.4). Mais uma vez, o intercepto foi significativo ($P < 0,001$) e as inclinações diferiram de zero ($P \leq 0,001$) e de um ($P \leq 0,001$).

Figura 3.2 - Correlação entre as estimativas de fluxo de NNA associado à fase líquida utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.

Figura 3.2 - Correlação entre as estimativas de fluxo de NNA aderido à partícula utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.

Figura 3.3 - Correlação entre as estimativas de fluxo de N microbiano total utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.

Tabela 3.3 - Comparação de ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores de fluxo microbiano em vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		Media	EPM	P ⁵						
	-SC ³	+SC ⁴	-SC ³	+SC ⁴			SC	P	Met.	SC×P	SC×Met.	P×Met.	SC×P×Met.
Fluxo microbiano total, g/d													
¹⁵ N	368	369	362	363	366	8,8	0,357	0,362	0,002	0,835	0,214	0,393	0,742
BP	398	434	380	402	404	12,3	-	-	-	-	-	-	-
Fluxo microbiano associado à fase líquida, g/d													
¹⁵ N	154	161	126	154	149	7,2	0,294	0,147	<0,001	0,790	0,837	0,258	0,472
BP	207	228	173	193	200	11,2	-	-	-	-	-	-	-
Fluxo microbiano aderido às partículas, g/d													
¹⁵ N	214	208	236	210	217	9,6	0,617	0,133	0,046	0,272	0,067	0,909	0,773
BP	191	206	207	210	204	10,6	-	-	-	-	-	-	-

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SC: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SC: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SC: efeito da adição de sais de cálcio (-SC vs +SC); P: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); Met.: efeito do método de estimativa do fluxo microbiano (^{15}N vs BP); SC×P, SC×Met., P×Met. e SC×P×Met. são efeitos de interação entre os fatores principais previamente definidos.

Figura 3.5 - Desdobramento da interação do efeito da suplementação lipídica sobre as estimativas de síntese microbiana utilizando ^{15}N e bases purinas (BP) como indicadores.

^{a-b}Teste de médias (diferença mínima significativa de Fisher - LSD) à 5% de probabilidade. Média ($\pm$ EPM).

3.5.3 Fluxo de bases purinas, fração endógena e excreção urinária de creatinina e derivados de purinas

Com o aumento do nível de PDR da dieta houve tendência ($P = 0,061$) de redução do fluxo pós ruminal de BP (Tabela 3.4). Os valores de fluxo de BP observados foram de 553 e 501 mmol/d para BP e AP, respectivamente. No entanto, a excreção de DP na urina (322 mmol/dia) não foi afetada ($P \geq 0,338$) pela adição de SCAG, nem pelo nível de PDR da dieta. De maneira similar, as diferentes estratégias nutricionais avaliadas não afetaram ($P \geq 0,108$) as excreções urinárias de alantoína e ácido úrico, assim como a excreção de creatinina. A excreção média observada de creatinina foi de 0,262 mmol/kg/dia. Desta forma, o índice alantoína:creatinina não foi afetado ($P \geq 0,105$) pelas dietas experimentais.

A estimativa do volume urinário utilizando creatinina como indicador apresenta alta correlação ($R^2 = 0,691$) com o valor observado de excreção urinária (Figura 3.6). O intercepto da função de regressão é não significativo ($P = 0,074$) e a inclinação ($0,073 \pm 0,0943$) difere de zero ($P < 0,001$) e ainda difere de um ($P = 0,022$).

Tabela 3.4 - Excreção urinária de creatinina e derivados purina de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		Media	EPM	P ⁵		
	-SC	+SC	-SC	+SC			SC	P	SC×P
Fluxo omasal de BP, <i>mmol/d</i>	543	563	491	512	527	13,0	0,306	0,061	0,879
Derivados purina (DP), <i>mmol/d</i>	329	309	337	314	322	11,8	0,338	0,772	0,960
DP endógenas									
<i>mmol/dia</i>	83,8	88,3	82,0	68,0	80,5	5,49	0,671	0,335	0,416
<i>mmol/kg PV</i> ^{0,75}	0,672	0,702	0,643	0,543	0,640	0,0459	0,711	0,330	0,493
Recuperação urinária de DP	0,473	0,402	0,536	0,503	0,479	0,0162	0,070	0,007	0,488
Alantoína, <i>mmol/d</i>	291	268	297	278	283	10,6	0,319	0,703	0,926
Ácido úrico, <i>mmol/d</i>	32,2	34,9	33,6	30,3	32,7	1,72	0,884	0,481	0,177
Alant.: creatinina	1,88	1,71	1,57	2,05	1,80	0,100	0,429	0,923	0,105
Creatinina									
<i>mmol/dia</i>	162	162	193	149	167	6,6	0,108	0,476	0,112
<i>mmol/kg PV</i>	0,256	0,254	0,301	0,237	0,262	0,0101	0,112	0,490	0,133
<i>mmol/kg PV</i> ^{0,75}	1,28	1,27	1,52	1,18	1,31	0,051	0,110	0,486	0,127

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SC: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SC: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SC: efeito da adição de sais de cálcio (-SC vs +SC); P: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); SC×P.: interação entre os efeito de SC e P;

Figura 3.4 - Correlação entre o volume urinário estimado usando a creatinina como indicador e os valores observados.

3.1 DISCUSSÕES

A correta avaliação da relação entre os teores de N purinas e N total microbiano é uma das primeiras e mais importantes variáveis relacionadas à estimativa da síntese microbiana, seja utilizando o fluxo pós ruminal de BP, ou a excreção urinária de DP. No presente estudo, a razão o N das purinas e o N total microbiano não foi afetada por nenhum dos fatores dietéticos avaliados. Os valores observados foram de 119 e 109 g/kg para BAL e BAP, respectivamente. Na descrição do método de DP, Chen e Gomes (1992) sugerem a utilização de 116 g/kg para culturas mistas, valor muito próximo ao observado no presente estudo. Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, também avaliando *pellet* misto de bactérias, Zanferari et al. (2018) encontraram relação de 103 g/kg. A elevada correlação entre as estimativas de síntese de proteína microbiana utilizando a média do presente estudo e os valores observados de relação N purinas: N total nos permite inferir que a avaliação desta relação individual tem pouco efeito sobre a precisão das estimativas, embora ganhos em acurácia possam ser alcançados.

No presente estudo, o *pellet* de BAL apresentou menor teor de NNA e maior δ de ^{15}N , do que o *pellet* de BAP. De acordo com Mariz et al. (2018), as BAP incorporam preferencialmente N advindo de aminoácidos e peptídeos, resultando em diluição do indicador no N do *pellet* microbiano. O maior enriquecimento de BAP em relação à

BAL é efeito amplamente documentado na literatura (Martin-Orue et al., 1994; Pérez et al., 1996; Ahvenjärvi et al., 2002). A redução do nível de enriquecimento das bactérias isoladas do omaso de vacas alimentadas com alto nível de PDR reforçam o efeito de diluição da concentração de ^{15}N no N-NH_3 dietético (REYNAL e BRODERICK, 2005). Reynal e Broderick (2005) encontraram teores de NNA variando de 69,8 a 77,5 g/kg MS e 77,2 a 79,9 g/kg MS, para BAL e BAP, respectivamente. Os valores observados são ligeiramente superiores aos observados no presente estudo: 56,6 a 60,4 g/kg MS para BAL e 60,4 a 63,0 g/kg MS para BAP. De acordo com estes autores, a correção dos valores para a matéria orgânica, em decorrência do aumento da concentração de mineral presente no tampão, remove a diferença entre estes.

As BP levaram a superestimativa do fluxo microbiano, especialmente do fluxo de NNA microbiano associado à fase líquida. De acordo com Askar et al. (2005), esta superestimativa se deve à contribuição das BP dietéticas para o fluxo pós ruminal de BP e esta pode ser confirmada pela diferença entre os enriquecimentos com ^{15}N das BP isoladas no omaso e nos *pellets* de bactéria. Se as BP dietéticas não são completamente degradadas no rúmen, estas são recuperadas preferencialmente na fase fluida (PEREZ et al. 1997; VICENTE et al., 2004). De acordo com Marin-Orue et al. (1994), a ocorrência de lise celular durante o processo de isolamento bacteriano leva a redução do teor de BP no *pellet* e consequentemente a uma superestimativa do fluxo microbiano. Apesar da redução dos teores de BP em BAL em relação à BAP serem coerentes com tal teoria, as menores estimativas de NM aderido à partícula obtidas com BP em relação ao ^{15}N evidenciam que a ocorrência de lise durante o processo de isolamento parece não ser limitante para a aplicação da técnica.

Foi observada tendência à interação entre os efeitos de métodos de estimativa e a adição de SCAG sobre a estimativa do fluxo microbiano associado às partículas. Este resultado foi observado porque, utilizando ^{15}N como indicador, a suplementação lipídica reduziu o fluxo microbiano associado às partículas, o que não ocorreu quando BP foi utilizada como indicador microbiano. No capítulo anterior, este menor fluxo microbiano foi relacionado à redução da extensão de degradação ruminal da fibra e da matéria orgânica, nas dietas contendo SCAG. Com a redução da degradação, o fluxo de material intacto aumenta, possibilitando maior fluxo de BP dietéticas, o que aumenta a estimativa de fluxo utilizando BP como indicador. Ademais, a ocorrência de lise celular, levando a subestimativa do teor de BP no *pellet* ocorre pela interação dos alcoóis e detergentes com os lipídios de membrana dos microrganismos (Martin-Orue et al.,

1994). A suplementação lipídica tem a capacidade de elevar o teor de ácidos graxos e alterar o perfil lipídico dos microrganismos, além de aumentar o fluxo de lipídios aderidos às partículas (capítulo 4). Desta forma, a ocorrência de lise pode ser explicação plausível, embora a adição de SC não tenha afetado significativamente o teor de BP nos microrganismos ($P = 0,131$; Tabela 3.2).

As regressões dos valores observados de NM total e associados à BAL e BAP usando ^{15}N em função dos valores observados utilizando BP mostraram maior coeficiente de determinação para NM associado à fase líquida ($R^2 = 0,683$) do que para o NM aderido à partícula ($R^2 = 0,429$) e para o fluxo total de NM ($R^2 = 0,327$). Os valores observados são muito próximos àqueles encontrados por Reynal, Broderick e Bearzi (2005), que reportaram coeficientes de determinação de 0,38; 0,85 e 0,69, para BAL, BAP e NM total, respectivamente. No entanto, diferentemente do observado por estes autores, a correlação foi menor para as estimativas de BAP, uma vez que a adição de SCAG afetou esta estimativa, como previamente discutido. Carro e Miller (2002) também encontraram correlação positiva entre as estimativas de fluxo total utilizando ^{15}N e BP ($R = 0,88$) e associaram a presença de intercepto significativo e a inclinação diferente de 1, com a diferença de resposta dos dois indicadores aos diferentes tratamentos dietéticos, provavelmente porque a extensão de degradação da BP dietética é diferente nos diferentes alimentos.

A tendência de redução do fluxo de BP observado nos animais alimentados com AP, em relação ao BP pode ser associada à presença de farelo de soja *bypass* na dieta com BPDR, o que reduz a degradação proteica e potencialmente aumenta a contribuição dietética para o fluxo de BP. A ausência de efeito da adição de SCAG e o nível de PDR sobre as estimativas de síntese microbiana total, independentemente do indicador utilizado, reforça esta explicação. Ademais, o aumento do nível de PDR da dieta resultou em aumento da recuperação urinária de DP. Como discutido no capítulo anterior, o aumento do nível de PDR da dieta está associado a redução da excreção fecal de N (WANG et al., 2014). Por um mecanismo semelhante, o tratamento térmico e o aumento do fluxo de BP oriundas do farelo de soja *bypass* pode ter reduzido a disponibilidade intestinal, resultando em menores coeficientes de recuperação.

Avaliando a excreção urinária de DP em função do fluxo duodenal de BP, em ovinos, Kozlosky et al. (2017) encontraram coeficiente angular de 0,43, na equação do primeiro grau. Chen e Gomes (1992) sugeriram coeficiente de digestibilidade de 0,83 e fator de recuperação de 0,85 das BP absorvidas para bovinos, o que resulta em

recuperação de 0,706. De acordo com estes autores, os principais motivos para a baixa recuperação urinária de DP estão a excreção salivar (CHEN; ØRSKOV; HOVELL, 1990), a retenção nos tecidos esplânicos e a excreção intestinal. Estudando a recuperação de DP na urina, González-Ronquillo et al. (2003) encontraram coeficientes de 0,56 e 0,70 para vacas no início e no final de lactação e discutiram que outras rotas são responsáveis por 14 a 32% da excreção de BP absorvidas. Consequentemente, como reportado por Kahn e Nolan (2000), a taxa de recuperação urinária dos DP é altamente variável, tanto entre experimentos, como dentro de cada experimento, o que traz muitas incertezas quando da utilização de DP para a estimativa de síntese microbiana. O coeficiente de variação geral observado no presente estudo foi de 33,9%.

O valor de excreção endógena mais utilizado nas estimativas de síntese microbiana a partir da excreção de DP de origem endógena é $0,385 \text{ mmol/kg}^{0,75}$, proposto por Chen e Gomes (1990), para contribuição endógena em bovinos. Estudando a recuperação urinária de DP e a fração endógena dos DP em vacas secas ($n = 3$), Orellana Boero et al. (2001) encontraram valores de 67,5 % de recuperação urinária e $0,310 \text{ mmol/kg}^{0,75}$ de purinas endógenas excretadas. González-Ronquillo et al. (2003) estudaram a excreção endógena de DP em vacas leiteiras ($n = 3$) e encontraram valores de $0,512 \pm 31,0 \text{ mmol/kg}^{0,75}$. No presente estudo, a excreção de DP de origem endógena não foi afetada pelos fatores dietéticos avaliados. O valor médio observado foi de $0,640 \text{ mmol/kg}^{0,75}$, ligeiramente superior aos valores anteriormente citados. Dorea et al. (2017), em metanálise, regrediram os resultados de excreção de DP em função do consumo, relacionando a excreção dos animais com valor zero de consumo à excreção endógena. Estes autores encontraram valor de $0,651 \text{ mmol/kg}^{0,75}$ como estimativa de fração endógena. Uma maior estimativa de excreção endógena em vacas em lactação pode ser relacionada ao maior consumo e às suas maiores taxas metabólicas, que fazem com que a excreção total de DP também seja maior (DOREA et al., 2017).

Tebbe e Weiss (2018) avaliaram a excreção urinária de creatinina em vacas leiteiras e reportaram excreção diária de 29,0 mg ($0,256 \text{ mmol/kg}$) por kg de peso corporal. Estes autores encontraram coeficiente angular de 0,70 para a regressão dos valores observados em função dos valores estimados, similar ao coeficiente de 0,77 apresentado neste estudo. Desta forma, Tebbe e Weiss (2018) relataram menor erro padrão da estimativa do volume urinário do que do volume urinário observado. No presente estudo, os valores de erro padrão para a estimativa e o valor observado de excreção urinária foram de 1,81 e 1,95, respectivamente. É interessante destacar que, no

presente estudo, dois animais apresentavam volumes urinários consistentemente maiores durante o experimento, fazendo com que a concentração de creatinina fosse baixa. Desta forma, uma avaliação da Figura 3.6 nos permite observar que o aumento do volume urinário está associado ao aumento do erro da estimativa. Este aumento do erro está associado ao maior coeficiente de variação das análises realizadas em amostras com concentrações baixas de creatinina. Guardadas certas ressalvas, a creatinina é um bom preditor do volume urinário. No entanto, de acordo com Shingfield e Offer, (1998), variação da excreção diária de creatinina, assim como a variação entre dias, podem comprometer as estimativas de volume urinário obtidas utilizando coletas *spot*.

3.2 CONCLUSÕES

Em relação ao ^{15}N , a utilização de BP como indicador microbiano, superestima o fluxo microbiano, especialmente das BAL, pela presença de BP de origem dietética. A suplementação lipídica afeta a relação entre as estimativas de fluxo de BAP utilizando ^{15}N e BP, levando à baixa correlação entre as estimativas com as duas técnicas. A recuperação urinária dos DP é variável e aumenta nas dietas contendo alto do nível de PDR em relação às dietas contendo baixo PDR. As estimativas de excreção endógena de DP e de excreção de creatinina não são afetadas pelos fatores avaliados no presente estudo, sendo os valores médios de 0,262 mmol/kg/dia e 0,640 mmol/kg^{0,75}/dia, respectivamente.

3.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, Y.; TAGARI, H. Use of nitrogen-15 determinations of purine nitrogen fraction of digesta to define nitrogen metabolism traits in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2540-2547, 1991.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2176-2187, 2002.

ASKAR, A. R. ; GUADA, J. A.; BALCELLS, J.; DE VEGA, A. ; CASTRILLO, C. Validation of use of purine bases as a microbial marker by ^{15}N labelling in growing lambs given high-concentrate diets: effects of grain processing, animal age and digesta sampling site. **Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 51-65, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.

- BRODERICK, G. A.; MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein-synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2618-2632, 1992.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D.; FIRKINS, J. L. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p.1375-1381, 1996.
- CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.
- CHEN, X. B.; ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. Excretion of purine derivatives by ruminants - endogenous excretion, differences between cattle and sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 121-129, 1990.
- CHEN, X. B.; 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, Aberdeen, Rowett Research Institute. 1992. 22 p.
- DOREA, J. R. R.; DANES, M. A. C.; ZANTON, G. I.; ARMENTANO, L. E. Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8977-8994, 2017.
- FIRKINS, J. L.; LEWIS, S. M.; MONTGOMERY, L.; BERGER, L. L.; MERCHENS, L. L.; FAHEY, JR, G. C. Effects of feed intake and dietary urea concentration on ruminal dilution rate and efficiency of bacterial growth in steers. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 11, p. 2312-2321, 1987.
- FRANCE J.; SIDDONS, R. C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 121, n. 1, p. 105-119, 1986.
- FUJIHARA, S., YAMAGUCHI, M. Effects of allopurinol 4-hydroxypyrazolo(3,4-d) pyrimidine on metabolism of allantoin in soybean plants. **Plant Physiology**, v. 62, n. 1, p. 134-138, 1978.
- FUJIHARA, T.; SHEM, M. N. Metabolism of microbial nitrogen in ruminants with special reference to nucleic acids. **Animal Science Journal**, v. 82, n. 2, p. 198-208, 2011.
- GONZALEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. Technical note: Evaluation of urinary purine derivatives in comparison with duodenal purines for estimating rumen microbial protein supply in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 884-891, 2017.
- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen.** University of Florida, Gainesville p. A-25 (Bulletin, 339). 2000.
- HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.
- HUHTANEN, P.; BROTZ, P. G.; SATTER, L. D. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1380-1392, 1997.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n. 3, p. 211-227, 1994.

KAHN, L. P.; NOLAN, J. V. Kinetics of allantoin metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 629-634, 2000.

KOZLOSKI, G. V.; STEFANELLO, C. M.; OLIVEIRA, L.; RIBEIRO FILHO, H. M. N.; KLOPFENSTEIN, T. J. Technical note: Evaluation of urinary purine derivatives in comparison with duodenal purines for estimating rumen microbial protein supply in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 884-891, 2017.

KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G. A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1138-1147, 2010.

LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; RENNÓ, L. N.; CECON, P. R.; AZEVEDO, J. A. G.; GONÇALVES, L. C.; VALADARES, R. F. D. Intake and total and partial digestibility of total carbohydrates, neutral detergent fiber and nonfiber carbohydrates in steers under three ingestion regimes and two method of digesta collections: abomasal and omasal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 670-678, 2005.

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

MARIZ, L. D. S.; AMARAL, P. M.; VALADARES FILHO, S. C.; SANTOS, S. A.; MARCONDES, M. I.; PRADOS, L. F.; CARNEIRO PACHECO, M. V.; ZANETTI, D.; DE CASTRO MENEZES, G. C.; FACIOLA, A. P. Dietary protein reduction on microbial protein, amino acids digestibility, and body retention in beef cattle. I. Digestibility sites and ruminal synthesis estimated by purine bases and ^{15}N as markers. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 6, p. 2453-2467, 2018.

MARTIN-ORUE, S. M.; BACCELLS, J.; ZAKRAOUI, F.; CASTRILLO, C. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta, effect of detachment procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, n. 3-4, p. 269-282, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: NRC, 2001. 381 p.

ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; LIANG, J. B.; GUADA, J. A. Excretion of derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 243-250, 2001.

OWENS, F. N.; QI, S.; SAPIENZA, D. A. Invited review: Applied protein nutrition of ruminants - Current status and future directions. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2, p. 150-179, 2014.

PEREZ, J. F., BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; CASTRILLO, C. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of ^{15}N and purine bases as microbial markers: Effect of protein source and rumen bacteria isolates. **Animal Science**, v. 65, n. 2, p. 225-236, 1997.

PEREZ, J. F.; BALCELLS, J.; CEBRIÁN, J. A.; MARTIN-ORÚE, S. M. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: effect of increased concentrate intake. **British Journal of Nutrition**, v. 79, n. 3, p. 237-240, 1998.

REYNAL, S. M., BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on

production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, 2005a.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4065-4082, 2005b.

ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L. F.; PAULINO, M. F.; MARCONDES, M. I.; LOBO, A. A.; VILLADIEGO, F. A. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugarcane. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2996-3006, 2014.

SHINGFIELD, K.; OFFER, N. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. **Animal Science**, v. 66, p. 557-568, 1998.

SIDDONS, R. C.; PARADINE, J.; BEEVER, D. E.; CORNELL, P. R. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. **British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 509-519, 1985.

TAS, B. M.; SUSENBETH, A. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. **Livestock Production Science**, v. 111, n. 3, p. 181-192, 2007.

TEBBE, A. W.; WEISS, W. P. Evaluation of creatinine as a urine marker and factors affecting urinary excretion of magnesium by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 5020-5032, 2018.

UDÉN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta - rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, n. 7, p. 625-632, 1980.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. Omaha: National Forage Testing Association, 1992. 139 p.

VICENTE, F.; GUADA, J. A.; SURRA, J.; BALCELLS, J.; CASTRILLO, C. Microbial contribution to duodenal purine flow in fattening cattle given concentrate diets, estimated by purine N labelling (^{15}N) of different microbial fractions. **Animal Science**, v. 78, n. 1, p. 159-167, 2004.

WANG, C.; LIU, J. X.; ZHAI, S. W.; LAI, J. L.; WU, Y. M. Effects of rumen-degradable-protein to rumen-undegradable-protein ratio on nitrogen conversion of lactating dairy cows. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 58, n. 2, p. 100-103, 2008.

ZANFERARI, F.; VENDRAMINI, T. H. A.; RENTAS, M. F.; GARDINAL, R.; CALOMENI, G. D.; MESQUITA, L.; TAKIYA, C. S.; RENNÓ, F. P. Effects of chitosan and whole raw soybeans on ruminal fermentation and bacterial populations, and milk fatty acid profile in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, in press, 2018.

4 CONSUMO, FLUXO OMASAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS E DO LEITE DE VACAS ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO SAIS DE CÁLCIO E TEORES DE PROTEÍNA DEGRADÁVEL NO RÚMEN

4.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) em dietas de vacas leiteiras contendo diferentes teores de proteína degradável no rúmen (PDR) sobre o consumo e fluxo omasal de ácidos graxos (AG), extensão de bio-hidrogenação ruminal e perfil de AG nas bactérias e no leite. Oito vacas em lactação, da raça Holandesa, multíparas e canuladas no rúmen, foram usadas em um delineamento experimental em quadrado Latino 4×4 replicado. Os tratamentos foram distribuídos em um arranjo fatorial 2×2 , obtidos pela combinação da adição de SCAG (-SCAG: sem suplementação; e +SCAG: com 3,32% MS de SCAG) e diferentes teores de PDR (BPDR: baixo PDR, com 9,8% MS de PDR; e APDR: alto PDR: com 11,0% MS de PDR). O fluxo pós ruminal foi avaliado usando coletas omasal de digesta e sistema de triplo indicadores de fluxo: fibra em detergente neutro indigestível, itérbio e cobalto. As amostras foram preparadas para a obtenção do *pellet* de bactérias associadas à fase líquida e aderidas à partícula. Ao final do período experimental, as amostras de alimentos, fases do fluxo omasal, bactérias e leite foram submetidas à cromatografia gasosa para avaliação do perfil de ácidos graxos. A adição de SCAG aumentou ($P < 0,001$) o consumo de AG total e dos AG de cadeia média e longa ($\geq 12C$). O aumento do nível de PDR da dieta resultou na redução ($P < 0,001$) do consumo dos ácidos graxos C4:0, C12:0, C14:0, C16:0 e C18:0, e tendeu ($P = 0,068$) a reduzir o consumo de C18:1 *trans*. Houve interação ou tendência ($P \leq 0,095$) à interação entre os efeitos do nível de PDR e da adição de SCAG sobre o fluxo omasal de ácidos graxos totais e alguns ácidos graxos específicos (C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9 *cis*-12, C18:3 *cis* e C22:0). Nas dietas contendo SCAG, nenhum efeito ($P > 0,05$) do nível de PDR foi observado sobre o fluxo omasal de AG, enquanto que nas dietas -SCAG, o aumento do nível de PDR aumentou ($P \leq 0,05$) o fluxo omasal total de ácidos graxos. Consequentemente, houve tendência ($P \leq 0,060$) de interação entre os fatores estudados sobre a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 *cis* e C18:3. O aumento do nível de

PDR reduziu ($P \leq 0,05$) a extensão de bio-hidrogenação destes AG nas dietas -SCAG, sem efeitos ($P > 0,05$) nas dietas +SCAG. A adição de SCAG aumentou ($P \leq 0,001$) a extensão de bio-hidrogenação do C18:2, assim como o teor de AG dos *pellets* de bactéria. O nível de PDR da dieta não afetou ($P \geq 0,116$) o perfil de ácidos graxos dos microrganismos, nem o perfil de ácidos graxos do leite. A adição de SCAG reduziu ou tendeu ($P \leq 0,080$) a reduzir os teores de C15:0, C16:0, C16:1, C17:0 e C18:0, e aumentou ($P \leq 0,005$) as concentrações de ácidos graxos insaturados de 18 carbonos nos microrganismos. Além disso, a adição de SCAG reduziu ($P \leq 0,009$) a concentração de todos os ácidos graxos menores do que 18 carbonos e a razão entre saturados e insaturados na gordura do leite, bem como aumentou ($P \leq 0,001$) as concentrações dos ácidos graxos com 18 carbonos ou mais e dos ácidos graxos insaturados. A suplementação lipídica afeta consideravelmente o consumo e fluxo omasal de ácidos graxos, assim como o perfil lipídico dos microrganismos e o perfil de ácidos graxos do leite. Apesar de potencialmente aumentar o fluxo de alguns ácidos graxos insaturados e reduzir a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 e C18:3, nas dietas sem SCAG, o nível de PDR tem poucos efeitos sobre o perfil de ácidos graxos das bactérias e do leite.

Palavras-chave: Ácido linoleico, bio-hidrogenação ruminal, CLA, fluxo pós-ruminal, proteína, lipídios.

4.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of calcium salts of fatty acids (CSFA) addition in dairy cows diets containing different levels of rumen degradable protein (RDP), on the intake and omasal flow of fatty acids (FA), bio-hydrogenation and FA profile of bacteria and milk. Eight Holstein lactating, multiparous and cannulated rumen cows were used in a 4×4 Latin square design. Treatments arrangement was a 2×2 factorial, obtained by combining the CSFA (-CSFA: without supplementation; and + CSFA: with 3.32% DM of CSFA) and RDP level (LRDP: low RDP, with 9.8% RDP DM, and HRDP: high RDP, with 11.0% RDP in the diet DM). Ruminal outflow was evaluated using omasal digesta sampling and a triple marker system: indigestible neutral detergent fiber, ytterbium and cobalt. Samples were prepared to obtain the *pellet* of bacteria associated to the liquid (BAL) phase and adhered to the particle (BAP). At the end of

the experimental period, the feed samples, omasal flow phases, bacteria and milk were submitted to gas chromatography to evaluate FA profile. The addition of CSFA increased ($P < 0.001$) the total FA and medium to long chain FA ($\geq 12C$). Higher RDP level resulted in reduced ($P < 0.001$) C4:0, C12:0, C14:0, C16:0 and C18:0 FA intake, and tended ($P = 0.068$) to reduce C18:1 *trans* intake. There was an interaction ($P \leq 0.095$) between effects of the RDP and CSFA on the omasal flow of total FA and some specific FA (C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9 *cis*-12, C18:3 *cis* and C22:0). This interaction occurred due to the higher ($P \leq 0.05$) omasal flow as a consequence of increased RDP level, in the diets without CSFA. In diets containing CSFA, no effect ($P > 0.05$) of the RDP level was observed on the omasal flow of FA. Consequently, there was a trend ($P \leq 0.060$) of interaction effect between the studied factors on bio-hydrogenation extent of C18:1 *cis* and C18:3. The increase of RDP reduced ($P \leq 0.05$) the bio-hydrogenation extent of these FA in the diets -CSFA, with no effects ($P > 0.05$) on the diets +CSFA. The addition of CSFA increased ($P \leq 0.001$) C18:2 bio-hydrogenation extent, as well as FA content of bacterial *pellets*. Diet RDP level had no effect ($P \geq 0.116$) on microorganisms and milk FA profile. Addition of CSFA decreased or tended ($P \leq 0.080$) to decrease the levels of C15:0, C16:0, C16:1, C17:0 and C18:0 FA, while increased ($P \leq 0.005$) the concentrations of 18-carbon unsaturated fatty acids in the microorganisms. In addition, CSFA reduced ($P \leq 0.009$) the concentration of all FA lower than 18 carbons, saturated and unsaturated ratio in milk fat, and increased ($P \leq 0.001$) the concentrations of FA with 18 carbons or more, as well as unsaturated fatty acids. Lipid supplementation affects FA intake and omasal flow, as well as microorganisms and the milk FA profile. Although potentially increase the flow of some unsaturated fatty acids and reduce the extent of bio-hydrogenation of C18:1 and C18:3 in the diets without CSFA, the level of RDP has no effects on microorganisms and milk FA profile.

Key-words: Linoleic acid, CLA, post-ruminal flow, protein, lipids, ruminal bio-hydrogenation.

4.3 INTRODUÇÃO

A suplementação lipídica tem a capacidade de aumentar a eficiência produtiva animal e alterar o perfil de ácidos graxos (AG) da digesta que chega ao duodeno (BARLETTA et al., 2016), dos lipídios do leite (DEL VALLE et al., 2017) e da carne (SANTANA et al., 2018). No entanto, os microrganismos ruminais bio-hidrogenizam os ácidos graxos dietéticos (BARLETTA et al., 2016; FREITAS JÚNIOR et al., 2018), alterando a quantidade e o perfil dos ácidos graxos que chegam ao intestino delgado.

Com a suplementação lipídica das dietas, principalmente com a adição de óleos advindo de sementes de oleaginosas, ricas em ácido linoleico, tem-se perfil mais insaturado dos lipídios da dieta (BETTERO et al., 2017; FREITAS JÚNIOR et al., 2018). O aumento do nível de AG suplementares tem sido associado a redução da recuperação pós ruminal dos mesmos, provavelmente em função do aumento da incorporação microbiana dos AG dietéticos, em detrimento da síntese lipídica ruminal (PALMQUIST; MATTOS; 2011). Em adição, o tratamento térmico de fontes proteicas e lipídicas tem sido utilizado para reduzir a degradação de proteínas (VAGA; HETTA; HUHTANEN, 2017) e de ácidos graxos (CHOWDHURY et al., 2018). Em recente estudo, Leduc et al. (2017) observaram que a redução do suprimento de proteína degradável no rúmen (PDR) aumenta a digestibilidade aparente do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12), assim como sua eficiência de transferência para o leite.

Apesar da disponibilidade de dados acerca dos efeitos da suplementação lipídica sobre a síntese microbiana e a eficiência de crescimento microbiano (DOUREAU; FERLAY, 1995), não é de nosso conhecimento estudos que tenham avaliado os efeitos dos diferentes teores de PDR e da suplementação lipídica sobre o processo de bio-hidrogenação. Desta forma, nós hipotetizamos que a suplementação com lipídios pode afetar a composição da fração lipídica dos microrganismos, enquanto que o aumento do teor de PDR da dieta, assim como das estimativas de síntese microbiana, pode aumentar a extensão de bio-hidrogenação dos AG insaturados da dieta, contribuindo para o aumento da concentração de AG saturados na gordura do leite. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) em dietas contendo diferentes teor de PDR sobre o consumo e o fluxo omasal de AG, a extensão de biohidrogenação dos AG poli-insaturados e o perfil de ácidos graxos do pellet de bactérias do leite.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais na Experimentação da FMVZ/USP (número de protocolo: 8785220917).

4.4.1 Animais, delineamento e dietas experimentais

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa, canuladas no rúmen, com $207 \pm 23,6$ (média $\pm$ desvio padrão) dias em lactação, $618 \pm 39,0$ kg de peso corporal e $33,4 \pm 2,45$ kg/d de produção de leite, no início do experimento, alojadas em estábulo *Tie Stall*. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado Latino 4×4 replicado, com períodos de 21 dias, sendo 14 de adaptação e sete dias de coletas de dados e amostras. As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações do NRC (2001) (Tabela 4.1). As dietas foram obtidas em um arranjo fatorial 2×2 , no qual foram avaliados os efeitos da adição de SCAG [0 e 3,32% de (Megalac-E[®], Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil) da MS da dieta] e diferentes teores de PDR [9,80 e 11,0% da MS da dieta, de acordo com o NRC (2001)]. As dietas foram isonitrogenadas, o farelo de soja *bypass* (Soypass BR[®], Cargill, Uberlândia, Brasil) e a ureia foram utilizados para mudar o teor de PDR da dieta. Para mais detalhes acerca dos animais, instalações, delineamento e dietas experimentais, consultar a descrição no segundo capítulo desta tese.

4.4.2 Procedimentos experimentais, infusões e coletas

Para análise da composição das dietas, amostras de milho moído, farelo de soja, farelo de soja *bypass*, polpa cítrica, SCAG e premix mineral foram coletadas a cada semana de avaliação e congeladas até as análises químicas. Silagem de milho foi coletada diariamente durante cada período de coletas, agrupada numa amostra composta (uma amostra para cada período) e congelada até a realização das análises químicas.

Os indicadores utilizados para avaliar o fluxo de digesta no canal omasal foram a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) para grandes partículas (GP; HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), cloreto de itérbio para pequenas

partículas (PP; SIDDONS et al., 1985) e cobalto-EDTA para a fase fluida (FF; UDÉN; COLUCCI; VAN SOEST, 1980). As infusões foram realizadas de forma contínua, usando duas bombas peristálticas (Modelo BP-600-4; Milan Equipamentos Científicos, Colombo, PR, Brasil) e uma taxa de 2,91 g de Co e 2,32 g de Yb por dia, das 09:00 h do D14 até a última coleta omasal (15:00 h do D20).

Tabela 4.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	BPDR ¹		APDR ²	
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴
<i>Composição, % MS</i>				
Silagem de milho	50,0	50,0	50,0	50,0
Milho moído	21,4	18,6	23,0	20,2
Farelo de soja	15,6	16,1	19,2	19,6
Farelo de soja <i>Bypass</i> ⁵	5,47	5,45	0,00	0,00
Polpa cítrica	3,97	3,96	3,97	3,96
SCAG ⁶	0,00	3,32	0,00	3,32
Premix mineral ⁷	1,55	1,54	1,55	1,54
Calcário	1,00	0,00	1,00	0,00
Bicarbonato de sódio	0,80	0,80	0,80	0,80
Ureia	0,00	0,00	0,30	0,30
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
<i>Composição química, % MS</i>				
Matéria seca, % matéria natural	39,6	39,6	39,6	39,6
Matéria orgânica	92,1	92,3	92,2	92,4
Fibra em detergente neutro (FDN)	35,9	35,5	35,7	35,4
Amido	27,7	25,8	28,8	26,9
Fibra em detergente ácido	22,6	22,8	22,3	22,4
Proteína bruta	16,4	16,4	16,4	16,4
PDR ⁸	9,80	9,80	11,0	11,0
PNDR ⁹	6,60	6,60	5,40	5,40
Ácidos graxos (AG)	2,26	4,99	2,29	5,02
Lignina	4,46	4,46	4,30	4,31
<i>Perfil de ácidos graxos, % AG</i>				
C4:0	0,65	0,30	0,44	0,21
C12:0	0,15	0,51	0,01	0,45
C14:0	0,45	0,47	0,14	0,33
C15:0	0,24	0,13	0,00	0,02
C16:0	19,3	16,9	17,5	16,1
C18:0	4,40	4,70	3,87	4,46
C18:1 <i>trans</i>	0,13	7,81	0,00	7,71
C18:1 <i>cis-9</i>	22,7	22,3	23,7	22,7
C18:2 <i>cis-9, cis-12</i>	43,4	37,9	46,0	39,2
C18:3 <i>cis-9, cis-12, cis-15</i>	6,31	4,40	6,54	4,51
Outros	2,31	4,59	1,90	4,40

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil).

⁵Farelo de soja *bypass* (Soypass BR®, Cargill, Uberlândia, Brasil);

⁶Sais de cálcio de ácidos graxos;

⁷Cada kg contém: 235 g de Ca; 70 g de Na; 60 g de P; 20 g de S; 20 g de Mg; 2500 mg de Zn; 1600 mg de Mn; 700 mg de Cu; 600 mg de F; 40 mg de I; 20 mg de Se; 15 mg de Co; 10 mg de Cr; 200000 IU de Vit. A; 50000 IU de Vit. D2; e 1500 IU de Vit. E;

⁸PDR: proteína degradável no rúmen, de acordo com o NRC (2001);

⁹PNDR: proteína não degradável no rúmen, de acordo com o NRC (2001).

A digesta omasal foi coletada de acordo com a técnica descrita por Huhtanen Brotz e Satter (1997) e adaptada por Leão et al. (2004), a partir das 00:00 h do D18, a cada 9 horas, até as 15:00 h do D20. Em cada tempo de coleta, aproximadamente 500 mL de amostra foi obtido. Uma subamostra (70 mL) foi processada para obter as bactérias associadas à fase líquida (BAL) e as bactérias associadas à partícula (BAP), usando o método de Krizsan et al. (2010) que foi adaptado para menores volumes de amostra, em função da capacidade dos equipamentos, de acordo com o descrito no segundo capítulo da presente tese. Outra subamostra (aproximadamente 400 mL) foi congelada e, ao final de cada período experimental, as amostras dos diferentes horários de coleta foram agrupadas em uma amostra composta (3,2 L) por vaca em cada período. Esta amostra foi filtrada em pano dessorador e lavada com 1 L de solução de NaCl 0,9%. O sólido retido no pano dessorador foi considerado GP. O filtrado foi centrifugado à $1000 \times g$ por 10 min à 5 °C, sendo o precipitado considerado PP e o sobrenadante definido como a FF (HUHTANEN; BROTZ; SATTER, 1997). As amostras de silagem, assim como das frações do omaso (FF, PP e GP) e dos *pellets* de bactéria (BAL e BAP) foram liofilizadas (LH, Terroni, São Carlos, SP, Brasil) para análise de perfil de AG.

Para avaliação do perfil de AG, amostras de leite foram obtidas de todas as ordenhas realizadas nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental e congeladas separadamente. Após o descongelamento, as amostras dos três dias foram pipetadas, seguindo a proporção de 60:40, observada entre a produção de leite da manhã e da tarde.

4.4.3 Análises laboratoriais

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram pré secas à 60 °C por 72 horas em estufa de ventilação forçada, e moídas em moinho de facas (MA340, Marconi,

Piracicaba, Brasil) com peneira de porosidade de 1 mm, e analisadas quanto ao teor de matéria seca (MS; método 930.15, AOAC 2000). As amostras de alimentos foram analisadas quanto ao teor de cinzas por combustão à 600 °C por 3 horas e a matéria orgânica (MO) foi estimada pela diferença entre as massas, proteína bruta (PB, N $\times$ 6,25; método de Kjeldahl 984.13; AOAC 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC 2000), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18; AOAC 2000). A fibra em detergente neutro (FDN) foi analisada usando α -amilase (UNDERSANDER; MERTENS; THEIX, 1992) e sem a adição de sulfito de sódio (Analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado de acordo com Hendrix (1993), com degradação enzimática (Amyloglucosidase[®], Novozymes, Curitiba, PR, Brasil) e leitura de glicose em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM, Barueri, SP, Brasil).

Para avaliação do fluxo omasal, uma subamostra foi processada à 150 μ m, para avaliação das concentrações de Yb e Co, usando espectrofotometria de absorção (Spectr AA-800; Varian spectrometer, Harbor City, CA, USA). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP. O teor de FDNi das amostras de cada fase do omaso, assim como dos alimentos e sobras, foi obtido após 288 horas de incubação ruminal (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994), em duas vacas previamente adaptadas a uma dieta com baixos teores de lipídios, usando saquinhos de tecido não tecido (TNT) 5 $\times$ 5 cm (CASALI et al., 2008). Após a incubação, as amostras foram lavadas em água corrente até total clareamento e o teor de FDN foi analisado como previamente descrito.

As amostras de BAL e BAP foram agrupadas em uma única amostra de bactérias para cada unidade experimental (vaca em cada período). Para análise de AG, as amostras dos alimentos, das fases do omaso (FF, PP e GP) e *pellet* de bactérias foram submetidas à extração de acordo com Folch, Lees e Sloane Stanley (1957) e ao processo de metilação foi realizado de acordo com Kramer et al. (1997). As amostras foram homogeneizadas com uma solução de clorofórmio e metanol (2:1, v/v); após uma centrifugação (650 $\times$ g por 20 min. à 25 °C), o sobrenadante foi transferido para uma solução de NaCl (1,5%) e centrifugado novamente (650 $\times$ g por 20 min. à 25 °C); a fração lipídica foi transferida para tubos de metilação com tampa. Para o cálculo das perdas durante o processo de metilação, em cada corrida, um tubo (branco) contendo 25

mg de ácido esteárico (C18:0; Sigma Aldrich) foi submetido à todos os passos que as amostras passaram. Foram adicionados 2 mL de uma solução padrão contendo o padrão interno C19 para a estimativa do teor de ácidos graxos da amostra (1 mg/mL; Sigma Aldrich) e 2 mL de uma solução de metóxido de sódio (0,5 M); as amostras foram levadas ao banho-maria (10 min. à 50 °C); após o resfriamento, foram adicionados 3 mL de solução de HCl metanólico (9:1 v/v); as amostras foram homogeneizadas e voltaram para o banho-maria (10 min. à 80 °C); após o resfriamento, foi adicionado 1 mL de hexano; as amostras foram transferidas para um tubo Falcon (50 mL) contendo 10 mL de solução de carbonato de potássio (6%); os tubos foram centrifugados (250 × g por 5 min.); a fração lipídica foi transferida para um tubo contendo carvão ativado; após 3 min. sob refrigeração, o sobrenadante foi transferido para recipientes específicos utilizados no cromatógrafo.

Tabela 4.2 - Perfil de ácidos graxos dos ingredientes das dietas experimentais

Item	SM ¹	MM ²	FS ³	POL ⁴	FSb ⁵	SCAG ⁶
Teor de AG, %MS	1,60	3,23	2,51	2,21	2,19	82,5
Perfil de ácidos graxos, %AG						
C4:0	1,25	-	-	-	3,43	0,01
C12:0	-	-	-	0,17	2,39	0,78
C14:0	0,36	-	-	0,33	5,17	0,47
C15:0	-	-	-	-	4,02	0,05
C16:0	19,4	15,2	16,7	25,8	47,3	14,9
C18:0	4,34	2,82	4,49	5,78	12,8	4,87
C18:1 <i>trans</i>	-	-	-	-	2,29	13,7
C18:1 <i>cis</i> -9	19,9	31,1	17,7	23,2	6,55	22,3
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	38,6	49,7	53,2	35,7	8,16	33,9
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	12,8	1,03	6,38	4,36	-	2,73
Outros	3,35	0,19	1,48	4,63	7,75	6,28

¹Silagem de milho;

²Milho moído;

³Farelo de soja;

⁴Polpa cítrica;

⁵Farelo de soja *bypass*;

⁶Sais de cálcio de ácidos graxos.

Os metil-ésteres de AG foram quantificados usando um cromatógrafo a gás (GC Shimadzu 2010 com injeção automática, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão) equipado com uma coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm i.d. e 0,02 µm de espessura; Supelco Sigma-Aldrich Group, Bellefonte, EUA). Os seguintes padrões foram utilizados para identificar os AG: C4–C24 (TM 37, Supelco Sigma-Aldrich); C18:1 *trans*-11 (V038-1G, Supelco Sigma-Aldrich); C18:2 *trans*-10 *cis*-12 (UC-61M 100 mg,

Nu-Chek Prep Inc., Waterville, MN); e C18:2 *cis*-9 *trans*-11 (UC-60M 100 mg, Nu-Chek Prep Inc.). A extração de lipídios das amostras de leite foi realizada de acordo com Feng et al. (2004), sendo a metilação realizada de acordo com Kramer et al. (1997). A quantificação dos AG no leite foi realizada de acordo com o previamente descrito para as demais amostras.

4.4.4 Cálculos e análises estatísticas

O fluxo omasal de nutrientes foi calculado usando os fatores de reconstituição da digesta proposto por France e Siddons (1986). A extensão de bio-hidrogenação (EB) foi calculada usando a seguinte equação (JENKINS; BRIDGES, 2007):

$$EB \left(\frac{g}{kg} \right) = \left(\frac{AG_{consumo}(g) - AG_{fluxo}(g)}{AG_{consumo}(kg)} \right)$$

Em que $AG_{consumo}$ é o consumo de ácidos graxos e AG_{fluxo} é o fluxo omasal do mesmo ácido graxo.

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.3, SAS Instituto Inc., Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + v_{j:i} + P_k + PDR_l + SCAG_m + PDR \times SCAG_{lm} + e_{ijklm}$$

com: $v_{j:i} \approx N(0; \sigma_v^2)$, e $e_{ijklm} \approx N(0; \sigma_e^2)$; onde: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = media geral; Q_i = efeito fixo de quadrado Latino ($i = 1$ e 2); $v_{j:i}$ = efeito aleatório da vaca dentro de cada quadrado Latino ($j = 1$ à 8); P_k = efeito fixo do período experimental ($k = 1$ à 4); PDR_l = efeito fixo do nível de PDR ($l = 1$ e 2); $SCAG_m$ = efeito fixo do nível de SCAG ($m = 1$ e 2); $PDR \times SCAG_{lm}$ = efeito de interação; e_{ijklm} = erro aleatório residual; N = distribuição normal; σ_v^2 = variância associada ao efeito aleatório de animal (vaca) dentro de quadrado Latino; σ_e^2 = variância do erro. As correlações entre os teores de NNA e o perfil de AG do *pellet* misto de microrganismos foram acessadas utilizando o PROC CORR do SAS. Da mesma forma, avaliou-se a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 *cis*, C18:2 e C18:3, com o fluxo de digesta total e por fase e o NM total e aquele associado à BAL e BAP. Para todas as análises, foi considerado um nível de significância de 5%, sendo valores entre 5 e 10% considerados como tendência.

4.5 RESULTADOS

Não houve interação ($P \geq 0,101$) entre os efeitos da suplementação lipídica e do nível de PDR da dieta sobre o consumo de AG (Tabela 4.3). A adição de SCAG aumentou ($P < 0,001$) o consumo total de AG, assim como o consumo individual dos AG C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 *trans*, C18:2 e C18:3. Os animais alimentados com APDR apresentaram menores ($P < 0,001$) consumos de C4:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 e outros AG e tenderam ($P = 0,068$) a reduzir o consumo de C18:1 *trans* em relação àqueles consumindo BPDR.

Houve interação ($P = 0,041$) entre os efeitos de SCAG e nível de PDR da dieta para o fluxo omasal total de AG (Tabela 4.4). O aumento do nível de PDR da dieta aumentou o fluxo omasal total de AG ($P \leq 0,05$) e os fluxos de C16:0, C17:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12, C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15, C20:0 e C22:0, nas dietas não suplementadas com SCAG, sem afetar ($P > 0,05$) tais fluxos na presença de SCAG. Independentemente do nível de PDR da dieta, a suplementação lipídica aumentou ($P \leq 0,039$) o fluxo de C12:0, C14:0, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:2 *cis*-9 *trans*-11, C18:2 *trans*-10 *cis*-12, C20:5 *cis*, C23:0 e outros AG, não identificados.

Tabela 4.3 - Consumo de ácidos graxos de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Consumo de ácidos graxos, g/d								
Total	533	1133	534	1086	10,8	<0,001	0,117	0,102
C4:0	3,44	3,38	2,35	2,24	0,042	0,147	<0,001	0,696
C12:0	0,79	5,79	0,04	4,83	0,046	<0,001	<0,001	0,240
C14:0	2,49	5,28	0,75	3,56	0,042	<0,001	<0,001	0,473
C16:0	103	192	93,4	175	1,85	<0,001	<0,001	0,136
C18:0	23,5	53,2	20,7	48,4	0,48	<0,001	<0,001	0,125
C18:1 <i>trans</i>	0,72	88,5	0,01	83,7	0,74	<0,001	0,068	0,171
C18:1 <i>cis</i>	121	252	127	247	2,4	<0,001	0,935	0,106
C18:2 <i>cis</i>	231	430	246	425	4,4	<0,001	0,370	0,101
C18:3 <i>cis</i>	33,7	49,8	35,0	49,0	0,56	<0,001	0,721	0,140
Outros	12,3	52,0	10,2	47,8	0,43	<0,001	<0,001	0,134

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR.

A suplementação lipídica aumentou ($P = 0,001$) a extensão de bio-hidrogenação do ácido linoleico (C18:2) e houve tendência ($P \leq 0,060$) de interação entre o nível de PDR e a suplementação lipídica para as extensões de bio-hidrogenação do C18:1 *cis* e C18:3. O aumento do nível de PDR da dieta reduziu ($P \leq 0,05$) as extensões de bio-hidrogenação do C18:1 *cis* e C18:3, nos animais não suplementados com lipídios, sem afetá-las ($P > 0,05$) nos animais alimentados com dietas contendo SCAG.

Tabela 4.4 - Fluxo omasal de ácidos graxos de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Fluxo omasal de ácidos graxos, g/d								
Total	648 ^c	1066 ^a	746 ^b	1051 ^a	15,8	<0,001	0,116	0,041
C4:0	19,6	14,0	10,6	15,2	1,33	0,302	0,848	0,535
C6:0	4,81	3,23	2,30	3,69	0,594	0,936	0,397	0,225
C12:0	1,76	3,89	2,46	3,73	0,179	<0,001	0,469	0,242
C14:0	5,45	9,58	7,18	9,17	0,389	0,001	0,403	0,181
C15:0	6,23	8,19	8,14	7,50	0,357	0,361	0,399	0,082
C16:0	137 ^c	242 ^a	167 ^b	237 ^a	4,7	<0,001	0,110	0,033
C16:1 <i>cis</i> -9	2,37	3,16	3,17	3,15	0,167	0,174	0,164	0,148
C17:0	2,57 ^b	3,17 ^a	3,06 ^a	3,09 ^a	0,092	0,023	0,117	0,037
C18:0	281 ^b	349 ^a	322 ^{a,b}	336 ^a	7,8	0,011	0,336	0,081
C18:1 <i>trans</i> -10	2,63	13,9	3,39	14,0	0,456	<0,001	0,600	0,568
C18:1 <i>trans</i> -11	26,5	80,1	31,0	85,3	2,54	<0,001	0,297	0,946
C18:1 <i>cis</i> -9	34,7 ^c	72,0 ^a	44,4 ^b	70,4 ^a	1,32	<0,001	0,116	0,034
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	26,0 ^c	41,5 ^a	33,0 ^b	40,9 ^a	1,04	<0,001	0,136	0,074
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	3,61	6,36	3,87	5,41	0,268	0,001	0,518	0,269
C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,041	0,144	0,001	0,282	0,043	0,039	0,580	0,312
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	1,47 ^c	2,71 ^a	1,91 ^b	2,57 ^a	0,063	<0,001	0,241	0,032
C20:0	2,89 ^b	4,00 ^a	3,62 ^a	3,87 ^a	0,101	0,002	0,149	0,043
C20:5 <i>cis</i>	1,82	2,60	2,31	2,72	0,063	0,001	0,024	0,145
C22:0	1,65 ^c	3,80 ^a	2,09 ^b	3,82 ^a	0,060	<0,001	0,063	0,095
C23:0	0,58	1,03	0,72	0,96	0,047	0,001	0,710	0,221
Outros	84,7	202	93,5	202	4,9	<0,001	0,552	0,618
Extensão de bio-hidrogenação, g/kg								
C18:1 <i>cis</i>	713 ^a	714 ^a	652 ^b	715 ^a	7,5	0,044	0,057	0,051
C18:2	888	903	868	904	3,2	0,001	0,145	0,107
C18:3	956 ^a	945 ^b	946 ^b	947 ^{a,b}	1,6	0,136	0,205	0,060

^{a-c}Teste de médias (diferença mínima significativa de Fisher - LSD) à 5% de probabilidade.

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR.

A adição de SCAG aumentou ($P < 0,001$) a concentração de AG nas amostras de digesta omasal de PP e GP (Tabela 4.5), sem afetar ($P = 0,191$) a concentração destes na FF. Consequentemente, houve aumento ($P \leq 0,036$) do fluxo de ácidos graxos totais em PP e GP, com tendência ($P = 0,063$) de aumento na FF, em resposta à suplementação lipídica. O aumento do nível de PDR da dieta tendeu ($P = 0,099$) a aumentar a concentração de AG em GP, sem afetar as estimativas de fluxo segmentado por fase ($P \geq 0,198$).

Tabela 4.5 - Teor e fluxo de ácidos graxos totais de cada fase do omaso de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Teores de ácidos graxos, %MS								
FF	3,10	3,25	3,28	3,66	0,126	0,191	0,308	0,785
PP	10,0	17,1	10,4	17,3	0,221	<0,001	0,450	0,735
GP	4,05	6,22	4,87	6,82	0,223	<0,001	0,099	0,786
Fluxo de ácidos graxos, g/d								
FF	160	196	130	172	10,1	0,063	0,198	0,873
PP	287	595	377	591	21,9	<0,001	0,224	0,190
GP	202	275	240	288	13,7	0,036	0,360	0,652

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

Com a adição de SCAG às dietas, houve aumento ($P < 0,001$) da concentração total de AG nos microrganismos (Tabela 4.6). O nível de PDR da dieta não afetou ($P \geq 0,200$) a concentração de AG das bactérias, nem o perfil de AG destas. Além disso, foi observado redução ($P \leq 0,018$) dos teores de C15:0, C17:0 e C18:0, com a adição de SCAG nas dietas, com tendência ($P \leq 0,080$) de diminuição das concentrações de C16:0 e C16:1 *cis*-9. Com a adição de SCAG nas dietas, houve aumento ($P \leq 0,005$) das concentrações de ácidos graxos insaturados (C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-11, C18:1 *cis*-9 e C18:2 *cis*-9 *cis*-12), assim como dos ácidos graxos não identificados, na fração lipídica dos microrganismos.

Tabela 4.6 - Perfil de ácidos graxos das bactérias presentes na digesta omasal de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
AG, g/kg MS	33,4	41,1	34,5	44,1	0,80	<0,001	0,200	0,523
Perfil de ácidos graxos, g/kg de AG								
C12:0	6,93	5,83	6,35	6,27	0,193	0,136	0,854	0,189
C14:0	16,8	15,1	16,1	15,4	0,49	0,233	0,859	0,614
C15:0	18,4	13,7	17,9	13,7	0,33	<0,001	0,837	0,461
C16:0	230	222	227	219	2,5	0,080	0,493	0,955
C16:1 <i>cis</i> -9	4,36	3,40	4,09	2,41	0,325	0,052	0,333	0,576
C17:0	6,46	4,94	6,41	5,03	0,056	<0,001	0,816	0,409
C18:0	484	453	491	459	6,2	0,018	0,600	0,934
C18:1 <i>trans</i> -9	4,07	10,6	4,35	10,3	0,21	<0,001	0,990	0,485
C18:1 <i>trans</i> -11	34,1	58,7	33,3	56,2	1,46	<0,001	0,532	0,753
C18:1 <i>cis</i> -9	39,8	34,9	40,0	33,6	0,94	0,005	0,771	0,695
C18:2 <i>cis</i> -9								
<i>cis</i> -12	23,8	19,4	23,4	18,4	0,71	0,003	0,626	0,813
Outros	131	158	130	161	4,0	0,001	0,943	0,764

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

Independentemente da adição de SCAG ($P \geq 0,190$), o nível de PDR não afetou ($P \geq 0,116$) o perfil de AG do leite (Tabela 4.7). Por outro lado, a adição de SCAG reduziu ($P \leq 0,009$) a concentração de todos os AG's de cadeia curta e média ($\leq 17C$) e aumentou ($P \leq 0,001$) a concentração de todos os AG com mais de 17 carbonos na gordura do leite. Consequentemente, observou-se redução ($P < 0,001$) dos teores de AG saturados, dos AG com número ímpar de carbono e da proporção entre saturados e insaturados, com aumento da concentração de AG insaturados.

O aumento da concentração de NNA nos *pellets* de BAP esteve inversamente correlacionado ($R = -0,440$; $P = 0,012$) com o teor de ácidos graxos médios dos *pellets* (Tabela 4.8). O aumento da concentração de NNA dos *pellets* de BAP esteve positivamente correlacionado ($R \geq 0,361$ e $P \leq 0,037$) às proporções de C12:0, C15:0 e C17:0. Ainda, a análise de correlação apontou que a extensão de bio-hidrogenação dos ácidos graxos (C18:1 *cis*, C18:2 e C18:3) esteve correlacionada negativamente ($P \leq$

0,013; $R \leq -0,433$) com o fluxo de sólidos (GL e PP) e de BAP. Por outro lado, houve uma correlação positiva ou tendência à correlação ($P \leq 0,084$; $R \geq 0,311$) entre as taxas de bio-hidrogenação destes ácidos graxos e o fluxo de líquidos (FF) e de BAL.

Tabela 4.7 - Perfil de ácidos graxos do leite de vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas contendo sais de cálcio de ácidos graxos e diferentes teores de proteína degradável no rúmen

Item	BPDR ¹		APDR ²		EPM	P ⁵		
	-SCAG ³	+SCAG ⁴	-SCAG ³	+SCAG ⁴		SCAG	PDR	INT
Perfil de ácidos graxos, g/kg de AG								
C4:0	14,2	12,4	14,5	12,6	0,35	0,002	0,886	0,866
C6:0	16,3	9,93	16,3	9,76	0,318	<0,001	0,818	0,913
C8:0	12,1	5,85	12,1	5,77	0,214	<0,001	0,960	0,980
C10:0	33,1	14,6	32,9	14,8	0,70	<0,001	0,973	0,862
C11:0	0,924	0,028	0,891	0,050	0,0343	<0,001	0,932	0,678
C12:0	41,1	20,1	41,4	20,1	0,9077	<0,001	0,791	0,968
C13:0	2,01	0,103	2,11	0,001	0,0538	<0,001	0,999	0,344
C14:0	130	90,3	128	91,2	1,6287	<0,001	0,940	0,691
C14:1	9,60	7,17	9,27	7,31	0,3358	<0,001	0,774	0,485
C15:0	11,5	7,47	12,1	7,76	0,1557	<0,001	0,167	0,634
C16:0	345	267	341	273	5,3	<0,001	0,922	0,414
C16:1	12,2	10,6	13,2	10,7	0,37	0,009	0,475	0,535
C17:0	6,31	4,62	6,51	4,70	0,054	<0,001	0,161	0,517
C18:0	98,5	135	102	139	2,1	<0,001	0,386	0,995
C18:1 <i>trans</i> -9	1,84	7,16	1,99	6,66	0,120	<0,001	0,473	0,190
C18:1 <i>trans</i> -11	9,30	28,4	9,22	25,0	0,76	<0,001	0,255	0,278
C18:1 <i>cis</i> -9	196	264	198	261	5,8	<0,001	0,963	0,629
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	25,6	33,8	24,6	33,6	0,47	<0,001	0,344	0,484
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12								
<i>cis</i> -15	1,19	2,11	1,07	2,01	0,128	0,001	0,630	0,974
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	3,51	9,42	3,21	8,28	0,237	<0,001	0,116	0,322
Outros	29,5	69,1	29,4	66,2	1,37	<0,001	0,576	0,610
Índices, g/kg AG								
Saturados	711	568	710	579	6,4	<0,001	0,533	0,421
Insaturados	259	363	261	355	6,2	<0,001	0,608	0,456
Sat.: Insat.	2,78	1,60	2,77	1,65	0,072	<0,001	0,747	0,671
<16C	271	168	270	170	3,3	<0,001	0,941	0,815
16C	357	278	354	284	5,3	<0,001	0,863	0,474
>16C	342	485	347	480	5,7	<0,001	0,986	0,519
C ímpar	20,7	12,4	21,6	12,5	0,25	<0,001	0,306	0,477

¹Baixa proteína degradável no rúmen (PDR), com 9,8% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

²Alta proteína degradável no rúmen, com 11,0% MS, de acordo com as equações do NRC (2001);

³-SCAG: dietas controle, sem a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos;

⁴+SCAG: dieta contendo 3,32% de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac E, Vaccinar, Belo Horizonte, Brasil);

⁵Probabilidades: SCAG: efeito da adição de sais de cálcio (-SCAG vs +SCAG); PDR: efeito do nível de PDR (BPDR vs APDR); INT.: interação entre os efeitos de SCAG e PDR;

Tabela 4.8 - Correlação de Pearson entre o teor de nitrogênio não amoniacal e o perfil de ácidos graxos dos pellets de bactéria e entre as extensões de bio-hidrogenação e os componentes microbianos do fluxo omasal.

NNA ¹			NNA-BAL ²			NNA-BAP ³		
Variável	R	P	Variável	R	P	Variável	R	P
C15:0	0,420	0,017	C20:2	-0,322	0,072	AG total	-0,440	0,012
C17:0	0,409	0,020	C12:0	-0,192	0,292	C15:0	0,411	0,019
AG total	-0,353	0,048	C17:0	0,180	0,324	C17:0	0,371	0,037
C16:1	0,337	0,059	C20:0	0,175	0,338	C12:0	0,371	0,037
C14:0	0,294	0,103	C14:0	0,154	0,399	C18:2	0,311	0,084
C20:0	0,277	0,125	C16:1	0,146	0,427	C16:1	0,308	0,086
BHB18:1 <i>cis</i> ⁴			BHB18:2 ⁵			BHB18:3 ⁶		
Variável	R	P	Variável	R	P	Variável	R	P
BAP ⁷	-0,487	0,005	FSOL ⁹	-0,608	<0,001	FSOL ⁹	-0,547	0,001
FF ⁸	0,465	0,007	BAP ⁷	-0,603	<0,001	FF ⁸	0,485	0,005
FSOL ⁹	-0,449	0,010	FF ⁸	0,348	0,051	BAL ¹⁰	0,449	0,010
BAL ¹⁰	0,434	0,013	BAL ¹⁰	0,310	0,084	BAP ⁷	-0,433	0,013
FLUXO ¹¹	0,109	0,554	NM ¹²	-0,210	0,250	NM ¹²	0,085	0,643
NM ¹²	0,022	0,906	FLUXO ¹¹	-0,150	0,414	FLUXO ¹¹	0,046	0,801

¹Nitrogênio não amoniacal; ²NNA em bactérias associadas à fase líquida; ³NNA em bactérias aderidas à partícula; ⁴Extensão de bio-hidrogenação do C18:1 *cis*; ⁵Extensão de bio-hidrogenação do C18:2; ⁶Extensão de bio-hidrogenação do C18:1; ⁷Bactérias aderidas à partícula; ⁸Fluxo de fase fluida; ⁹Fluxo de sólidos (GP+PP); ¹⁰Bactérias associadas à fase líquida; ¹¹Fluxo de matéria seca; ¹²Fluxo de nitrogênio microbiano.

4.6 DISCUSSÕES

Como apresentado na Tabela 4.1, a adição de SCAG aumentou o teor de AG da dieta de 2,27 para 5,00 % e o efeito mais evidente sobre o perfil de AG da dieta se deu sobre os teores de C18:1 *trans* e *cis*. Os sais de cálcio avaliados no presente estudo apresentaram 10,4 % de ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) e 3,30 % de ácido elaídico (C18:1 *trans*-9), enquanto que a concentração de ácido oleico (C18:1 *cis*-9) foi de apenas 22,3% dos AG. O aumento da concentração de AG *trans* pode ser atribuído ao tratamento térmico utilizado durante o processamento do produto, uma vez que este induz a formação de isômeros *trans* (PRIVE et al., 2010).

Conforme esperado, a adição de SCAG aumentou o consumo de AG pelos animais. No entanto, o aumento do nível de PDR reduziu o consumo de AG com até 18 carbonos, encontrados em grande concentração nos lipídios presentes no farelo de soja *bypass* utilizado no presente estudo. O efeito combinado da redução não estatística no consumo de matéria seca, apresentada no capítulo 2, associado à redução dos teores nas

dietas contendo APDR (Tabela 4.2), resultou em redução significativa do consumo destes AG. Este resultado parece não indicar efeito fisiológico e direto do nível de PDR da dieta sobre o consumo de AG. Estudando o efeito de dois teores de PDR na dieta [85 ou 100% das exigências estabelecidas pelo NRC (2001)], Leduc et al. (2017) não encontraram qualquer efeito sobre o consumo de AG.

Houve interação entre o nível de PDR e a adição de SCAG sobre o fluxo omasal de AG total. Esta ocorreu porque apenas nas dietas não suplementadas com lipídios houve aumento do fluxo de AG em consequência do aumento do nível de PDR da dieta. Diferentes fatores podem contribuir para o aumento do fluxo de AG em dietas contendo maiores teores de PDR: as dietas com APDR apresentavam teores de AG ligeiramente maiores; apesar da ausência de diferenças no fluxo microbiano total estimado utilizando ^{15}N como indicador, na ausência de SCAG, o aumento do nível de PDR proporcionalmente aumentou o fluxo de microrganismos associados à partícula e reduziu o fluxo de bactérias associadas à fase líquida (capítulo 3). Como apresentado por Bessa et al. (2009), o teor de AG das bactérias aderidas à partícula é consideravelmente maior do que o teor de AG nas bactérias associadas à fase líquida. Consequentemente, o fluxo de AG associado aos microrganismos aumenta, contribuindo para o aumento do fluxo de AG nos animais alimentados com APDR. Evidentemente, a adição de SCAG às dietas contribui de maneira efetiva para aumentar o fluxo omasal de AG (BARLETTA et al., 2016; BETTERO et al., 2017), enquanto que o efeito do nível de PDR da dieta tornou-se nulo.

Evidências adicionais do aumento da contribuição dos microrganismos para o fluxo de AG podem ser observadas pelo aumento do fluxo de AG de cadeia ímpar de carbono, os quais são atribuídos à síntese lipídica microbiana (VLAEMINCK et al., 2005). Para o fluxo de C15:0 e C17:0, por exemplo, houve interação entre os efeitos do nível de PDR e da adição de SCAG. O fluxo observado nos animais alimentados com APDR, sem SCAG, não diferindo daqueles animais consumindo +SCAG. Ainda, as análises de correlação mostraram aumento da concentração de NNA quando a concentração destes ácidos graxos foi maior nos ácidos graxos do *pellet* microbiano misto.

A suplementação lipídica aumentou o fluxo omasal de AG, especialmente daqueles com cadeia média e longa. A produção de ácido linoleico conjugado (CLA) tem sido associada a muitos efeitos metabólicos tanto nos animais, quanto na saúde humana (PRIVE et al., 2010). A via principal de produção de CLA no rúmen é a partir

da isomerização do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12), pela ação de isomerases microbianas (ENJALBERT; TROEGELER-MEYNADIER, 2009). A ação de Δ 12-isomerase produz o C18:2 *cis*-9 *trans*-11, enquanto que a atividade de Δ 9-isomerase produz o C18:2 *trans*-10 *cis*-12 (GRIINARI; BAUMAN, 1999). No presente estudo, apesar da ausência destes isômeros na dieta, estes foram identificados na digesta omasal, sendo o fluxo omasal positivamente afetado pelo aumento do consumo de AG poli-insaturados, alcançado com o fornecimento de SCAG.

O C18:2 *trans*-10 *cis*-12 tem sido relacionado como o principal intermediário da bio-hidrogenação ruminal associado com o processo de depressão da síntese de gordura no leite (BAUMGUARD et al., 2000; URRUTIA; HARVATINE, 2017). O mecanismo de atuação deste AG sobre a síntese lipídica envolve a inibição de uma série de genes que regulam a lipogênese nas células secretoras da glândula mamária (BAUMGUARD et al., 2002; PETERSON et al., 2004), resultando na redução da síntese de AG de cadeia curta (até 16 carbonos), como observado no presente estudo. O aumento da síntese de C18:2 *trans*-10 *cis*-12 em detrimento de C18:2 *cis*-9 *trans*-11 tem sido relacionado à redução do pH ruminal (FUENTES et al., 2009). Por outro lado, o aumento da concentração de AG insaturados no rúmen pode causar drásticas mudanças nas populações microbianas (RICO et al., 2015) e elevar as concentrações ruminais destes isômeros. No presente estudo, o fluxo de C18:2 *trans*-10 *cis*-12 foi muito baixo nas dietas sem SCAG. Embora tenha ocorrido aumento considerável com a adição de SCAG, os valores observados ainda foram muito baixos, não sendo possível a detecção deste na gordura do leite. Para o C18:2 *cis*-9 *trans*-11, houve aumento de 57% no fluxo omasal de AG quando os animais receberam SCAG. Além do fluxo consideravelmente maior deste AG, a atividade de Δ 9-dessaturase nos tecidos dos ruminantes permite a síntese deste a partir de C18:1 *trans*-11 (PALMQUIST; ST-PIERRE; MCCLURE, 2004), fazendo com que este tenha importância quantitativa na gordura do leite.

A redução do ácido linoleico conjugado leva à produção de ácido vacênico (C18:1 *trans*) e a redução deste leva à produção de ácido esteárico (C18:0). A redução de ácido vacênico a esteárico é inibida pela concentração de AG insaturados no ambiente ruminal (TORAL et al., 2017). Apesar do aumento de 79% no consumo de AG poli-insaturados, nas dietas com SCAG, o fluxo omasal de C18:1 *trans*-10 e C18:1 *trans*-11 foi, respectivamente, 4,6 e 2,9 vezes maior nas dietas contendo SCAG, em relação àquelas sem SCAG.

Lascano et al. (2016) encontraram redução da taxa de bio-hidrogenação e aumento da concentração de C18:2 e C18:3, com o aumento da taxa de degradação do amido. No presente estudo, o aumento do fornecimento de amido (Tabela 4.1) nas dietas APDR, em relação à dieta BPDR, resultou em aumento da digestibilidade aparente total do amido, como reportado no segundo capítulo desta tese. De acordo com Lascano et al. (2016), a redução da taxa de bio-hidrogenação com o aumento da degradação do amido é resultado frequentemente obtido, sendo esta redução atribuída à redução do pH ruminal. Vale ressaltar que, no presente estudo, o nível de PDR da dieta não resultou em qualquer efeito sobre o pH ruminal. Embora a digestibilidade do amido possa contribuir para o aumento do fluxo de C18:2, o aumento do suprimento de AG tem efeito muito maior, levando a ausência de efeito do nível de PDR sobre o fluxo omasal de C18:2 e as taxas de bio-hidrogenação do C18:2, nas dietas suplementadas.

O aumento do nível de PDR da dieta resultou em redução da extensão de bio-hidrogenação apenas nas dietas não suplementadas com lipídios. É interessante observar que a quantidade de C18:2 *trans*-10 *cis*-12 observada nas amostras de digesta omasal destes animais foi próxima de zero. Como discutido anteriormente, o aumento da contribuição lipídica dos microrganismos associados à partícula pode ter favorecido o aumento do fluxo de C18:1 e C18:3. Foi observado aumento proporcional do fluxo de microrganismos aderidos à partícula, que possuem maior teor de AG (BESSA et al., 2009). Não foi observado nenhum efeito do nível de PDR da dieta sobre o perfil de AG dos *pellets* de bactérias. Desta forma, o aumento do fluxo da proporção de AG fluindo junto com os microrganismos aderidos à partícula pode ter contribuído para a redução da extensão de bio-hidrogenação nas dietas contendo elevados teores de PDR e não suplementadas com SCAG. A correlações dos valores de extensão de bio-hidrogenação em função dos componentes do fluxo de matéria seca e NM evidencia que os fluxos de partículas (GP e PP) e BAP são importantes em reduzir a extensão de bio-hidrogenação dos AG. Ademais, o aumento do fluxo de líquidos está associado ao aumento das extensões de bio-hidrogenação.

Foi observado aumento do fluxo de C18:3 com a suplementação lipídica. Nos animais alimentados com SCAG foi observada a presença de ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5 *cis*), especialmente junto às pequenas partículas (0,35% dos AG totais da fase). A ausência deste nos alimentos sugere a capacidade de síntese microbiana, embora os potenciais efeitos negativos deste AG sobre o metabolismo ruminal sejam amplamente documentados (TORAL et al., 2017). A síntese endógena de EPA em

mamíferos envolve processo de alongação e dessaturação de AG. Como estes não possuem enzimas capazes de dessaturar carbonos tão distantes do carbono terminal, o principal precursor para a síntese deste é o C18:3, que também apresentou elevadas concentrações nos animais alimentados com SCAG. Embora tenha havido aumento da concentração destes no fluxo omasal, não foi detectado a presença de EPA na gordura do leite.

A adição de SCAG aumentou a extensão de bio-hidrogenação do C18:2. A ocorrência de extensa bio-hidrogenação do C18:2 pode ser confirmada pelo aumento considerável do fluxo omasal de ácido esteárico e AGs de 18 carbonos e com insaturações na configuração *trans* (BARLETTA et al., 2016; BETTERO et al., 2017). A suplementação com SCAG aumentou o teor de AG totais presentes nos microrganismos pela incorporação direta dos AG dietéticos. A incorporação dos AG dietéticos pelas bactérias pode ser evidenciada pela redução da recuperação de AG dietéticos no fluxo omasal, naquelas dietas com SCAG (130 vs 95%), em relação à dieta não suplementada. O aumento da incorporação dos AG altera o perfil de AG do *pellet* microbiano, aumentando a proporção de AG com 18 C e insaturados, em detrimento dos AG saturados ou com número menor de carbonos.

O nível de PDR da dieta não afetou o perfil de AG no leite. Leduc et al. (2017) também encontraram poucos efeitos do nível de PDR da dieta sobre o perfil de AG do leite. Esta ausência de diferenças se deve a maior magnitude do efeito da adição do SCAG, que afeta consideravelmente a concentração de intermediários da bio-hidrogenação e consequentemente o teor de gordura e perfil de AG do leite. Estudando a relação entre depressão da gordura do leite e perfil de ácidos graxos do leite, utilizando correlação canônica, Conte et al. (2018) agruparam C18:1 *cis*-11, C18:3 *cis*9,*cis*12,*cis*-15 e os ácidos graxos insaturados como o C18:1 *trans*-9 e C18:1 *trans*-11 como indutores de depressão da gordura do leite, enquanto que o C15:0 foi alocado no grupo de AG mais importantes na gordura do leite dos animais do grupo controle. Como observado nas análises de correlação, apesar do aumento da contribuição da fração GP nos animais alimentados com APDR, o aumento da incorporação de AG no *pellet* microbiano esteve associado à redução do teor de C15:0 e C17:0 no *pellet* microbiano.

4.7 CONCLUSÕES

A suplementação lipídica afeta o consumo e fluxo omasal de ácidos graxos, assim como o perfil lipídico dos microrganismos e o perfil de ácidos graxos do leite. O aumento do teor de PDR da dieta aumenta o fluxo total de AG e reduz a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 e C18:3 nos animais não suplementados com SCAG. Contudo, o nível de PDR tem poucos efeitos sobre o perfil de ácidos graxos dos microrganismos ruminais e do leite.

4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.

BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; BETTERO, V. P.; ARAUJO, C. E.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; FERREIRA DE JESUS, E.; MINGOTI, R. D.; BENEVENTO, B. C.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, n. 9, p. 111-121, 2016.

BETTERO, V. P.; DEL VALLE, T. A.; BARLETTA, R. V.; ARAÚJO, C. E.; FERREIRA DE JESUS, E.; ALMEIDA, G. F.; TAKIYA, C. S.; ZANFERARI, F.; PAIVA, P. G.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.. Use of protected fat sources to reduce fatty acid biohydrogenation and improve abomasal flow in dry dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 224, n. 2, p. 30-38, 2017.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SAEBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 1, p. R179–R184, 2000.

BAUMGARD, L. H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E.. *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2155-2163, 2002.

BESSA, R. J. B.; MAIA, M. R. G.; JERONIMO, E.; BELO, A. T.; CABRITA, A. R. J.; DEWHURST, R. J.; FONSECA, A. J. M. Using microbial fatty acids to improve understanding of the contribution of solid associated bacteria to microbial mass in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, n. 3-4, p. 197-206, 2009.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.

CHOWDHURY, M. R.; LASHKARI, S.; JENSEN, S. K.; AMBYE-JENSEN, M.; WEISBJERG, M. R. Effects of Heat Treatment of Green Protein on in Situ Protein Disappearance and in Vitro Fatty Acid Biohydrogenation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 30, p. 8169–8178, 2018.

CONTE, G.; DIMAURO, C.; SERRA, A.; MACCIOTTA, N. P. P.; MELE, M. A canonical discriminant analysis to study the association between milk fatty acids of ruminal origin and milk fat depression in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6497-6510, 2018.

DEL VALLE, T. A.; PAIVA, P. G.; FERREIRA DE JESUS, E.; ALMEIDA, G. F.; ZANFERARI, F.; COSTA, A. G. B. V. B.; BUENO, I. C. S.; RENNÓ, F. P. Dietary chitosan improves nitrogen use and feed conversion in diets for mid-lactation dairy cows. **Livestock Science**, v. 201, n. 7, p. 22-29, 2017.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**, v. 43, n. 2, p. 97-110, 2005.

ENJALBERT, F.; TROEGELER-MEYNADIER, A. Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. In: DESTAILLATS, F.; SEBEDIO, J. L.; DIONISI, F.; CHARDIGNY, J. M. **Trans fatty acids in human nutrition**. Bridgwater, UK, Ed. The Oily Press, P. J. Barnes & Associates, 2009. p. 1-42.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. A rapid method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3785-3788, 2004.

FRANCE J.; SIDDONS, R. C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 121, n. 1, p. 105-119, 1986.

FREITAS, J.E.; TAKIYA, C.S.; DEL VALLE, T.A.; BARLETTA, R.V.; VENTURELLI, B.C.; VENDRAMINI, T.H.A.; MINGOTI, R.D.; CALOMENI, G.D.; GARDINAL, R.; GANDRA, J.R.; BETTERO, V.P.; FERREIRA DE JESUS, E.; OLIVEIRA, M.D.S.; RENNÓ, F.P. Ruminant biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows fed diets supplemented with soybean oil, whole soybeans, or calcium salts of fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7881-7891, 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FUENTES, M. C.; CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P. W.; VLAEMINCK, B. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, 4456-4466, 2009.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: YURAWECZ, M. P.; MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; PARIZA, M. W.; NELSON, G. J. **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. Champaign, Ed. AOCS Press, 1999. p. 180-200.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n. 3, p. 211-227, 1994.

HUHTANEN, P.; BROTZ, P. G.; SATTER, L. D. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1380-1392, 1997.

JENKINS, T. C.; BRIDGES JR, W. C. Protection of fatty acids against ruminal

biohydrogenation in cattle. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 778-789, 2007.

KRAMER, J.K.; FELLNER, V.; DUGAN, M.E.; SAUER, F.D.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen FA with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1219-1228, 1997.

KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G. A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1138-1147, 2010.

LASCANO, G. J.; ALENDE, M.; KOCH, L. E.; JENKINS, T. C. Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6334-6341, 2016.

LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; RENNÓ, L. N.; CECON, P. R.; AZEVEDO, J. A. G.; GONÇALVES, L. C.; VALADARES, R. F. D. Intake and total and partial digestibility of total carbohydrates, neutral detergent fiber and nonfiber carbohydrates in steers under three ingestion regimes and two method of digesta collections: abomasal and omasal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 670-678, 2005.

LEDUC, M.; GERVAIS, R.; TREMBLAY, G.F.; CHIQUETTE, J.; CHOUINARD, P.Y. Milk fatty acid profile in cows fed red clover- or alfalfa-silagebased diets differing in rumen-degradable protein supply. **Animal Feed Science and Technology**, v. 223, n. 1, p. 59-72, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: NRC, 2001. 381 p.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 299-322.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2523-2527, 2004.

PRIVÉ, F.; COMBES, S.; CAUQUIL, L.; FARIZON, Y.; ENJALBERT, F.; TROEGELER-MEYNADIER, A. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 711-22, 2010.

RICO, D. E.; PRESTON, S. H.; RISSER, J. M.; HARVATINE, K. J. Rapid changes in key ruminal microbial populations during the induction of and recovery from diet-induced milk fat depression in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 3, p. 358-367, 2015.

SANTANA, M. C. A.; MESSANA, J. D.; FIORENTINI, G.; LAGE, J. F.; DIAN, P. H. M.; CANESIN, R. C.; REIS, R. A.; BERCHIELLI, T. T. Characteristics of carcass and meat of heifers finished on pasture amended with different supplement frequency and soybean oil source. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 98, n. 1, p. 32-43, 2018.

SIDDONS, R. C.; PARADINE, J.; BEEVER, D. E.; CORNELL, P. R. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. **British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 509-519, 1985.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; CARREÑO, D.; LESKINEN, H.; BELENGUER, A.; SHINGFIELD, K. J.; FRUTOS, P. *In vitro* response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6187-6198, 2017.

UDÉN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta - rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, n. 7, p. 625-632, 1980.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. Omaha: National Forage Testing Association, 1992. 139 p.

URRUTIA, N.; HARVATINE, K. J. Effect of conjugated linoleic acid and acetate on milk fat synthesis and adipose lipogenesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5792-5804, 2017.

VAGA, M.; HETTA, M.; HUHTANEN, P. Effects of heat treatment on protein feeds evaluated in vitro by the method of estimating utilisable crude protein at the duodenum. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 6, p. 1259-1272, 2017.

VLAEMINCK, B.; DUFOUR, C.; VAN VUUREN, A. M.; CABRITA, A. R. J.; DEWHURST, R. J.; DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Use of odd and branched-chain fatty acids in rumen contents and milk as a potential microbial marker. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 1031-1042, 2005.

5 CONCLUSÃO GERAL

A suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) reduz o consumo e aumenta o tempo de ruminação, a eficiência de síntese de proteína microbiana e a produção de leite. O aumento do nível de proteína degradável no rúmen (PDR) da dieta reduz as perdas fecais de nitrogênio (N) e a produção de leite, além de aumentar as perdas urinárias de N. Apesar dos resultados indicarem ausência de interação entre os fatores citados sobre o metabolismo ruminal do N e o desempenho animal, a adição de SCAG e em dietas com baixos teores de PDR maximizam o desempenho produtivo e aumenta a eficiência de uso dos nutrientes em vacas leiteiras.

Em relação ao ^{15}N , a utilização de bases purina (BP) como indicador microbiano, superestima o fluxo microbiano, especialmente das bactérias associadas à fase líquida, pela presença de BP de origem dietética. A suplementação lipídica afeta a relação entre as estimativas de fluxo de bactérias aderidas à partícula utilizando ^{15}N e BP, levando à baixa correlação entre as estimativas com as duas técnicas. A recuperação urinária dos derivados de purinas (DP) é variável e aumenta nas dietas contendo alto do nível de PDR em relação às dietas contendo baixo PDR. As estimativas de excreção endógena de DP e de excreção de creatinina não são afetadas pelos fatores dietético avaliados no presente estudo, sendo os valores médios de 0,262 mmol/kg/dia e 0,640 mmol/kg^{0,75}/dia, respectivamente.

A suplementação lipídica afeta o consumo e fluxo omasal de ácidos graxos, assim como o perfil lipídico dos microrganismos e o perfil de ácidos graxos do leite. O aumento do teor de PDR da dieta aumenta o fluxo total de ácidos graxos e reduz a extensão de bio-hidrogenação do C18:1 *cis* e C18:3 nos animais não suplementados com SCAG. Contudo, o nível de PDR tem poucos efeitos sobre o perfil de ácidos graxos dos microrganismos ruminais e do leite.