

ANEXO I - PROJETO SIMPLIFICADO / PLANO DE TRABALHO**CONTRATO DE COMODATO****I – DADOS CADASTRAIS DO PROJETO****1. TÍTULO DO PROJETO**

Efeitos dos Níveis de Inclusão de Grãos Secos de Destilaria e Ureia em Dietas de Bovinos em Terminação: Avaliação Nutricional, Metabolismo e Cinética de Ureia

2. ÓRGÃO EXECUTOR

Departamento de Zootecnia

3. ÁREA DE ABRANGÊNCIA

Pesquisa

Inovação Tecnológica

Extensão

Extensão Tecnológica

Ensino

Desenvolvimento Institucional

4. RESUMO DO PROJETO

Este projeto de pesquisa tem por objetivos avaliar os efeitos dos níveis de grãos secos de destilaria (DDG; 10 e 20% da matéria seca, MS) e níveis crescentes de PDR (0, 0,5 e 1,0% de ureia) na dieta de bovinos sobre a cinética da ureia, digestibilidade intestinal de aminoácidos, expressão de genes ruminais e hepáticos, a quantidade de ureia-N reciclada e sua incorporação em proteína microbiana. Neste estudo, 7 novilhos serão distribuídos em um delineamento em quadrado Latino incompleto 7 x 4. Os tratamentos serão arranjos em esquema fatorial 2 x 3 + 1, sendo 2 níveis de DDG na dieta (10 e 20%) e 3 níveis de ureia (0, 0,5 e 1,0%), além do tratamento controle baseado em dieta com farelo de soja e milho moído, totalizando sete tratamentos com quatro repetições cada. As dietas serão constituídas de 20% de silagem de milho e 80% de concentrado por kg de matéria seca (MS), relação estabelecida com base no inventário das práticas nutricionais adotadas por nutricionistas em confinamentos no Brasil

II – DESCRIÇÃO DO PROJETO**5. INTRODUÇÃO**

A segurança alimentar é um dos principais desafios globais deste século. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima que até 2050 a população mundial chegará a 9,1 bilhões e a produção de alimentos (excluindo os alimentos usados para biodiesel) deverá aumentar em 70% para atender a essas necessidades (FAO, 2009). Contudo, as práticas a serem adotadas para permitir este aumento da produção agrícola e animal deverão ser estabelecidas com "intensificação

sustentável", ou seja, o aumento produtivo não seja associado aos impactos ambientais e envolva a abertura de novas terras (Royal Society, 2009).

O setor do agronegócio desempenha um papel fundamental na geração de receita no Brasil. Dentro desse contexto, a pecuária de corte desempenha um papel de destaque, contribuindo significativamente para a criação de empregos diretos e indiretos, bem como para a dinâmica econômica nacional e internacional. Globalmente, o Brasil se posiciona como um líder na pecuária, tendo o maior rebanho comercial do mundo, com um total de 202 milhões de cabeças (ABIEC, 2023). Esse número representa cerca de 12,18% do rebanho mundial.

Em termos de produção bovina, o Brasil registrou uma produção de 10,79 milhões de toneladas de equivalente carcaça (TEC) em 2022. Embora essa produção coloque o Brasil como o segundo maior produtor global, é notável o seu crescimento nos últimos dez anos, liderando com um aumento de 1,7 milhões de toneladas nesse período. No que se refere às exportações, o Brasil se destaca ainda mais, sendo responsável por 27,7% das exportações mundiais no ano de 2022, conforme dados da ABIEC (2023).

Diante desses expressivos números, a intensificação do sistema pecuário brasileiro torna-se cada vez mais relevante. Isso é evidenciado pelo aumento de aproximadamente 74% no número de bovinos confinados nos últimos dez anos, com a terminação em confinamento respondendo por 18% do total de animais abatidos em 2022 (ABIEC, 2023).

O amido é a principal fonte de energia para o ruminante, e é a partir dela, juntamente com o nitrogênio que os animais realizam a síntese de proteína microbiana, sendo essa a principal fonte de proteína metabolizável para bovinos, além disso é equilibrada na maioria dos aminoácidos essenciais (Santos e Pedroso, 2011). A proteína metabolizável é compreendida pela combinação da proteína não-degradável no rúmen (PNDR) e do conteúdo de proteína microbiana que alcança o intestino delgado. A proteína que sofre degradação no rúmen (PDR) é a principal fonte de nitrogênio para a síntese da proteína microbiana.

Nos confinamentos de bovinos no Brasil, o nível de PDR têm sido historicamente incluído em 9% da dieta (Millen et al., 2009; Oliveira & Millen, 2014; Pinto & Millen, 2018; Silvestre & Millen, 2021). Vale observar que, com base nos dados de desempenho de bovinos em confinamentos brasileiros (Silvestre & Millen, 2021), o teor de proteína bruta (PB) e a proporção de PDR são cerca de 17% mais elevados em comparação com as estimativas de exigência pelo modelo BR-Corte (11,6% e 7,9%, respectivamente; Valadares Filho et al., 2016).

Diante deste cenário, o fornecimento de PDR adequada para o crescimento dos microrganismos ruminais é essencial para o desempenho dos animais, pois influencia diretamente a síntese de proteína microbiana. A restrição na oferta de PDR pode limitar essa síntese, o que por sua vez pode prejudicar o crescimento dos animais. Portanto, o fornecimento adequado da proporção entre PDR e PNDR pode resultar em um melhor desempenho de crescimento e também auxiliar na redução da excreção de nitrogênio no meio ambiente (Wagner et al., 2009).

Uma estratégia para manipular os teores de N é equilibrar dietas de bovinos de corte em crescimento para proteína metabolizável (PM). Isso pode ser alcançado através da inclusão de alimentos com diferentes proporções de PDR e PNDR, levando há um excesso de proteína metabolizável que pode ser convertida em ureia e potencialmente reciclada para o rúmen, se transformando em fonte de PDR (Huntington e Archibeque, 2000).

A utilização de coprodutos provenientes da indústria de etanol, como os grãos secos de destilaria (DDG, de dried distillers grains) tem sido cada vez mais crescente no Brasil (Silvestre & Millen, 2021), dada a

a expansão do mercado do etanol de milho, no Mato Grosso e Goiás, estados com maior produção de grãos do país. Como resultado, o DDG tem sido ofertado no mercado nacional com importante alimento concentrado proteico para a alimentação animal.

A incorporação destes coprodutos que seriam descartados no meio ambiente não apenas reduz potenciais danos ambientais, mas também estimula a economia da cadeia produtiva. Outro ponto positivo da substituição do DDG por milho na dieta de bovinos em terminação é que o DDG contém baixo teor de amido, resultante do processo de fermentação para a produção de etanol (Spiehs et al., 2002), e, associado às maiores concentrações de fibra, fazem do DDG um alimento que reduz a incidência de acidose ruminal, além da menor necessidade de inclusão de fibra na dieta (Klopfenstein, 2008).

Para a produção do DDG o coproduto sólido é submetido a secagem, que reduz a disponibilidade da proteína para os microrganismos do rúmen, aumentando os teores de PNDR para cerca de 65% (Kleinschmit et al., 2007). De acordo com Klopfenstein (2001), DDG são utilizados em dietas de terminação de bovinos como fonte de proteína, com inclusões de até 15%, mas também como fonte de energia quando os níveis de inclusão são mais elevados. Apesar do alto teor de proteína metabolizável deste ingrediente, não é possível afirmar com clareza quanto a reciclagem contribui para o suprimento de nitrogênio para os microrganismos ruminais, uma vez que é influenciada por vários fatores, dietéticos, fisiológicos, etc (Batista et al., 2017). Portanto, o grau de deficiência de PDR quando o DDG é incluído nas dietas não é conhecido (Stalker et al, 2007).

O fornecimento de ureia em diferentes níveis de exigências, como fonte de PDR suplementar, em dietas contendo DDG pode ser uma alternativa para suprir o déficit de nitrogênio e ampliar a fermentação ruminal. No entanto, torna-se necessário estabelecer o nível de PDR necessário para ampliar a fermentação ruminal e o crescimento microbiano quando o DDG é incluído na dieta em diferentes proporções, além de avaliar a contribuição da reciclagem de ureia para o suprimento de PDR.

A nossa hipótese é que a maior inclusão de DDG na dieta de bovinos em terminação pode reduzir a exigência de PDR da dieta, pois, quando a PNDR é fornecida em níveis que excedem as exigências do animal, o grupo amino dos aminoácidos em excesso são removidos, é convertido em ureia no fígado e esta pode ser reciclada para o rúmen, reduzindo a deficiência de PDR. Além disto, a principal fonte de energia no milho é o amido e a substituição parcial do amido por DDG, que contém maior teor de fibra, pode reduzir a exigências de nitrogênio pelos microrganismos ruminais. Portanto, é de grande importância definir a inclusão de ureia na dieta, como fonte de PDR, para sustentar a fermentação ruminal e a produção de proteína microbiana quando diferentes níveis de DDG são incluídos na dieta de bovinos de corte recebendo dietas à base de milho moído.

Referências Bibliográficas

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportações brasileiras de carne bovina, 2023.
- BATISTA, E. D. et al. The effect of CP concentration in the diet on urea kinetics and microbial usage of recycled urea in cattle: a meta-analysis. *Animal*, v. 11, n. 8, p. 1303-1311, 2017.
- BLOM, E. J.; ANDERSON, D. E.; BRAKE, D. W. Increases in duodenal glutamic acid supply linearly increase small intestinal starch digestion but not nitrogen balance in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 94, n. 12, p. 5332-5340, 2016.
- BRAKE, D. W.; TITGEMEYER, E. C.; ANDERSON, D. E. Duodenal supply of glutamate and casein both improve intestinal starch digestion in cattle but by apparently different mechanisms. *Journal of Animal Science*, v. 92, n. 9, p. 4057-4067, 2014.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2009. How to Feed the World in 2050. Available online: https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf

- GALYEAN, M. L.; DEFOOR, P. J. Effects of roughage source and level on intake by feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 14_suppl_2, p. E8-E16, 2003.
- HARRELSON, F. W. et al. Influence of corn hybrid and processing method on nutrient digestibility, finishing performance, and carcass characteristics. *Journal of animal science*, v. 87, n. 7, p. 2323-2332, 2009.
- HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S. L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. In: *Proceedings of American Society of Animal Science*, p. 1-11, 1999.
- KLEINSCHMIT, D. H. et al. Ruminal and intestinal degradability of distillers grains plus solubles varies by source. *Journal of dairy science*, v. 90, n. 6, p. 2909-2918, 2007.
- KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. BOARD-INVITED REVIEW: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *Journal of animal science*, v. 86, n. 5, p. 1223-1231, 2008.
- KLOPFENSTEIN, Terry J. et al. Estimating forage protein degradation in the rumen. *Journal of Animal Science*, v. 79, n. suppl_E, p. E208-E216, 2001.
- MABJEESH, S. J.; GUY, D.; SKLAN, D. Na⁺/glucose co-transporter abundance and activity in the small intestine of lambs: enhancement by duodenal infusion of casein. *British journal of nutrition*, v. 89, n. 5, p. 573-580, 2003.
- MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *Journal of animal Science*, v. 87, n. 10, p. 3427-3439, 2009.
- NOCEK, James E.; TAMMINGA, Seerp. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of dairy science*, v. 74, n. 10, p. 3598-3629, 1991.
- OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. *Animal Feed Science and Technology*, v. 197, p. 64-75, 2014.
- OWENS, C. E. et al. Mathematical linkage of total-tract digestion of starch and neutral detergent fiber to their fecal concentrations and the effect of site of starch digestion on extent of digestion and energetic efficiency of cattle. *The Professional Animal Scientist*, v. 32, n. 5, p. 531-549, 2016.
- OWENS, FIN; ZINN, R. A.; KIM, Y. K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of animal science*, v. 63, n. 5, p. 1634-1648, 1986.
- PINTO, A. C. J.; MILLEN, D. D. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: the 2016 Brazilian survey. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 99, n. 2, p. 392-407, 2018.
- Royal Society. 2009. Reaping the benefits: Science and the sustainable intensification of global agriculture. London: Royal Society.
- SANTOS, F. A. P.; PEDROSO A. M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES. A.V OLIVEIRA, S.G. (2º Ed). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, p. 265-292, 2011.
- SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 50, 2021.
- SPIEHS, M. J.; WHITNEY, M. H.; SHURSON, G. C. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. *Journal of animal science*, v. 80, n. 10, p. 2639-2645, 2002.
- STALKER, L. A.; ADAMS, D. C.; KLOPFENSTEIN, T. J. Urea inclusion in distillers dried grains supplements. *The Professional Animal Scientist*, v. 23, n. 4, p. 390-394, 2007.
- SWANSON, K. C.; RICHARDS, C. J.; HARMON, D. L. Influence of duodenal infusion of glucose or partially hydrolyzed starch on pancreatic exocrine secretion in beef steers. *Journal of animal science*, v. 80, n. 4, p. 1112-1116, 2002b.
- SWANSON, K. C.; RICHARDS, C. J.; HARMON, D. L. Influence of duodenal infusion of glucose or partially hydrolyzed starch on pancreatic exocrine secretion in beef steers. *Journal of animal science*, v. 80, n. 4, p. 1112-1116, 2002b.
- THEURER, C. Brent. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 63, n. 5, p. 1649-1662, 1986.
- VALADARES FILHO, S. C., COSTA E SILVA, L. F., GIONBELLI, M. P. et al. *BRCORTE 3.0. Exigências nutricionais de zebrinos puros e cruzados*. 2016.
- WAGNER, J. J.; ENGLE, T. E.; BRYANT, T. C. The effect of rumen degradable and rumen undegradable intake protein on feedlot performance and carcass merit in heavy yearling steers. *Journal of animal science*, v. 88, n. 3, p. 1073-1081, 2010.
- YU, Z. P. et al. Effect of duodenal infusion of leucine and phenylalanine on intestinal enzyme activities and starch digestibility in goats. *Livestock Science*, v. 162, p. 134-140, 2014.

6. OBJETIVO GERAL

Objetivar-se-á com este projeto avaliar os efeitos dos níveis de grãos secos de destilaria (10 e 20% da matéria seca, MS) e níveis crescentes de PDR, através da inclusão de ureia (0, 0,5 e 1,0% MS), na dieta de bovinos alimentados contendo alta proporção de concentrado sobre: consumo voluntário, os

locais de digestão, parâmetros ruminais, metabolismo de compostos nitrogenados, expressão de genes ruminais e hepáticos, a quantidade de ureia-N reciclada e sua incorporação em proteína microbiana.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivar-se-á avaliar os efeitos da inclusão de ureia (0; 0,5 e 1,0% da matéria seca, MS) na dieta de bovinos alimentados com dieta à base de milho moído contendo dois níveis de DDG (10% vs. 20%) ou dieta controle a base de farelo de soja sobre:

- a) Consumo voluntário e coeficientes de digestibilidade totais e parciais da MS, matéria orgânica, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não-fibrosos (CNF) e nível dietético de nutrientes digestíveis totais (NDT);
- b) Balanço ruminal e corporal de compostos nitrogenados;
- c) Cinética de ureia, mediante infusão de ureia duplamente marcada (15N15N-ureia) e quantificar a ureia-N reciclada e sua incorporação em proteína microbiana;
- d) Concentração média diária de glicose, ureia, albumina, aspartato aminotransferase, creatinina, proteína total, IGF-I e insulina no sangue.
- e) Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR);
- f) Concentração dos ácidos graxos voláteis acético, propiônico, butírico, isobutírico e isovalérico no rúmen;
- g) Síntese total e eficiência de síntese de proteína microbiana no rúmen;
- h) Microbioma ruminal;
- i) Expressão de genes envolvidos com o transporte de ureia no rúmen e ciclo da ureia no fígado.

8. JUSTIFICATIVA

Os efeitos dos níveis de inclusão de grãos secos de destilaria e ureia sobre a digestibilidade intestinal de aminoácidos algumas lacunas do conhecimento podem exploradas:

- É de suma importância a avaliação de estratégias nutricionais visando reduzir a emissão de poluentes nitrogenados para o meio ambiente e incrementar a eficiência de utilização do N;
- A redução da concentração de PB e PDR da dieta é a estratégia nutricional mais eficiente para reduzir a excreção de N e ampliar a eficiência de seu uso. Contudo, estudos sob diferentes características dietéticas precisam ser conduzidos para estabelecer estas concentrações mínimas, sobretudo quando diferentes processamentos de grãos são empregados.
- O crescente interesse dos nutricionistas de bovinos de corte confinados no Brasil em aumentar a energia da dieta através da inclusão de grãos processados (silagem de grãos úmidos), não foi acompanhado pelo incremento do nível de PDR na dieta;
- O milho flint produzido no Brasil apresenta menor degradação ruminal do amido em comparação com o milho dent produzido nos Estados Unidos;
- Apesar da importância da reciclagem de ureia-N para ruminantes, a maioria dos modelos nutricionais não consideram a quantidade de ureia-N que é reciclada para o TGI ou a sua contribuição para o fornecimento de PDR;
- Uma melhor compreensão dos fatores que afetam a cinética da ureia e o uso microbiano da ureia-N reciclada permitirá aos pesquisadores melhorarem a estimativa do suprimento de N e das exigências de proteína em futuros modelos para formulação de rações para bovinos de corte.
- Informações relativos ao impacto do processamento de milho e níveis crescentes de ureia sobre a reciclagem de ureia-N para o TGI, o uso microbiano de ureia-N reciclada e sua subsequente utilização

para fins anabólicos em bovinos *Bos indicus* alimentados com dieta contendo alta inclusão de concentrado são completamente inexistentes na literatura nacional e internacional, relevando a necessidade de investigações desta natureza;

Vale ressaltar que, embora 7 novilhos sejam necessários para condução do experimento, serão fistulados 10 novilhos. Baseado na experiência do pesquisador, a possibilidade de inclusão de mais animais mantido sobre as mesmas condições experimentais terá como objetivo garantir que haverá número adequado de animais para condução e finalização do experimento. Portanto, a solicitação total será de 10 novilhos fistuladas no rúmen, duodeno e íleo (3 animais extras), pois eventualmente algum destes poderá não apresentar condições de saúde ou rejeição de alguma cânula, inviabilizando o uso experimental. Caso isto aconteça, os animais permanecerão sob os cuidados do executor do projeto.

Após avaliação veterinária, se os 10 novilhos forem considerados adequados para a experimentação após as cirurgias, todas serão usadas no experimento; fornecendo um número maior de animais para incrementar o número de observações experimentais e o poder experimental. Adicionalmente, a inclusão dos animais extra poderá ser útil se algo de errado acontecer com os demais animais do grupo durante o experimento, o que poderia reduzir o número de observações obtidas.

9. METODOLOGIA / FORMA DE DESENVOLVIMENTO

O experimento será realizado no Setor de Metabolismo do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

Animais, delineamento experimental e tratamentos:

Serão utilizados sete novilhos, fistulados no rúmen, jejuno e íleo, com peso corporal de 350 kg. Estas novilhas serão mantidas em baias individuais com aproximadamente 20 m², providas de piso de concreto, comedouro e bebedouro, com acesso irrestrito a água. Previamente ao início do experimento as novilhas serão adaptadas por 30 dias às condições de manejo, instalações e à dieta inicial basal com relação volumoso:concentrado (V:C) de 80:20.

O delineamento experimental será um quadrado incompleto 7 x 4, com quatro períodos 24 dias cada, consistindo 14 dias para adaptação aos tratamentos (Machado et al., 2016) e os 12 dias restantes às coletas. Os tratamentos serão arrançados em esquema fatorial 2 x 3 + 1, sendo 2 níveis de DDG na dieta (10 e 20%) e 3 níveis de ureia (0, 0,5 e 1,0%), além de um tratamento controle com dieta a base de milho e farelo de soja, totalizando sete tratamentos com quatro repetições cada (Tabela 1). As dietas serão constituídas de 20% de silagem de milho e 80% de concentrado por kg de matéria seca (MS), relação estabelecida com base no inventário das práticas nutricionais adotadas por nutricionistas em confinamentos no Brasil, elaborado por Silvestre & Millen (2021), conforme demonstrada na Tabela 1. A silagem de milho e o concentrado serão pesados separadamente, misturados à mão no momento da alimentação e a ração em mistura total será fornecida às 6h00 e 16h00. O consumo será ajustado permitindo-se de 50 a 100 g de sobras/kg de dieta ofertada.

Consumo e digestibilidade

Entre o 15^o e 19^o dia de cada período o consumo será monitorado a partir da quantidade de silagem, SMR e ração concentrada fornecidos (15^o ao 18^o dia) e das sobras obtidas (16^o ao 19^o dia). Os alimentos e as sobras serão amostrados durante o período de coletas e submetidas à secagem parcial em estufa de ventilação forçada (55°C) por 72 horas. Após a secagem, as amostras serão processadas

em moinho de facas com peneiras de porosidade 2 e 1 mm e compostas (com base no peso seco) por animal em cada período experimental. Os ingredientes da ração concentrada serão amostrados diretamente dos silos/sacos na fábrica nos dias da mistura. Estas amostras serão armazenadas para posteriores análises laboratoriais.

A excreção total de fezes será mensurada entre o 19º e 22º dia de cada período. As fezes serão recolhidas imediatamente após cada defecação espontânea diretamente do piso de concreto e armazenadas em recipientes de 20-L. Após 24 h de coleta, o recipiente será trocado, as fezes serão misturadas manualmente e alíquotas de 10% da excreção diária (~300 g) serão retidas, congeladas e parcialmente secas (55°C; 96 h). Amostra fecal do 19º dia será usada para quantificar o background de 15N e a amostra do 22º dia para avaliar o enriquecimento de 15N no platô de concentração para o cálculo da cinética de ureia (Wickersham et al., 2008).

Parâmetros urinários

A partir destes mesmos dias supracitados, será realizada a coleta total de urina usando-se sondas de Folley nº 26, duas vias, segundo Valadares et al. (1997). Serão acopladas mangueiras de polietileno às sondas, as quais direcionarão a urina a reservatórios de polietileno que serão mantidos em caixas de isopor com gelo para manter a urina resfriada. Ao final de 24 horas, o volume total de urina será mensurado e 1% do volume diário será subamostrado e congelado, sendo ao final dos dias de coleta, no 20º dia, serão obtidas duas alíquotas compostas proporcionalmente ao volume excretado em cada dia, por animal e período experimental. As amostras de urina do 19º e 22º dia serão usadas para analisar a concentração de 15N no background e no platô de concentração, respectivamente, para o cálculo da cinética de ureia (Wickersham et al., 2008).

Tabela 1 – Composição das dietas

Item	Níveis de DDG na dieta						
	Controle	10%			20%		
		Inclusão de ureia					
		0	0,5%	1,0%	0	0,5%	1,0%
Ingredientes, % da MS							
Milho moído	68,5	66,0	66,0	66,0	56,0	56,0	56,0
Milho silagem	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Grãos secos de destilaria, DDG	---	10,0	10,0	10,0	20,0	20,0	20,0
Farelo de soja	7,5						
Núcleo mineral-vitâmico ¹	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Caulin	---	1,0	0,5	---	1,0	0,5	---
Ureia	1,0	---	0,5	1,0	---	0,5	1,0
Composição química estimada							
Proteína bruta	14,0	10,8	12,2	13,6	13,2	14,6	16,0
Proteína degradável no rúmen	9,0	5,0	6,3	7,7	5,6	6,9	8,3
Proteína não-degradável no rúmen	5,0	5,8	5,9	5,9	7,6	7,7	7,7
Amido	54,0	50,0	49,4	49,4	43,0	43,0	43,0
Fibra em detergente neutro	18,8	24,3	24,3	24,3	28,5	28,5	28,5
Nutrientes digestíveis totais	78,4	79,0	78,3	78,3	78,0	78,0	78,0

¹ Núcleo mineral contendo monensina para atingir a concentração de 28 mg/kg MS.

Infusão de 15N15Ureia-N:

No 18º dia de cada período um cateter temporário será colocado na veia jugular direita de cada novilha para infusão de 15N15Ureia-N (98% de pureza; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, EUA) para avaliação da cinética de ureia. O cateter (1,02 mm d.i., 1,78 mm d.e.; Tygon®, S-54-HL), será inserido 15 centímetros dentro da veia por punção venosa percutânea utilizando-se agulha hipodérmica (2,5 × 110 mm) após a desinfecção da pele e injeção subcutânea de xilocaína (lidocaína 20 mg/mL). O cateter será fixado por uma sutura na pele entre dois pequenos pedaços de mangueira (5 a 8 mm de comprimento) deslizados sobre os cateteres utilizando um par de hemostato após a remoção da agulha hipodérmica (Kristensen et al., 2010). O cateter será inserido antes do início da infusão para minimizar transtornos de rotina e assegurar que a 15N15Ureia-N será infundida a tempo. Após a colocação do cateter, para evitar a perda de permeabilidade, será infundida 5 mL de solução salina heparinizada (0,9% NaC e 10 UI heparina/mL) a cada 6 horas até as 06h00 do 20º dia, momento em que iniciará a infusão de 15N15Ureia-N.

Para o cálculo da taxa de infusão de 15N15Ureia-N pressupor-se-á que a produção hepática de ureia será proporcional ao consumo de N e a concentração da solução ajustada para obter um enriquecimento de 15N15Ureia-N urinário de 0,10% de enriquecimento (APE) no platô (Marini e Van Amburgh, 2003). A solução de 15N15Ureia-N será preparada utilizando-se técnicas estéreis em câmara de fluxo laminar, filtrada em filtro bacteriológico (0,22 µm; Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em recipiente de vidro esterilizado, tampado com septo de borracha esterilizado e armazenado a 4°C até à sua utilização. A solução de 15N15Ureia-N será infundida continuamente com a taxa de infusão de 5,00 mL/h, permitindo liberar 0,350 mmol de Ureia-N/h, utilizando-se bomba de infusão de seringa (BS-9000 Multi-Phaser, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) até às 16h00 do 23º dia, quando será coletada a última amostra. Todas as seringas serão pesadas antes e após a infusão para determinar a taxa exata infundida.

Parâmetros sanguíneos

No 19º dia serão realizadas coletas de sangue (20 mL) via catéter às 6h00, 12h00, 18h00 e 00h00. Uma amostra será coletada em tubo de 8,5 mL com ativador de coágulo e gel para separação de soro (BD Vacutainer® SST II Plus, São Paulo, Brasil) para análise de ureia, albumina, aspartato aminotransferase, creatinina, proteína total, IGF-I e insulina. A segunda amostra será coletada em tubo de 6 mL com EDTA e fluoreto de sódio (BD Vacutainer® Fluoreto/EDTA, São Paulo, Brasil) para análise da glicose. Após a coleta, as amostras serão centrifugadas (3.600 × g por 15 min a 4°C) e, em seguida o soro e plasma foram transferidos para microtubos de 2 mL e imediatamente congelados (-20°C) para posteriores análises.

Fluxo de digesta duodenal e ileal

Com o objetivo de estimar o fluxo de digesta duodenal e ileal, os animais receberão 5 g/dia de Co-EDTA (Úden et al., 1980) do 15º ao 22º dia de cada período experimental, usando-se uma bomba peristáltica (BP-600-8; Milan Scientific Equipment, Inc., Colombo, PR). Do 19º ao 22º dia de cada período experimental, amostras de digesta duodenal (500 mL) serão obtidas diretamente via cânula a cada 3-h de intervalo no período de 24-h para representação diária (Allen & Linton, 2007), seguindo-se a distribuição: 19º dia –3h00 e 15h00; 20º dia – 6h00 e 18h00; 21º dia – 9h00 e 21h00; 22º dia – 12h00 e 00h00.

Ao final das coletas será elaborada uma amostra composta referente ao fluxo de digesta (4,0 L), para cada animal de cada tratamento. Uma sub-amostra referente ao fluxo de digesta (2,5 L) será filtrada em filtro de nylon 100 μm , com área de poro de 44% de superfície (Sefar Nitex 100/44, Sefar, Thal, Suíça) para separação das fases líquida (FL) e sólida (FS). O restante (1,5 L) será processado como digesta duodenal total ou não representativa (DANR). Após estes procedimentos, as amostras compostas de digesta duodenal serão imediatamente congeladas à -80°C e posteriormente liofilizadas e moídas em moinhos de facas à 2 e 1 mm, sendo armazenadas para posteriores análises.

Parâmetros ruminais

No 23º dia serão realizadas coletas de fluido ruminal em 6 horários para avaliação do pH, concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e nitrogênio amoniacal ruminal (NAR): antes da alimentação (6h00), 2, 4, 6, 8 e 10 horas após o fornecimento das dietas. As amostras serão coletadas manualmente em cinco pontos diferentes na interface líquido-sólido do rúmen, filtradas em camada tripla de gaze e submetidas à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Em seguida, uma alíquota de 20 mL será fixada com 5 mL de ácido metafosfórico (25% p/v) e armazenada à -20°C , para posterior avaliação da concentração de AGV. Outra amostra de 40 mL de líquido de rúmen será misturada com 1-mL de H_2SO_4 (50% v/v) e congelada para posterior análise de NAR.

Cinética de ureia

No 23º dia de cada período experimental, amostras de digesta duodenal e ruminal (200 mL cada) serão coletadas antes (6h00), 2, 4, 6, 8 e 10 horas após a alimentação matinal, para mensurar o enriquecimento de ^{15}N na proteína microbiana. O esquema de amostragem será uma adaptação dos horários das coletas efetuadas por Titgemeyer et al. (2012) compreendendo 72 a 82 horas de infusão, período no qual o enriquecimento isotópico de ^{15}N terá atingido o platô de enriquecimento, conforme protocolo de coleta validado por Wickersham et al. (2009). Posteriormente as amostras serão congeladas a -80°C e liofilizadas. Amostras sólidas e do fluido ruminal serão usadas para isolar bactérias ruminais por processos de centrifugação, conforme descrito por Cecava et al. (1990), em seguida, foram congelados a -80°C e posteriormente liofilizados por 72 h.

Pool ruminal

No 24º dia de cada período experimental será realizado o esvaziamento total do rúmen para quantificação da massa de conteúdo ruminal e com o intuito de determinar a taxa de passagem e de digestão de amido e do material fibroso às 12h00 (6 horas após a alimentação matinal) (Oba & Allen, 2003; Allen & Linton, 2007). Após a evacuação total a digesta será pesada, homogeneizada a mão e retirada amostras em triplicata (Olson et al., 1999; Wickersham et al., 2004) para posteriores análises. Posteriormente, a digesta será imediatamente retornada ao rúmen dos respectivos animais.

Microbioma ruminal

No 24º dia serão realizadas coletas de conteúdo ruminal serão coletadas duas amostras (~15 mL) de fluido ruminal, separadas em fração sólida e fração líquida (6 horas após alimentação) em pontos padronizados no rúmen. Imediatamente após a coleta, as amostras serão colocadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C .

Biópsia ruminal e hepática

Amostras de biópsia ruminal serão coletadas do saco ventral do rúmen, aproximadamente 25 cm abaixo da cânula, após evacuação total do conteúdo no 24º dia de cada período experimental. O saco ventral será externalizado manualmente e cerca de três papilas serão rapidamente excisadas o mais próximo possível da parede ruminal, sem remover a base das papilas, a partir de cinco pontos diferentes. Todas as amostras serão imediatamente lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH = 7,04), compostas por cada animal e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. Finalmente, as amostras serão armazenadas a -80 ° C até o isolamento total do RNA.

Após a biópsia ruminal, será realizada a biópsia do fígado, no 11º espaço intercostal direito no ponto de interseção com uma linha imaginária paralela à coluna vertebral, partindo da extremidade lateral da tuberosidade ilíaca, e administrado um anestésico local (cloridrato de lidocaína HCl, 20 mg/mL, 6 mL volume total) via subcutânea. Adicionalmente será administrado um antibiótico (Oxitat La Plus, 1 mL para cada 10 kg de peso vivo) via intramuscular. O local da biópsia será limpo com um desinfetante para a pele (Iodophor/Betadine). Após a higienização, uma incisão de 1 cm será feita com um bisturi e uma agulha esterilizada de biópsia para tecidos moles Tru-Cut será introduzida direcionando-a ao órgão para punção e remoção de fragmento do lobo direito, que será imediatamente armazenado em nitrogênio líquido. Após o procedimento, a incisão será lavada com solução salina estéril / água e fechada com cola de tecido veterinário. Um spray antibiótico será aplicado no local da incisão e, em seguida, coberto com spray Prata. Todos os animais serão monitorados durante um período de 48 horas pós-biópsia.

Análises Estatísticas

Para a análise estatística, todos os resultados serão testados quanto à normalidade (Davis et al., 1989) e se seguirão uma distribuição normal ($P > 0,10$). Caso os dados não apresentem uma distribuição normal, estes serão transformados sendo submetidos ao PROC RANK do SAS.

Os dados serão analisados com arranjo fatorial $2 \times 3 + 1$, seguindo-se o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + U_j + DU_{ij} + \epsilon_{ijkl};$$

em que: Y_{ijkl} = variáveis dependentes medidas no animal k recebendo o nível de DDG i e submetido ao nível de ureia j durante o período l ; μ = constante geral; D_i = efeito do nível de DDG i (efeito fixo); U_j = efeito da inclusão de ureia j (efeito fixo); DU_{ij} = efeito da interação entre o nível de DDG i e os níveis de ureia j (efeito fixo); ϵ_{ijkl} = efeito aleatório assumindo distribuição independente normal (NID) $(0; \sigma^2\epsilon)$.

As comparações entre médias de tratamentos serão realizadas por intermédio da decomposição da soma dos quadrados relacionadas a esta fonte de variação em contrastes ortogonais associados aos efeitos dos níveis de DDG na dieta (10 e 20%), os efeitos de ordem linear e quadrático da inclusão de ureia na dieta (0, 0,5; e 1,0% da MS; dentro do nível de inclusão de DDG se for detectado a interação), além do controle vs. 10% DDG e controle vs. 20% DDG.

No tocante a avaliação do microbioma ruminal, será realizada a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) para testar as diferenças dos tratamentos. Serão utilizados os valores individuais de dissimilaridade Bray-Curtis em cada animal para determinar as mudanças nas comunidades. As variáveis taxonômicas serão associadas com as sequenciais usando o classificante treinado Naïve Bayes (Bokulich et al., 2018) na base de dados SILVA 132 de tamanho total do rRNA 16s (Quast et al., 2013).

Todos os procedimentos estatísticos serão conduzidos por intermédio do PROC MIXED implementado no programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2) adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

10. RESULTADOS ESPERADOS

O projeto pretende contribuir com informações nutricionais e metabólicas básicas que gerem conhecimentos exatos dos efeitos da inclusão de ureia (i.e., níveis de PDR na dieta) em bovinos alimentados com dietas à base de milho grão flint moído, contendo diferentes níveis de DDG (10 ou 20%). Tais informações esperam-se, poderão ser acrescidas sobre o conhecimento atual da nutrição de bovinos confinados, visando à formulação de dietas de forma precisa, minimizando-se custos e perdas ambientais e maximizando-se o retorno econômico do investimento em sistemas de terminação.

III – PRAZO DO COMODATO

11. PRAZO EM QUE OS SEMOVENTES PERMANECERÃO SOB POSSE DA UFLA

12 meses

IV – PLANO DE TRABALHO DO COMODATO

12. SERVIDOR RESPONSÁVEL PELA GUARDA DOS ANIMAIS

Função no Projeto Coordenador	Nome Erick Darlisson Batista	CPF 067.***.566-01
Instituição UFLA	Cargo/Função: Professor Adjunto	

13. ESPECIFICAÇÕES DOS ANIMAIS

QUANTIDADE	RAÇA	IDADE	PESO	SEXO
10	Zebuínos da raça	12 a 18 meses	250 a 350 kg	Machos não castrados
CARACTERÍSTICAS VISUAIS		CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS		FAIXA DE PREÇO POR ANIMAL
Animais com boa condição corporal, sadios, com boa conformação dos membros anteriores e posteriores.		Animais com temperamento tranquilo, boa conformação corporal e resistência.		R\$1.500 a R\$ 1.800

14. CRONOGRAMA

FASE DO PROJETO EM QUE SERÃO UTILIZADOS OS ANIMAIS	ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS	PERÍODO (em meses)
Recepção e adaptação	Recepção dos animais, tratamento contra endo e ecto parasitas, identificação individual, pesagem, acondicionamento nas baias.	Mês 1 ao 4
Cirurgia para implantação de fistulas	Realização da cânula ruminal, jejunal e ileal; e implantação de fistulas	Mês 5
Período de recuperação	Recuperação das cirurgias	Mês 6

Adaptação às dietas experimentais	Adaptação dos animais às dietas com alta inclusão de concentrado	Mês 7
Execução do experimento	Avaliação dos tratamentos experimentais	Mês 8 ao 12

**V – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO
CONSELHO DEPARTAMENTAL**

Declaro, para os devidos fins de direito, na função de Chefe do Departamento de Zootecnia, que o presente plano de trabalho foi aprovado pelo Conselho Departamental.