

Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana

Stefanie Alvarenga Santos, Polyana Pizzi Rotta, Luiz Fernando Costa e Silva, Ana Clara Baião Menezes, e Sebastião de Campos Valadares Filho

Os ruminantes representam um grupo de animais herbívoros que tem como característica principal a modificação dos nutrientes da dieta no interior do rúmen por microrganismos anaeróbicos. Esses microrganismos encontram no rúmen condições ideais para seu crescimento, utilizando as proteínas da dieta do ruminante como fonte alimentar. À medida que a digesta ruminal flui pelo trato gastrointestinal, esses microrganismos se tornam fonte de proteína para digestão no intestino delgado dos ruminantes, proporcionando o fornecimento de proteína com alto valor biológico disponível para absorção. Sendo assim, para encontrar uma recomendação adequada das exigências proteicas para bovinos de corte é necessário conhecer o tipo de modificação imposta por esses microrganismos e a quantidade de proteína de origem microbiana que chega ao intestino delgado a partir de determinada dieta.

INTRODUÇÃO

O *pool* de proteínas potencialmente fermentáveis no rúmen inclui os compostos nitrogenados da dieta, além da proteína endógena da saliva, descamação de células epiteliais e microrganismos ruminais que sofreram lise e permanecem no rúmen (NRC, 2001). Este *pool* proteico que sofre modificações significativas nesse compartimento é denominado de proteína degradável no rúmen (PDR). Assim, a nutrição proteica dos ruminantes é dependente da magnitude e perfil desse *pool*, que chega ao intestino delgado (ID) para digestão e absorção na forma de aminoácidos. Soma-se ainda a proteína da dieta que não sofre degradação microbiana e chega inalterada ao ID, também chamada de proteína não degradada no rúmen (PNDR). O conjunto de todos esses aminoácidos que estão disponíveis para digestão e posterior absorção intestinal compõe a proteína metabolizável (PM). Dessa forma, a obtenção dos valores de exigências nutricionais de PM e proteína bruta (PB) para bovinos de corte, parte

da premissa de que se deve conhecer as modificações que o rúmen impõe aos compostos nitrogenados da dieta. Para isso faz-se necessário conhecer a proteína bruta microbiana (PBmic) que é produzida no rúmen ao se fornecer determinada dieta, conhecer os fatores que alteram a eficiência de produção dessa proteína, bem como entender a digestão e absorção dessa proteína no ID.

Na literatura são encontrados diferentes métodos para se estimar a partição do nitrogênio da dieta em PDR e PNDR, bem como sua digestibilidade intestinal. Esses métodos incluem avaliações *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Levando-se em consideração a exatidão dos métodos, o método *in vivo* apresenta como característica o fornecimento de estimativas fidedignas do que ocorre na digestão dos nutrientes. Contudo, na maioria das situações, os métodos *in vivo* se aplicam apenas para o estudo da digestibilidade das dietas.

Assim, a validação de protocolos que permitam o uso de técnicas *in vitro* e *in situ* de forma acurada e precisa, é requerida para obtenção de estimativas da degradação da proteína ruminal, da produção microbiana, e indiretamente da PM. A estimativa da síntese de PBmic pode ser realizada utilizando-se indicadores microbianos no rúmen, no ID ou mesmo na urina. Dessa forma, técnicas alternativas como o uso dos derivados de purina urinários podem ser usadas para se quantificar o fluxo de PBmic que deixa o rúmen e chega ao intestino delgado para absorção na forma de aminoácidos. Essa técnica pode reduzir o tempo de manipulação de animais em experimento e dispensar o uso de animais fistulados. Entretanto, a determinação do volume urinário deve ser acurada, para que se minimizem os erros experimentais.

Além disso, a capacidade de se estimar a produção e eficiência microbiana em função da dieta ofertada é uma ferramenta matemática essencial na estimativa das exigências de PM.

Para isso é necessário encontrar quais são as variáveis que afetam a eficiência de produção da PBmic, e ajustar equações que sejam precisas e acuradas. Neste capítulo são discutidas as principais técnicas envolvidas na estimativa dos teores de PDR e PNDR dos alimentos, incluindo os efeitos da contaminação microbiana nos resíduos da incubação ruminal; são também apresentadas as técnicas usadas para quantificar a proteína microbiana e os fatores que afetam a sua produção. Além disso são apresentadas e validadas equações para estimar a produção de proteína microbiana.

ESTIMANDO PDR E PNDR DOS ALIMENTOS

Utilizando a técnica in situ

Dentre as maiores divergências encontradas na estimação da degradação ruminal da proteína está a escolha da técnica a ser utilizada. A técnica *in situ* trata da mensuração do desaparecimento ruminal dos alimentos por intermédio da adição dos ingredientes no interior de sacos com uma porosidade conhecida por onde os microrganismos ruminais acessam o alimento e o degradam, permitindo assim a quantificação do resíduo não degradado. Os sacos por sua vez são incubados na digesta ruminal de um animal fistulado, o que caracteriza a denominação da técnica da degradabilidade *in situ* (Orskov et al., 1980). O estudo da degradabilidade ruminal é importante no conhecimento da modificação que os alimentos sofrem no interior do rúmen, a exemplo da PB, que em parte será degradada e transformada em PBmic.

De acordo com Nocek (1988), a utilização da técnica *in situ* permite o contato íntimo do alimento teste com o ambiente ruminal. Não há melhor maneira de simular o ambiente ruminal durante determinadas condições de temperatura, pH, substrato, tamponamento e populações microbianas. Porém, como limitação, o alimento estudado não é submetido a todas as etapas digestivas como a mastigação, ruminação e passagem. Assim, é necessário conhecer os pontos críticos e algumas padronizações que tornaram o método mais acurado e preciso, os quais serão discutidos a seguir.

a) Perda de material não degradado

A perda de material no interior do saco no rumen é um ponto crítico, pois partículas inferiores ao tamanho dos poros do saco podem ser perdidas mesmo sem haver degradação prévia. Esse evento pode causar superestimação da fração solúvel ou mesmo da sua degradação ruminal. Entretanto, a redução do tamanho de partículas pela moagem facilita o acesso microbiano, uma vez que o alimento não passa pelos processos de mastigação e ruminação. Para minimizar o problema, alguns autores recomendaram incubações *in situ* com partículas entre 1,5 a 3 mm de diâmetro (Huntington e Givens, 1995; Broderick e Cochran, 2000).

Utilizando forrageiras tropicais, Casali et al. (2008) recomendaram tamanhos de partícula de 2 mm para incubação *in situ* para maior precisão nas estimativas das frações degradáveis. Estes autores verificaram que o tamanho de 3 mm reduziu a precisão dos resultados provavelmente em virtude da menor superfície específica para ação microbiana. Assim nesta edição do BR-CORTE recomenda-se a moagem com peneiras de 2 mm para realização de ensaios *in situ*. Porém, mesmo com a padronização do tamanho de partícula, existem perdas de material não digerido, assim, alguns autores recomendaram a correção dos dados de degradação *in situ* pela lavagem em água dos sacos contendo amostra, e determinação da perda imediata de partículas (López et al., 1994 e France et al., 1997). Hvelplund e Weisbjerg (2000) apresentaram um protocolo para estimar a extensão da perda de partículas e correção das frações da degradação por intermédio da diferença entre a perda de material dos sacos. Assim, é possível determinar taxas de degradação corrigidas para perda de partículas caso seja de interesse do pesquisador.

Hvelplund e Weisbjerg (2000) descreveram um protocolo utilizando sacos de náilon, lavados com água, e a solubilidade verdadeira mensurada em papel de filtro. A mensuração da solubilidade em água deve ser realizada adicionando-se 500 mg de amostra em 40 ml de água, que devem permanecer por 1h à temperatura ambiente. Após esse tempo, o material deve ser transferido para papel de filtro livre de nitrogênio para quantificação do N solúvel em água. A correção para perda de

partículas pode ser realizada, utilizando equações propostas por Weisbjerg et al. (1990):

$$DEG_{cor}(ti) = DEG(ti) - P \times \left[1 - \frac{DEG(ti) - P + SOL}{1 - (P + SOL)} \right]$$

$$a_{cor} = a - P$$

$$b_{cor} = b + P \times \left[\frac{b}{1 - (P + SOL)} \right]$$

$$c_{cor} = c$$

em que: $DEG_{cor}(ti)$ = degradabilidade corrigida no tempo de incubação ti ; $DEG(ti)$ = degradabilidade mensurada no tempo de incubação ti ; P = perda de partículas; SOL = solubilidade em água; a_{cor} = fração solúvel corrigida; b_{cor} = fração insolúvel potencialmente degradável corrigida; c_{cor} = taxa de degradação corrigida; a , b , c = frações mensuradas sem correção.

b) Contaminação microbiana nos resíduos da incubação ruminal de alimentos volumosos e concentrados

Após finalização de um ensaio de degradação ruminal *in situ*, os sacos passam por um processo de lavagem para imediata paralisação da degradação microbiana e também para remoção de digesta ruminal e resíduos microbianos aderidos ao alimento ou aos sacos. Porém, alguns autores (Nocek e Grant, 1987; Vanzant et al., 1998; Michalet-Doreau e Ould-Bah, 1992) relataram que é relativamente difícil alcançar a completa remoção da massa microbiana aderida às partículas, pois a adesão microbiana específica é necessária ao início de processo de colonização das partículas. Dessa forma, a contaminação microbiana nos resíduos de incubação representa importante fonte de variação, implicando na superestimação dos resíduos e frações indegradáveis, com consequente subestimação da fração potencialmente degradável. Especialmente, para a fração proteica de volumosos de baixo teor proteico, a contaminação microbiana implica em maior impacto nas estimativas das frações degradáveis.

Entretanto, os procedimentos para estimação da contaminação microbiana

demandam a utilização de indicadores microbianos, como o ácido diaminopimélico, RNA, ^{35}S e ^{15}N , que são de alto custo e elevam o tempo final para análises químicas. Assim, estes fatores desencorajam a maior parte dos pesquisadores em realizar tal procedimento em suas incubações. Uma solução para minimizar os entraves na estimação da contaminação microbiana seria a elaboração de um protocolo de correção que não demande o uso de indicadores microbianos, elevando a exatidão das estimativas sem elevar o custo experimental.

Para isso, Machado et al. (2013) conduziram estudo, utilizando ^{15}N como indicador microbiano para estudar a contaminação microbiana em resíduos de incubação de alimentos volumosos. Esses autores apresentaram um protocolo matemático para correção dos resíduos de incubação ruminal *in situ* e ainda para correção das frações degradáveis, que será adotado nessa edição do BR-CORTE. Os autores relataram que a fração solúvel (A) e a potencialmente degradável (B) de volumosos de menor teor proteico podem ser subestimadas quando não corrigidas. Os autores recomendaram as equações a seguir:

$$(1) A_{CORR} = 1,99286 + 0,98256 \times A_{PB}$$

$$(2) B_{CORR} = -17,2181 - 0,0344 \times B_{PB} + 0,65433 \times PB + 1,03787 \times FDN + 2,66010 \times PIDN - 0,85979 \times FDNi$$

$$(3) kd_{CORR} = 0,04667 + 0,35139 \times kd_{PB} + 0,0020 \times PB - 0,00055839 \times FDN - 0,00336 \times PIDN + 0,00075089 \times FDNi$$

em que A_{CORR} = fração solúvel da PB corrigida para contaminação microbiana, A_{PB} = fração solúvel da PB sem correção para contaminação microbiana, B_{CORR} = fração potencialmente degradável da PB corrigida para contaminação microbiana, B_{PB} = fração potencialmente degradável da PB sem correção para contaminação microbiana, kd_{CORR} = taxa de degradação da fração B corrigida para contaminação microbiana, kd_{PB} = taxa de degradação da fração B sem correção para contaminação microbiana, $PIDN$ = proteína insolúvel em detergente neutro, FDN = fibra insolúvel em detergente neutro e $FDNi$ = FDN indigestível.

Machado et al. (2013) recomendaram ainda que o percentual de contaminação microbiana nos tempos de incubação para alimentos volumosos com diferentes teores de PB pode ser obtido através da seguinte equação:

$$\%C = 79,21 \times (1 - e^{-0,0555 \times t}) \times e^{-0,0874 \times PB}$$

em que %C = estimativa da percentagem de contaminação microbiana, t = tempo de residência do alimento no rúmen em horas, PB = percentual de proteína bruta no alimento expresso na base da MS.

Para determinar o impacto da contaminação microbiana em resíduos de incubação *in situ* de alimentos concentrados, Menezes et al. (2017) conduziram estudo, utilizando ¹⁵N como indicador microbiano e avaliaram 12 alimentos concentrados, sendo 6 proteicos e 6 energéticos. Embora tenha ocorrido contaminação microbiana nos resíduos da incubação, os autores não relataram diferença entre as frações A, B e kd corrigidas ou não para contaminação microbiana após 72 horas de incubação ruminal. Observou-se que percentualmente, as maiores contaminações foram obtidas para o milho desintegrado com palha e sabugo e os farelos de girassol e de trigo, que são alimentos que possuem maiores teores de FDN. Os dados observados por esses autores evidenciaram que em alimentos concentrados a contaminação microbiana representa contribuição irrelevante aos resíduos de incubação. Desse modo, os autores não recomendaram realizar a correção de frações da degradação de PB em alimentos concentrados.

c) Delineamento experimental e tempos de incubação

Os protocolos experimentais adotados por Machado et al. (2013) e Menezes et al. (2017) representam alternativas adequadas para avaliação da degradação ruminal *in situ* em alimentos. Esses autores utilizaram repetidas incubações dos mesmos alimentos em animais distintos, utilizando o delineamento em quadrado latino (DQL) como principal instrumento para coleta de dados. De acordo com Machado et al. (2013), o DQL pode ser utilizado para organizar a coleta de dados no campo, permitindo mensurar a degradação de diferentes alimentos, eliminando o efeito de confundimento do animal. O DQL

pode ser utilizado para controlar as fontes de variação e evitar erros experimentais oriundos da variabilidade entre os animais estudados em um determinado ensaio. Machado et al. (2013) ressaltaram que o DQL não precisa ser obrigatoriamente utilizado para estimar a variabilidade ou comparar os efeitos das fontes de variação, mas sim para proceder uma coleta de dados menos viesada.

Quando o objetivo da incubação ruminal for obter dados para estimar a digestibilidade intestinal da PNDR, Menezes et al. (2017), por meio de análise de agrupamento, recomendaram tempos necessários para se determinar a PDR de alimentos concentrados entre 6,8 e 15,4 horas para $k_p = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Assim, nota-se que a recomendação da literatura para utilização de 16h (Calsamiglia et al., 1995) para obter a PDR dos alimentos, possivelmente não pode ser aplicada para todos os alimentos em conjunto. Menezes et al. (2019) estabeleceram os tempos necessários para estimativa da PDR de alimentos concentrados agrupados em: concentrados energéticos de alto amido, de baixo amido, e concentrados proteicos, obtendo os seguintes intervalos, considerando $k_p = 0,05 \text{ h}^{-1}$:

- Energéticos de alto amido – milho moído, sorgo moído e milho desintegrado com palha e sabugo: 16 horas.
- Energéticos de baixo amido – farelo de trigo, farelo de arroz e casca de soja: 7 horas.
- Concentrados proteicos – farelo de algodão, farelo de soja, feijão, farelo de amendoim e farelo de girassol: 10 horas.

No entanto, deve-se ressaltar que provavelmente esses tempos não sejam suficientes para se estudar a degradabilidade da PB de volumosos tropicais. Alguns trabalhos nacionais (Martins et al., 1999; Cabral et al., 2005; Pires et al., 2006) utilizaram os tempos de degradação *in situ* de 72 horas para volumosos. Apesar de serem encontrados trabalhos avaliando tempos necessários à determinação de frações fibrosas em incubação *in situ* (Casali et al., 2008), são escassos os trabalhos avaliando tempos necessários para determinação da PDR dos alimentos volumosos tropicais.

d) Condições internas nos sacos de incubação

De acordo com López (2005), as condições no interior do saco de incubação devem ser similares ao restante do rúmen. Dessa forma a escolha apropriada do tecido para confecção dos sacos deve ser criteriosa. Por muitos anos foi utilizado como padrão para incubação o tecido de náilon com porosidade variando entre 40 a 60 μm , conforme recomendado por Nocek (1997). Entretanto, esta porosidade vem sendo questionada em estudos nacionais e internacionais. Hvelplund e Weisbjerg (2000) recomendaram a utilização de sacos de náilon com porosidade entre 30 a 50 μm no estudo da degradação *in situ* da PB. Entretanto, estudos comparando estimativas da degradação proteica em sacos de diferentes porosidades não foram encontrados na literatura consultada. Assim, até que mais estudos sejam conduzidos para avaliar a porosidade ideal dos sacos de náilon para melhor obtenção de estimativas da PDR dos alimentos, recomenda-se o uso de náilon com porosidade de 40 a 60 μm .

A área de superfície de contato dos sacos incubados em relação à amostra também é uma variável importante levando em consideração as condições internas de degradação *in situ*. De acordo com Nocek (1988), a quantidade ótima de amostra é aquela que proporciona quantidade suficiente para análises químicas ao final do processo, sem que haja enchimento excessivo do saco ao ponto de atrasar a adesão microbiana, o que eleva a fase de latência e subestima as taxas de degradação. Após revisão de literatura, o autor recomendou para a maior parte dos alimentos uma amostra de 10 a 20 mg/cm^2 de saco, ressaltando que para alimentos concentrados o maior valor pode ser crítico devido a elevada densidade e rápida degradação, podendo haver intensa produção de gases por unidade de tempo. Assim, apesar de ter surgido na década de 80, o estudo de Nocek (1988) ainda não foi refutado, sendo até hoje utilizado como referência nos estudos de incubação *in situ*.

e) Modelos matemáticos para estimativa da degradação ruminal da proteína

Os tradicionais modelos matemáticos utilizados para descrever a degradação ruminal, em geral, calculam essa variável com base na massa de substrato que está retido no

compartimento avaliado. Alguns desses modelos são de primeira ordem (Waldo et al., 1972) ao considerar apenas o substrato a ser digerido, e outros de segunda ordem, pois também consideraram o *pool* dos substratos estudados e a massa microbiana presente no sistema (France et al., 1990). O modelo de primeira ordem de Mitscherlich proposto por Ørskov e McDonald (1979) é utilizado com maior frequência para avaliação dos resíduos de PB obtidos *in situ*.

O modelo proposto por Ørskov e McDonald (1979), em cinética de primeira ordem, assume que o substrato degradado em qualquer tempo é proporcional à quantidade de resíduo potencialmente degradável em qualquer tempo, a uma taxa fracional de degradação constante. Esse modelo é amplamente utilizado devido à sua simplicidade. Entretanto o mesmo não contempla uma ampla diversidade de alterações da taxa fracional decorrida da degradação (López, 2008). Desta forma, López et al. (1999) estudaram alguns modelos que consideraram que a taxa fracional da degradação dos nutrientes não é um valor constante, mas sim variável; e que alguns modelos de degradação baseados na cinética do crescimento microbiano são de natureza sigmoideal, indicando solução alternativa aos modelos de minimização dos retornos ou exponenciais simples, como é o caso do modelo proposto por Van Milgen et al. (1991).

Assim, os modelos para ajuste de curvas de degradação da PB, tanto do tipo exponencial como o tipo sigmoide, são apresentados a seguir, considerando a taxa fracional de degradação (kd) constante. Os resíduos de incubação da PB obtidos através dos ensaios *in situ* em função do tempo podem ser avaliados, utilizando-se os modelos matemáticos propostos por (1) Ørskov e McDonald (1979) e (2) Van Milgen et al. (1991):

$$(1) \text{DEG}(t) = a + b \times (1 - e^{-kd \times t})$$

$$(2) \text{DEG}(t) = a + b \times [(1 + c \times t) \times (e^{-c \times t})]$$

em que: DEG(t) representa o desaparecimento da PB expressa em porcentagem; *a* representa a fração solúvel em água no tempo zero; *b* representa a fração insolúvel em água, mas potencialmente degradável no rúmen em determinado tempo; *c* representa a taxa

fracional conjunta de latência e degradação (h^{-1}); kd é a taxa de degradação da fração b ; e t é o tempo de incubação (horas).

O modelo de primeira ordem de Mitscherlich adaptado por Ørskov e McDonald (1979) assume que a degradação ocorre a uma taxa fracional constante após uma discreta fase de latência, assim a taxa de desaparecimento decresce continuamente e não há nenhum ponto de inflexão. O modelo de Ørskov e McDonald (1979) emprega valores estáticos para taxa de degradação, havendo necessidade de menor número de parâmetros a serem estimados, o que eleva a probabilidade de uso de modelos mais simples como este. Dessa forma, recomenda-se o modelo de Ørskov e McDonald (1979), por ser simples e funcionar relativamente bem para avaliar a degradação proteica dos alimentos. Para qualquer um dos modelos utilizados, a partir das frações solúvel (a), potencialmente degradável (b) e a taxa de degradação (kd) mensuradas para PB e a partir da taxa de passagem estimada (kp), será possível calcular a degradabilidade efetiva, que corresponderá à PDR:

$$PDR = a + \left[\frac{(b \times kd)}{(kd + kp)} \right]$$

Assim, um fator importante que interfere diretamente na obtenção dos valores de PDR, é a taxa de passagem adotada nos cálculos da degradabilidade efetiva da PB.

O NRC (2001) adotou anteriormente três diferentes funções para estimação da taxa de passagem de forragens úmidas, forragens secas e concentrados. Entretanto, Seo et al. (2006) destacaram que os dados compilados para geração destas três equações foram obtidos em experimentos que utilizaram as terras raras como principais indicadores, o que limita a aplicabilidade das equações aos dados experimentais atuais. Assim, Seo et al. (2006) propuseram novas equações com base em um banco de dados de 154 trabalhos e 766 observações, dos quais foram gerados modelos matemáticos capazes de prever a taxa de passagem de diversos alimentos e dietas com base em indicadores externos. Assim, após ajustes, os autores apresentaram as seguintes equações para estimação das taxas de passagem (kp) de forragens, concentrados e líquidos:

$$kp \text{ forragem} = (2,365 + 0,0214 \times FI + 0,0734 \times CI + 0,069 \times F) / 100$$

$$kp \text{ concentrado} = (1,169 + 0,1375 \times FI + 0,1721 \times CI) / 100$$

$$kp \text{ líquidos} = (4,524 + 0,0223 \times FI + 0,2046 \times CI + 0,344 \times F) / 100$$

em que: kp = taxa de passagem, h^{-1} ; FI = consumo de forragem em g MS/PC; CI = consumo de concentrado em g MS/PC; F = consumo de forragem em kg MS.

Utilizando análises químicas para estimativa da PDR e PNDR: solubilização proteica e fracionamento

O método mais amplamente utilizado para estimar as frações de compostos nitrogenados do alimento é o protocolo de fracionamento utilizado no CNCPS (Sniffen et al., 1992; Fox et al., 2000). Originalmente o CNCPS dividiu a PB dos alimentos em 5 frações, usando 3 solventes e um agente precipitante. As cinco frações são:

- A: solúvel em tampão borato fosfato (TBF), mas não precipitada por ácido tricloroacético (TCA), constituída pelos compostos nitrogenados não proteicos (NNP);
- B₁: proteína verdadeira rapidamente degradada no rúmen, solúvel em TBF, mas precipitada pelo TCA;
- B₂: proteína verdadeira e grandes peptídeos, moderadamente degradada no rúmen, calculada como sendo a diferença entre o total de PB do alimento menos as outras frações;
- B₃: proteína verdadeira lentamente degradada no rúmen, calculada pela diferença entre o conteúdo proteico insolúvel em detergente neutro (PIDN) e o conteúdo proteico insolúvel em detergente ácido (PIDA);
- C: proteína indegradável, equivalente ao PIDA.

A PIDN é obtida através da PB no resíduo insolúvel após o tratamento com detergente

neutro, sem a utilização de sulfito de sódio; e a PIDA estimada após a extração sequencial, no resíduo obtido após o tratamento com detergente ácido. A fração A é considerada 100% degradada no rúmen e a fração C 100% não degradada.

Um aspecto interessante dessa aproximação utilizada no CNCPS é que as análises (NNP, PIDIN, PIDA e proteína verdadeira solúvel) executadas para a estimação das frações da PB são procedimentos de rotina em laboratórios, o que facilita a adoção do método para a utilização em condições de campo (Schwab et al., 2003).

O sistema CNCPS passou por algumas atualizações nos últimos anos, sendo que Higgs et al. (2015) apresentaram nova nomenclatura para as frações da PB adotadas atualmente pelo CNCPS, embora poucas alterações tenham sido realizadas nos métodos de análises utilizados pelos autores, sendo:

$$P_{A1} (\text{Fração amoniacal}) = \text{Amônia} \times (\text{PS}/100) \times (\text{PB}/100)$$

$$P_{A2} (\text{Proteína verdadeira solúvel}) = [\text{PS} \times (\text{PB}/100)] - P_{A1}$$

$$P_{B1} (\text{Proteína verdadeira insolúvel}) = \text{PB} - (P_{A1} - P_{A2} - P_{B2} - P_C)$$

$$P_{B2} (\text{Proteína ligada à fibra}) = (\text{PIDN} - \text{PIDA}) \times (\text{PB}/100)$$

$$P_C (\text{Proteína indegradável}) = \text{PIDA} \times (\text{PB}/100)$$

em que: P_{A1} = Fração amoniacal; P_{A2} = Fração proteica verdadeira solúvel; P_{B1} = Fração proteica verdadeira insolúvel; P_{B2} = Fração proteica ligada à parede celular ou ligada à FDN; P_C = Fração proteica indegradável; PB = Proteína bruta; PS = proteína solúvel em tampão borato-fosfato, incluindo azida sódica.

SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Sendo os microrganismos ruminais os principais modificadores da proteína dietética, não somente a exigência de PB do animal deve ser considerada, como também a quantificação do nitrogênio exigido para síntese de proteína microbiana ruminal. De acordo com Puchala e Kulasek (1992), para obtenção do nitrogênio total exigido pelos ruminantes, os sistemas de exigências nutricionais necessitam fornecer uma estimativa da quantidade total de proteína que é digerida e absorvida no intestino delgado. Esta proteína total compreende a proteína

microbiana sintetizada no rúmen e a proteína da dieta que escapa da degradação ruminal. A exigência nutricional de PNDR é calculada como o total de PM exigida menos a quantidade de proteína metabolizável microbiana que alcança o duodeno, dessa forma, existe a necessidade de se obter estimativas acuradas dessa variável para se quantificar as exigências nutricionais de PM para ruminantes (Firkins, 1996).

De acordo com Broderick e Merchen (1992), para quantificar a proteína microbiana ruminal são necessários indicadores microbianos. Esses podem ser classificados como indicadores internos e externos. Os indicadores internos são aqueles inerentes aos microrganismos, ou seja, já são componentes químicos dos próprios microrganismos como o ácido diaminopimélico. Além deste, o composto mais utilizado como indicador microbiano interno é o conjunto de ácidos nucleicos microbianos. O alto conteúdo de RNA nas células microbianas tornou esse composto de grande interesse na quantificação do *pool* de proteína microbiana (PBmic) sintetizada no rúmen.

Os indicadores externos são aqueles adicionados ao rúmen e que são capazes de se aderir aos microrganismos, como é o caso do isótopo ^{15}N . Um indicador microbiano ideal deve incluir características como: facilidade na quantificação, não estar presente ou presente em pequenas quantidades nos alimentos, presente a uma relação constante mesmo sob condição experimental e ser biologicamente estável (Broderick e Merchen, 1992). O uso de cada um desses indicadores representa uma técnica diferente para estimação da proteína microbiana, entretanto, representam alternativa invasiva, uma vez que é necessário o uso de animais fistulados para coleta de líquido ruminal marcado com indicadores.

A descoberta de que os derivados de purina na urina de ruminantes são quantitativamente importantes como produtos finais do metabolismo de nitrogênio levou ao aprofundamento da pesquisa na área e ao estabelecimento de relações entre a concentração ruminal de ácidos nucleicos e a excreção de derivados de purina na urina em ruminantes (Topps e Elliott, 1965).

Essas informações formam a base do conhecimento que deu origem ao uso de derivados de purina na urina como método não-invasivo para estimativa do aporte de nitrogênio microbiano (Nmic) no intestino em ruminantes (Chen e Gomes, 1992). Dessa forma, essas alternativas serão apresentadas e discutidas a seguir

Comparando os indicadores ^{15}N e RNA

O ^{15}N tem sido amplamente utilizado como indicador para estimar a produção microbiana, já que é um isótopo estável, de baixo risco

ambiental, de menor custo em relação a outros isótopos, por marcar todos os *pools* de Nmic, por não ser encontrado naturalmente na proteína dos alimentos e por não marcar a proteína do animal até que os aminoácidos microbianos marcados sejam incorporados aos seus tecidos (Broderick e Merchen, 1992). O ^{15}N é bem distribuído na célula microbiana, logo, no caso de lise celular durante o isolamento, as perdas de protoplasma, que subestimam a quantidade de ácidos nucleicos, são menos prejudiciais na estimação da concentração de ^{15}N .

Tabela 3.1 - Estatística descritiva da relação $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ e Nmic (% MO) obtida em amostras de bactérias associadas a partículas (BAP) e bactérias associadas à fase líquida (BAL) de diferentes estudos

Autores ¹	BAP		BAL	
	$^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$	Nmic (%MO)	$^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$	Nmic (%MO)
Machado et al. (2013)	341 ²	7,07	358 ²	7,20
Rotta et al. (2014a)	0,093 ³	7,80	0,092 ³	8,20
Menezes et al. (2017)	304 ²	5,89	322 ²	5,46
Mariz et al. (2018)	454 ²	7,17	463 ²	7,51
Prates et al. (2017)	0,076 ³	7,27 ⁴	0,068 ³	7,35 ⁴

¹Médias da relação $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ e conteúdo de N bacteriano não diferem pelo teste *F* ($P>0,05$), exceto N bacteriano em Mariz et al. (2018), que foram diferentes entre BAL e BAP ($P<0,05$). ²Δ por mil. ³valores obtidos em amostras omasais e considerando enriquecimento de átomos ^{15}N em percentagem ⁴nitrogênio com base na MO. Autores utilizados: Machado et al. (2013); Rotta et al. (2014a); Menezes et al. (2017); Mariz et al. (2018); Prates et al. (2017).

A fração de bactérias associadas à fase de partículas é superior à das associadas à fase líquida, podendo representar mais de 90% (Faichney, 1980) das bactérias isoladas de animais recebendo dietas com predominância de volumosos. Assim, os procedimentos de isolamento bacteriano deveriam considerar as bactérias associadas às partículas (BAP) para estimação de uma relação $^{15}\text{N}:\text{Nmic}$ mais representativa.

A relação $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ e conteúdo de Nmic, de forma geral, podem ser obtidos a partir da média em amostras de BAL e BAP, uma vez que em muitos casos não são encontradas diferenças entre essas duas formas de isolamento de bactérias (Machado et al., 2013, Rotta et al., 2014a, Prates et al., 2017, Menezes et al., 2017, e Mariz et al., 2018; Tabela 3.1)

Alternativamente, organismos unicelulares possuem alta concentração de ácidos nucleicos, especialmente RNA e bases purinas, o que torna interessante a utilização

desses como indicadores microbianos internos. Em torno de 18 % do nitrogênio total dos microrganismos ruminais encontra-se nos ácidos nucleicos e aproximadamente 11% do N total está presente nas bases purínicas (Chen e Ørskov, 2003). Segundo Broderick e Merchen (1992), a utilização de ácidos nucleicos como indicador está bem estabelecida. O RNA pode ser quantificado segundo o método proposto por Ling e Buttery (1978), e as bases purínicas conforme Ushida et al. (1985). A maior parte dos alimentos apresenta baixa concentração de RNA e, segundo McAllan e Smith (1973), no rúmen ocorre extensiva degradação do RNA exógeno. Assim, o fluxo duodenal de RNA é predominantemente de origem microbiana. De acordo com Rotta et al. (2014b), muitos dos trabalhos que avaliaram diferentes indicadores para estimação da proteína microbiana ruminal utilizaram amostras obtidas no abomaso ou duodeno, e que a manutenção de animais fistulados no abomaso e/ou duodeno é difícil e

de alto custo operacional, causando transtorno no manejo dos animais. Reynal et al. (2005) e Ipharraguerre et al. (2007) recomendaram que o cálculo do fluxo de proteína microbiana utilizando ¹⁵N como indicador deve ser realizado utilizando amostras obtidas a partir do omaso. Porém, ao utilizar ¹⁵N e bases purinas como indicadores, esses autores encontraram diferença nos valores obtidos para fluxo de proteína microbiana a partir de amostras duodenais. Já Krizsan et al. (2010)

sugeriram que amostras de digesta do retículo podem substituir amostras omasais. Mariz et al. (2018) estudaram possíveis diferenças entre os indicadores microbianos ¹⁵N e bases purinas (BP) para estimar a síntese e a eficiência microbiana ruminal, quando aplicados diferentes níveis de proteína às dietas de bovinos Nelore e cruzados. Os autores não encontraram diferença nas estimativas apresentadas.

Tabela 3.2 - Efeitos de diferentes locais de coleta e indicadores microbianos na produção de Nmic e sua eficiência em novilhos de corte alimentados com silagem de milho ou cana-de-açúcar

Indicadores	Local de amostragem			EPM ¹	P-valor L × M ²
	Retículo	Omaso	Abomaso		
Nmic ³	104	114	125	4,59	<0,01
BP ⁴	114 ^{abA}	106 ^{bA}	130 ^{aA}	4,78	<0,01
¹⁵ N	94,1 ^{bB}	123 ^{aA}	120 ^{aA}	4,79	<0,01
PBmic ⁵ /NDT ⁶	101	108	118	4,39	<0,01
BP	107 ^{bA}	93,3 ^{bB}	117 ^{aA}	4,44	<0,01
¹⁵ N	95,0 ^{bA}	123 ^{aA}	118 ^{aA}	4,42	<0,01
NM/MOfer ⁷	24,8	31,8	36,2	2,05	<0,05
BP	26,8 ^{bA}	29,2 ^{bA}	37,7 ^{aA}	2,09	<0,05
¹⁵ N	22,7 ^{bA}	34,4 ^{aA}	34,6 ^{aA}	2,08	<0,05

¹Erro padrão da média; ²Interação entre local de amostragem e indicador microbiano; ³Nitrogênio microbiano; ⁴Bases purinas; ⁵Proteína bruta microbiana; ⁶Nutrientes digestíveis totais; ⁷Matéria orgânica fermentada no rúmen. Adaptado de Rotta et al. (2014).

A similaridade entre os indicadores microbianos indicou que tanto ¹⁵N quanto BP são adequados para estimar a síntese e eficiência de proteína microbiana, quando coletados em digestas omasais. Adicionalmente, Rotta et al. (2014b) conduziram um trabalho avaliando esses dois indicadores, obtidos em diferentes locais de amostragens (Tabela 3.2). Rotta et al. (2014b) relataram que amostras obtidas no omaso e abomaso proporcionaram resultados similares para produção de proteína microbiana assim como eficiência microbiana quando utilizaram tanto ¹⁵N quanto bases purinas como indicadores. Além disso, Rotta et al. (2014b) testaram diferentes esquemas de coleta de amostras, utilizando indicadores único, duplo ou triplo, isolando diferentes tipos de perfis da digesta ruminal como fase única (sistema de indicador único), fase líquida e de partículas (sistema de indicador duplo), e fases líquida, de pequenas e de grandes partículas (sistema de indicador triplo), respectivamente.

Os autores recomendaram uma correção nas estimativas da proteína microbiana ruminal

obtida a partir de ensaios com sistema de indicadores único e duplo, para estimativa dos valores compatíveis ao esquema triplo, sendo estas:

$$NMcorr \text{ (g/dia)} = 49,71 + 0,66 \times NMúnico$$

$$NMcorr \text{ (g/dia)} = 43,04 + 0,71 \times NMduplo$$

em que NMcorr é a produção de nitrogênio microbiano ruminal por dia corrigida para uso de indicador único ou duplo. NMúnico é o nitrogênio microbiano obtido a partir de esquema de indicador único, e NMduplo é o nitrogênio microbiano obtido a partir de esquema de indicador duplo.

Método dos derivados de purina na urina

Os ácidos nucléicos de origem bacteriana originários do rúmen, em grande maioria, são digeridos e absorvidos no intestino delgado. As bases purinas absorvidas são catabolizadas a derivados de purinas (hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína) e excretadas na urina. Dessa maneira, o fluxo de nitrogênio microbiano no

intestino delgado pode ser estimado a partir da quantificação da excreção de derivados de purina na urina. Embora existam métodos para estimar a síntese microbiana com base em indicadores microbianos (RNA, ¹⁵N; Broderick e Merchen, 1992, Tamminga e Chen, 2000), conforme discutido no tópico anterior, esses métodos apresentam dificuldades para uso extensivo pois são extremamente invasivos e requerem a utilização de animais fistulados para estimação do fluxo de MS pelo abomaso ou duodeno. Esses métodos baseados na estimativa do fluxo de proteína microbiana têm sido usados em grande parte para calibração de alguns fatores de cálculo no método dos derivados de purina (Tas e Susenbeth, 2007; Barbosa et al., 2011; Prates et al., 2012).

Assim como todo método indireto, o método da estimativa da produção microbiana com base nos derivados de purina na urina é susceptível a uma série de fontes de variação (Chen et al., 1990b, Chen e Gomes, 1992, Tamminga e Chen, 2000, Bowen et al., 2006, Tas e Susenbeth, 2007) e alguns dos fatores mais importantes relativos ao método têm estado em constante revisão e atualização. Os mais recentes resultados de pesquisa relacionados a esses fatores, com ênfase ao uso do método para estimar a produção de proteína microbiana de bovinos em condições tropicais, são discutidos nos itens a seguir:

a) Coleta urinária e amostragem experimental

O método para estimar o fluxo de N_{mic} em bovinos baseia-se na quantificação da excreção diária de derivados de purina (alantoína e ácido úrico) na urina. Portanto, o volume urinário diário, bem como uma amostra da mesma, são necessários. A quantificação direta do volume urinário pode ser realizada em animais cateterizados ou com dispositivos de recolhimento de urina acoplados. Em fêmeas, normalmente utiliza-se sondas tipo Folley, levando a urina diretamente da bexiga para um recipiente de coleta. Em machos, funis são utilizados na região do prepúcio, ligados diretamente a um recipiente de coleta. Em ambos os casos, a coleta é realizada por períodos de 3 a 5 dias, com quantificação e amostragens diárias. Entretanto, métodos de coleta total são normalmente trabalhosos, podem afetar o comportamento e bem-estar dos

animais e impactam em dificuldades para uso em animais em pastejo. Em vacas lactantes, o grande volume diário de urina e o manejo do sistema de coleta durante a ordenha contribuem para tornar o uso da coleta total trabalhosa e de difícil aplicação prática.

Assim, faz-se necessário discutir uma técnica auxiliar à coleta total para determinação do volume urinário. O uso da creatinina como indicador para determinação indireta do volume urinário pode ser uma alternativa adequada na melhora do bem-estar dos animais durante os experimentos. A creatinina é formada no músculo pela remoção de água da creatina-fosfato, originada do metabolismo do tecido muscular (Harper et al., 2013). A molécula de creatina-fosfato é degradada espontaneamente a taxas relativamente constantes, formando a creatinina. A creatinina é então produto metabólico do qual o corpo já não necessita, portanto, não é utilizada para formação de novas moléculas, sendo excretada pelos rins. A produção diária de creatina e consequentemente, a excreção de creatinina, depende da massa muscular e, portanto, é proporcional ao peso do animal (Koren, 2000). Assim, uma vez estimada a excreção diária de creatinina em relação ao peso do animal e considerando essa concentração constante ao longo do dia, é possível estimar o volume urinário excretado a partir da concentração de creatinina em amostra de urina coletada de um animal de peso conhecido.

Muito se conhece hoje em dia em relação ao perfil de excreção de creatinina na urina. A creatinina apresenta uma excreção constante ao longo de 24 horas a partir de taxas constantes de degradação do tecido muscular. A excreção de creatinina é pouco afetada pelos teores de PB, carboidratos não-fibrosos ou nitrogênio não-proteico da dieta (Susmel et al., 1994; Vagnoni et al., 1997; Valadares et al., 1999; Oliveira et al., 2001; Rennó et al., 2000), assim, não são esperadas variações decorrentes da dieta.

Com objetivo de estudar a relação da excreção de creatinina em função do peso corporal de bovinos, foi realizada uma meta-análise com resultados de 25 experimentos (Figura 3.1) realizados no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (Apêndice 3.1). Do total deste banco de dados contendo 882

informações individuais, 80% dos dados (n = 702) foram aleatoriamente sorteados para compor o banco de dados para ajuste do modelo (Tabela 3.3), e 20% dos dados (n = 180) foi selecionado para o processo de validação (Tabela 3.4). Foram testados alguns efeitos como a classe sexual e os

grupos genéticos (Nelore, animais taurinos e cruzados), porém estas variáveis não apresentaram efeito significativo ($P > 0,05$). Os dados foram ajustados à uma função matemática alométrica, perfazendo um número total de 702 informações individuais.

Tabela 3.3 - Estatística descritiva dos dados utilizados para ajustar modelo alométrico para estimar a relação entre peso corporal em jejum de bovinos e excreção diária de creatinina na urina, contendo 80% do banco de dados total coletado

	Creatinina (mg/dia)	Peso corporal (kg)
Média	8373	369
Mediana	8205	342
DP	2890	110
Mínimo	1266	107
Máximo	17926	728
n	702	702
Exp	25	25

Tabela 3.4 - Estatística descritiva dos dados utilizados para validar o modelo alométrico para estimar a relação entre peso corporal em jejum de bovinos e excreção diária de creatinina na urina, contendo 20% do banco de dados total coletado

	Creatinina (mg/dia)	Peso corporal (kg)
Média	8615	355
Mediana	8254	318
DP	2887	113
Mínimo	18876	743
Máximo	2887	113
n	180	180
Exp	25	25

Após análises, obteve-se a seguinte equação para estimar a excreção diária de creatinina na urina (ECU; mg/dia) de bovinos em função do peso corporal (PC; kg):

$$ECU = 66,2158 \times PC^{0,8384}$$

As estimativas dos parâmetros do modelo foram significativas ($P < 0,01$) e os dados se ajustaram de forma satisfatória ao modelo. Assim recomenda-se que a excreção diária de

creatinina seja estimada através de modelo alométrico, de acordo com o peso do animal nas diferentes classes sexuais e grupos genéticos.

Um total de 20% dos dados foi utilizado para o procedimento de validação da equação, sendo utilizados os dados observados em 180 unidades experimentais e dados preditos através da equação estimada (Tabela 3.4). Foi utilizado o software MES – Model evaluation system (Texas A&M University).

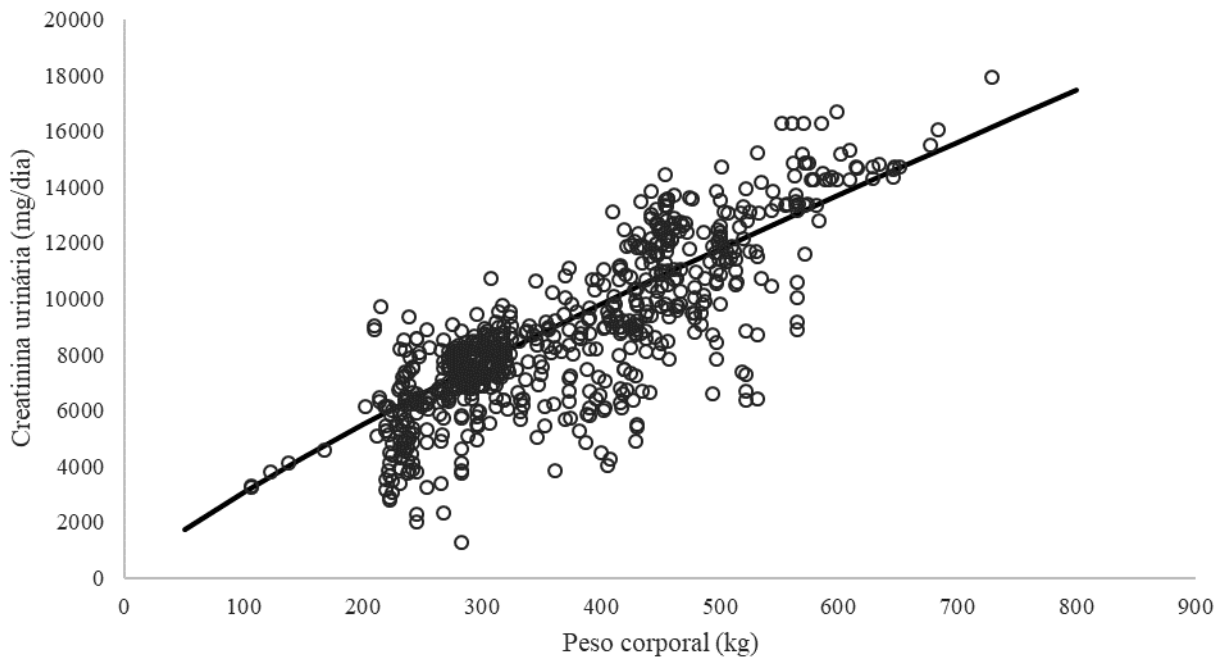


Figura 3.1 - Dados observados (o) da relação entre o peso corporal em jejum de bovinos (kg) e excreção diária de creatinina na urina (mg/dia), e ajuste (-) alométrico ($ECU = 66,2158 \times PC^{0,8384}$), obtido a partir de meta-análise com 25 estudos em bovinos de diferentes classes sexuais e grupos genéticos.

Observou-se que os dados preditos e observados de creatinina foram similares ($P > 0,05$) pelo teste de Mayer (Tabela 3.5), apresentando elevado coeficiente de correlação e concordância ($CCC = 0,78$) e maior presença de erros de predição de origem aleatória. Esses resultados sugerem que o modelo proposto apresenta elevada precisão para estimativas de creatinina urinária em bovinos (Figura 3.2). O uso da creatinina como uma ferramenta precisa para estimativa do volume urinário nas diferentes categorias animais torna prático o processo de estimação da proteína microbiana ruminal pelo uso de DP excretados na urina. No Brasil, Pereira (2009) avaliou as excreções totais de creatinina em intervalos de 4 a 24 horas e as relações de derivados de purina, ureia e compostos nitrogenados totais com a creatinina em novilhas Nelore, obtidas de coletas *spot* de urina em intervalos de 2 horas. A relação entre derivados de purina e creatinina não variou ($P > 0,05$) durante as 24 horas do dia, a partir da coleta *spot* de urina a intervalos de 2 horas, sugerindo que o cálculo da excreção diária de derivados de

purinas pode ser efetivado em coletas obtidas em qualquer horário do dia.

Entretanto, foi observado efeito do tempo de coleta de urina sobre as relações entre ureia:creatinina e Ntotal:creatinina. Essas relações foram próximas às médias em dois pontos diários, próximos aos dois horários diários de fornecimento de alimento aos animais (8 e 16 horas).

Pereira (2009) sugeriu que a estimativa da excreção de compostos nitrogenados em animais em crescimento pode ser realizada sem a necessidade de coleta total, utilizando-se apenas duas coletas *spot* de urina, imediatamente após o fornecimento das dietas. Contudo, ressalta-se que mais pesquisas são necessárias para confirmar essa sugestão. Silva Júnior et al. (2018) estudaram as relações entre derivados de purina e compostos nitrogenados com a creatinina em bovinos de corte em pastejo, para avaliar a possibilidade de realização de coleta a cada 4 horas para mensurar a produção de proteína microbiana, balanço de nitrogênio e excreção de N uréico.

Tabela 3.5 - Validação de modelo predito para determinação da creatinina urinária ($ECU \text{ mg/dia} = 66,2158 \times PC^{0,8384}$) em bovinos, a partir do peso corporal, utilizando 20% do banco de dados (n=180)

Item	Creatinina predita
Teste de Mayer	
Intercepto	-390
Inclinação	1,01
P-valor	0,11
RMSE	1725
CCC	0,78
QMEP	
Vício médio %	2,44
Vício sistemático %	0,03
Erros aleatórios %	97,52
Média predita	8614
Desvio médio	-269 (3,03%)
P-valor	0,04

¹RMSE: Raiz do quadrado médio do erro de predição; CCC: Coeficiente de correlação e concordância; QMEP: Quadrado médio do erro de predição.

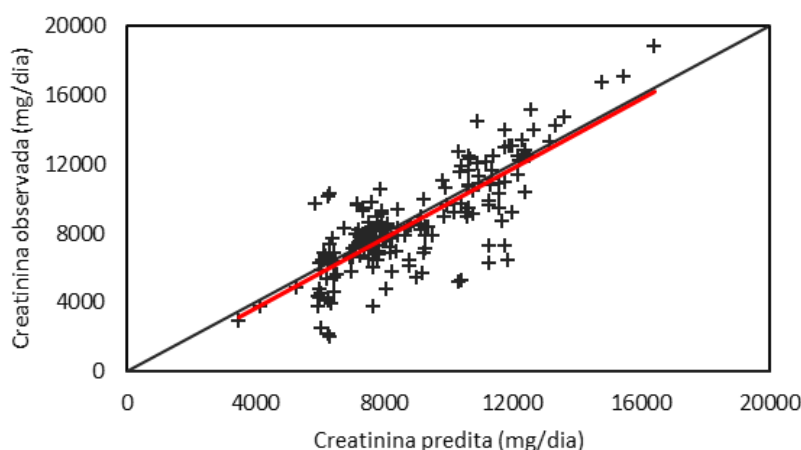


Figura 3.2 - Valores de creatinina urinária observados e preditos a partir da equação proposta $ECU = 66,2158 \times PC^{0,8384}$, proposta para bovinos.

Os autores procederam coletas de 4 em 4 horas durante 5 dias e não detectaram diferença entre o dia de coleta e os horários para a relação entre derivados de purina e creatinina, o que permite inferir sobre a possibilidade de realizar apenas uma coleta de urina em qualquer horário para estimar a produção de proteína microbiana em pastejo, através da técnica dos derivados de purina urinários. Entretanto, em função das variações observadas para as relações nitrogênio uréico e nitrogênio total com a creatinina ao longo do período de 24 horas, Silva Júnior et al. (2018) não recomendaram

o uso de amostra em qualquer horário para estimação da excreção urinária de compostos nitrogenados.

Outros resultados dos mesmos autores (Silva Júnior et al., 2021) demonstraram que a excreção urinária de creatinina é constante durante 24h em bovinos em pastejo. Assim, uma única amostra pontual, em condições de pastejo, é suficiente para estimar o volume de urina em bovinos. Além disso, uma vez que a relação entre creatinina e derivados de purina é constante, também os derivados de purina podem ser estimados a partir de apenas uma

amostra spot em condições de pastejo. Entretanto, duas coletas pontuais, 4h antes e 4h após o fornecimento do concentrado, são necessárias para estimar a excreção total de nitrogênio na urina, uma vez que o nitrogênio ureico urinário pode variar em função da alimentação.

b) *Recuperação urinária de purinas absorvidas*

A relação entre a recuperação urinária de derivados de purina e o fluxo duodenal de purinas é um importante fator de ajuste no método de estimativa da produção microbiana a partir dos derivados de purina na urina. Vários estudos tiveram como objetivo mensurar a recuperação urinária de purinas infundidas pós-rúmen a partir de extratos microbianos. A excreção urinária de derivados de purinas foi linearmente correlacionada com a infusão abomasal de ácidos nucléicos, nucleosídeos, purinas de levedura de cerveja e com a infusão duodenal de ácidos nucléicos, bases de purinas, RNA microbiano e RNA de leveduras (Tas e Susenbeth, 2007). Uma média equimolar de 0,85 foi obtida por Tas e Susenbeth (2007) para a recuperação urinária de derivados de purina infundidos no duodeno. Nesse tipo de estudo, o valor de excreção de derivados de purina é linearmente relacionado ao valor de purinas infundidas (abomaso ou duodeno). O coeficiente de inclinação da equação fornece o valor de recuperação de purinas absorvidas e o intercepto representa a contribuição endógena.

Trabalhos realizados no Brasil (Barbosa et al., 2011, Prates et al., 2012) estimaram que em zebuínos a recuperação urinária de derivados de purina varia de 0,74 a 0,92, com valor médio sugerido para uso prático de 0,80, que será adotado como padrão nesta edição do BR-CORTE tanto para animais Zebuínos quanto para cruzados. Prates et al. (2012) não observaram diferenças na taxa de recuperação de purinas absorvidas entre novilhas Nelore e Holandês, não havendo a necessidade de valores distintos para cada grupo genético.

c) *Digestão e absorção intestinal de purinas microbianas*

Os ácidos nucléicos de origem bacteriana, que deixam o rúmen, são extensivamente degradados no intestino

delgado, e em média 85,9% dos ácidos nucléicos (Stormet al., 1983), 87-89% do RNA e 80-81% do DNA desapareceram no intestino delgado (McAllan, 1980; Storm et al., 1983). Barbosa et al. (2011) avaliaram a digestão e absorção intestinal de purinas microbianas em novilhas Nelore e estimaram o coeficiente de digestibilidade verdadeiro para o RNA de 0,93. Embora alta variabilidade possa ser observada na digestibilidade verdadeira das purinas dos microrganismos ruminais (Chen e Gomes, 1992, Orellana Boero et al., 2001, Tas e Susenbeth, 2007) o valor médio de 0,93 obtido do trabalho de Barbosa et al. (2011) parece ser o mais adequado para uso em animais zebuínos criados em condições brasileiras, sendo portanto considerado o valor padrão para esta edição do BR-CORTE.

No intestino delgado, os nucleotídeos das purinas são hidrolisados a nucleosídeos (adenosina, guanosina e inosina) e bases livres (adenina e guanina), que são quase que completamente absorvidas pela bomba dependente de sódio e potássio (McAllan, 1980). Em bovinos, a alta atividade da enzima xantina oxidase foi observada na mucosa intestinal e no plasma sanguíneo (Chen et al., 1990c), fazendo com que hipoxantina e xantina sejam praticamente degradadas de forma completa até ácido úrico, diferentemente de ovinos. No fígado, o ácido úrico é oxidado até alantoína pela enzima uricase (Tas e Susenbeth, 2007). Alantoína e ácido úrico não podem ser utilizados pelos tecidos e são excretados principalmente na urina, mas também no leite e na saliva (Tas e Susenbeth, 2007). Em bovinos, a alantoína é o principal derivado de purina (mais de 80% do total), enquanto que o restante é composto por ácido úrico e quantidades desprezíveis de xantina e hipoxantina (Chen et al., 1990c). Rennó et al. (2000), avaliando o perfil de excreção de derivados de purina em novilhas de corte, estimaram que a relação entre alantoína, ácido úrico e purinas totais é de, aproximadamente, 98%, o que indica que a concentração de xantina e hipoxantina em relação aos derivados de purinas seria em torno de 2%, e que esta contribuição seria irrisória no cálculo da produção de proteína microbiana. Dessa forma, o BR-CORTE não recomenda realizar análises de xantina e hipoxantina na urina de bovinos de corte.

d) *Fração endógena de derivados de purina na urina*

A fração endógena de derivados de purina na urina inclui a porção de derivados de purinas oriundos dos ácidos nucleicos originários da degradação dos tecidos animais (Chen e Gomes, 1992). A forma direta de mensuração da excreção de derivados de purinas de origem endógena é o uso de animais em jejum por longos períodos (Chen et al., 1990a; Verbic et al., 1990). Braga et al. (2012) submeteram a uma restrição alimentar novilhas Nelore para avaliar a perda endógena de derivados de purina, e encontraram contribuição endógena de 0,332 mmol/PC^{0,75} e 0,384 g N/PC^{0,75} para novilhas Nelore em crescimento.

Alternativamente, a fração endógena tem sido estimada como o intercepto da regressão linear entre excreção urinária de derivados de purina e bases purinas infundidas pós-rúmen. Prates et al. (2012) não observaram diferenças na fração endógena de derivados de purina na urina entre novilhas Nelore e Holandesas. Trabalhos realizados em condições tropicais (Barbosa et al., 2011 e Prates et al., 2012) com animais zebuínos sugeriram o uso de um valor médio de 0,30 mmol/kg^{0,75} como valor da fração endógena de derivados de purinas na urina, que será utilizado como recomendação básica do BR-CORTE.

e) *Utilização da alantoína urinária como único estimador da proteína microbiana ruminal*

A proporção de alantoína excretada na urina em relação à soma total dos DPs,

observada em alguns trabalhos de pesquisa nos últimos dez anos, é cerca de 85 a 92% (Rennó et al., 2000; Magalhães et al., 2005; Pina et al., 2006; Leal et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Teixeira et al., 2007; Santos et al., 2010). Sendo assim, torna-se interessante para a comunidade científica o conhecimento da real relação entre esses metabólitos, e o ajuste de um modelo matemático capaz de prever a concentração de ácido úrico excretado na urina. A partir de uma meta-análise envolvendo 38 experimentos (Apêndice 3.2) realizados no DZO-UFV (Tabela 3.6), verificou-se que a excreção diária de ácido úrico na urina pode ser estimada a partir da excreção diária de alantoína na urina (P<0,05), sendo:

$$AU \text{ (mmol/dia)} = 0,1104 \times ALA; r^2 = 0,76$$

Em que AU é o total de ácido úrico excretado na urina e ALA é o total de alantoína excretada na urina (mmol/dia). Ao testar os parâmetros não se observou intercepto significativo (P = 0,4398), sendo assim foi apresentado o modelo linear sem intercepto.

Esses resultados sugerem que a alantoína pode ser utilizada como único preditor da produção de proteína microbiana em bovinos, sem a necessidade de análise do ácido úrico, havendo assim economia de reagentes para análise e menor tempo despendido com análises químicas para estimação da proteína microbiana ruminal.

Tabela 3.6 - Estatística descritiva dos dados utilizados para ajustar modelos de regressão linear para estimar a relação entre ácido úrico e alantoína excretados na urina de bovinos

	Alantoína (mmol/d)	Ácido úrico (mmol/d)	ALA:DP
Média	169	20,2	89,0
Mediana	129	13,5	90,4
DP	123	22,9	4,97
Mínimo	18,8	0,30	66,2
Máximo	864	322	99,8
n	1100	1100	1100
Exp	38	38	38

ALA:DP: Percentual de alantoína total em relação aos derivados de purina totais excretados na urina.

Predição do fluxo de proteína microbiana da dieta

Para conhecer as variáveis que influenciam efetivamente na produção de proteína microbiana em bovinos de corte em condições tropicais, procedeu-se uma meta-análise com o objetivo de estudar o efeito das características dos animais e das dietas sobre essa variável. Neste estudo, foram utilizados 32

trabalhos conduzidos no Brasil, usando dados de bovinos de corte e de leite (Tabela 3.7) bem como teses e dissertações concluídas no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (Apêndice 3.3), totalizando 2102 dados, em que se estudaram diferentes variáveis que poderiam interferir na produção de proteína microbiana ruminal.

Tabela 3.7 - Estatística descritiva dos dados utilizados para gerar modelos de regressão múltipla para estimação da produção da proteína microbiana em bovinos de corte em condições tropicais

Item ¹	n	Média	DP ²	Max ³	Min ⁴
PBmic	2102	775	547	3008	66,8
CPB	2102	1,22	0,87	4,39	0,59
CMS(kg)	2102	8,52	5,31	23,8	1,76
PC (kg)	1563	368	125	737	65,3
CNDT	2102	6,22	3,74	16,8	0,83
CEM	2102	22,3	13,3	60,9	3,00
CMOD	1454	5,70	2,98	15,5	0,62

¹Proteína microbiana em g/dia; Consumo de proteína bruta em kg/dia; Consumo de matéria seca em kg/dia; Consumo de nutrientes digestíveis totais em kg/dia; Consumo de energia metabolizável (Mcal/dia); Consumo de matéria orgânica digestível total em kg/dia; Valor médio; ²Desvio padrão; ³Máximo; ⁴Mínimo.

Além disso, o banco de dados foi utilizado separadamente para avaliar quatro opções de atributos energéticos distintos em cada equação, todos associados ainda ao consumo de PB. Primeiramente estudou-se o efeito do consumo de nutrientes digestíveis totais (CNDT), em seguida avaliou-se o efeito do consumo de energia metabolizável (CEM), do consumo de matéria orgânica digerida total (CMOD) e por fim, o CNDT corrigido para EE (CNDTee). Assim, o banco de dados completo foi composto das variáveis acima classificadas de acordo com o experimento, grupo genético (Zebuínos, cruzados de corte, cruzados de leite e Holandês), classe sexual (macho não castrado, macho castrado, vaca e novilha) e método analítico (RNA, derivados de purina ou ¹⁵N), que compuseram todos os efeitos estudados.

Os efeitos aleatórios como grupo genético, classe sexual e método analítico não foram significativos para nenhum dos modelos propostos ($P > 0,05$) através de meta-análise. Uma vez estudados todos os efeitos e verificadas as variáveis que compuseram os modelos, utilizou-se o método *Cross Validation* (Duchesne & MacGregor, 2001) para estimar os parâmetros de cada regressão linear e quadrática. Optou-se pelo

polinômio quadrático uma vez que a produção microbiana não se comporta de forma linear e em teoria atingirá um platô. Sendo assim, as seguintes equações foram obtidas:

$$PBmic = - 53,07 + 304,9 \times CPB + 90,8 \times CNDT - 3,13 \times CNDT^2$$

$$PBmic = - 84,87 + 328,7 \times CPB + 28,3 \times CEM - 0,25 \times CEM^2$$

$$PBmic = - 93,62 + 381,7 \times CPB + 90,7 \times CMOD - 3,13 \times CMOD^2$$

O banco de dados utilizado para estimar as equações anteriores foi formado por dados que apresentavam, em média, 2,83% ($\pm 1,03$) de EE (extrato etéreo) na dieta. No entanto, a exemplo do NASEM (2016), o BR-CORTE (2016) desenvolveu uma equação para estimar a síntese de proteína microbiana para altos valores de EE:

$$PBmic = - 43,13 + 376,8 \times CPB + 90,9 \times CNDTee - 3,22 \times CNDTee^2$$

em que: PBmic é a síntese de proteína microbiana, CPB é o consumo de proteína bruta, CNDTee é o consumo de nutrientes digestíveis totais corrigido para EE.

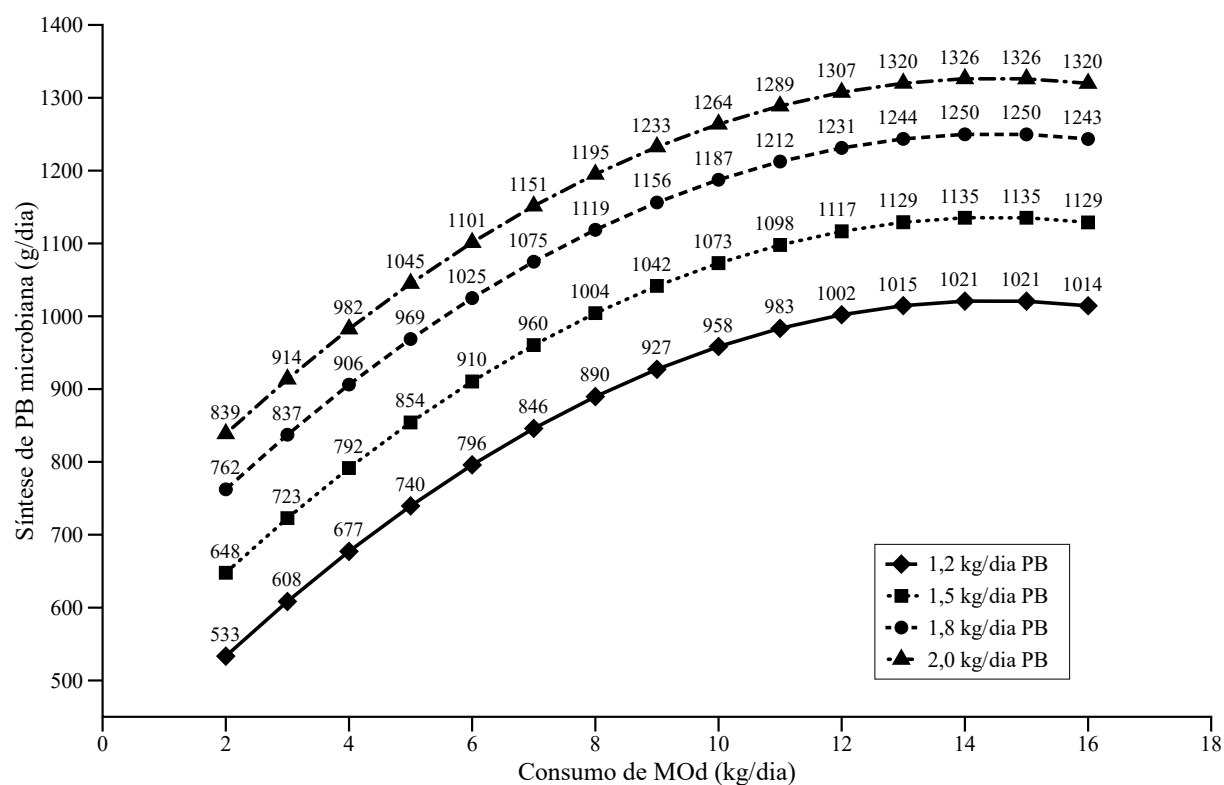


Figura 3.3 - Simulação das estimativas da síntese de PBmic ruminal (g/dia) utilizando a equação $PBmic = -93,62 + 381,7 \times CPB + 90,7 \times CMoD - 3,13 \times CMoD^2$, utilizando quatro valores de consumo de PB (1,2; 1,5; 1,8 e 2,0 kg/dia) em função do CMoD (kg/dia).

O NASEM (2016) também sugere uma equação para estimar a síntese de proteína microbiana corrigida para EE ao se utilizar dietas com teor de EE acima de 3,9%. No Brasil, a maioria das dietas para bovinos de corte é formulada para conter teores inferiores a esse. No entanto, caso se utilize dietas com alto teor de EE, pode-se utilizar a equação desenvolvida pelo BR-CORTE, que foi gerada a partir de um banco de dados contendo 1437 animais em condições tropicais.

Para verificar a qualidade da predição realizada pelas equações ajustadas, procedeu-se um processo de validação utilizando dados da literatura (Apêndice 3.4) referentes a experimentos já publicados em diversos periódicos (Tabela 3.8). Foram utilizados alguns critérios para utilização de artigos, sendo que foram retiradas médias de tratamentos de trabalhos que (1) foram executados no Brasil, (2) foram executadas com animais Nelore ou cruzados com Nelore, (3) foram publicados a partir de 2017 em revistas com JCR, (4) continham as variáveis descritas na equações

testadas e, (5) apresentaram valores de resíduos padronizados para predito e observado entre -4 e 4.

Nota-se que não houve efeito significativo ($P > 0,05$) para o teste de Mayer para todas as variáveis estudadas no procedimento de validação (Tabela 3.9), o que indica que os dados preditos através dos modelos propostos são iguais aos observados no conjunto de dados da literatura (Figura 3.4). Os valores de CCC e RMSE também são próximos entre as equações propostas. A equação proposta para CEM foi a que apresentou maior QMEP, com menor percentual de erros aleatórios, isso indicada que a qualidade da predição desse modelo é ligeiramente inferior aos demais. O mesmo pode ser dito ao analisar o desvio médio de -25,7 g ($P = 0,09$), que foi maior ao desvio calculado para os demais modelos. Sendo assim, recomenda-se que a estimativa da PBmic ruminal deve ser realizada a partir do CEM apenas quando não houver a disponibilidade dos valores de CNDT e CMoD, que se mostraram mais acurados e precisos para predição, quando comparados àqueles obtidos a partir do CEM.

Tabela 3.8 - Estatística descritiva dos dados coletados na literatura para validação de modelos de regressão múltipla para estimação da produção da proteína microbiana em bovinos de corte em condições tropicais

Item ¹	Min	Max	Média	DP	N
PBmic	225,6	1025,0	533,4	182,1	66
CNDT	2,3	7,7	4,3	1,2	66
CMOd	2,1	7,4	4,1	1,1	66
CPB	0,4	1,4	0,8	0,2	66
CEM	9,9	34,0	18,9	5,2	66

¹Proteína microbiana em g/dia; Consumo de nutrientes digestíveis totais em kg/dia; Consumo de matéria orgânica digestível total em kg/dia; Consumo de proteína bruta (kg/dia); Consumo de energia metabolizável (Mcal/dia); Valor médio; ²Desvio padrão; ³Máximo; ⁴Mínimo.

As equações propostas para determinação da proteína microbiana podem ser utilizadas para cálculo desta fração considerando diferentes cenários (Figura 3.3) em que há variação tanto do consumo de PB quanto da energia, e tais equações são

utilizadas neste sistema para empregar a transformação das exigências de proteína líquida e metabolizável em exigências de PDR e PNDR, bem como na estimativa das exigências de proteína bruta em diferentes grupos de bovinos de corte.

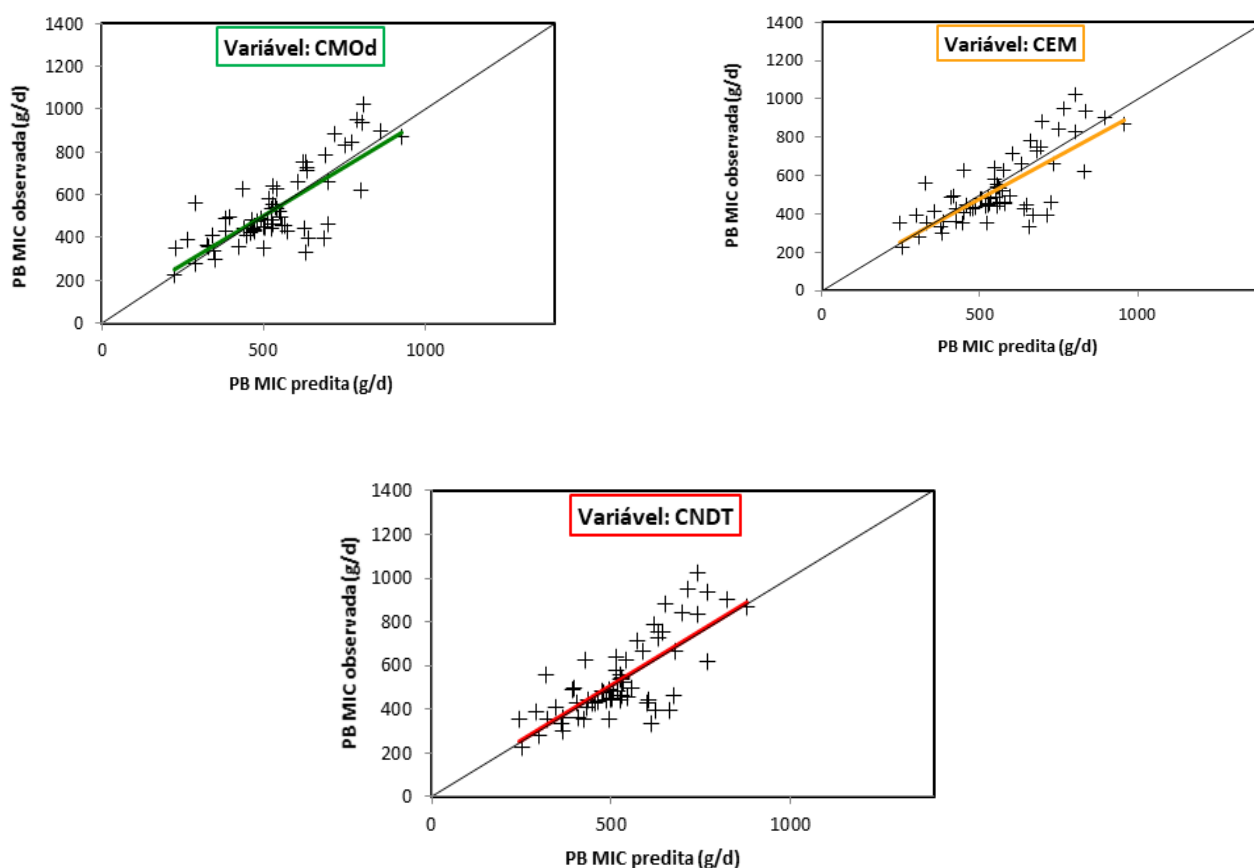


Figura 3.4 - Valores de PBmic observados e preditos a partir das equações propostas a partir do CMOd, CEM e CNDT em bovinos de corte

Tabela 3.9 - Validação de modelos preditos para determinação da PBmic (g/dia) em bovinos de corte, a partir do consumo de PB e consumo de energia em três diferentes apresentações (NDT, MOd e EM), utilizando médias de tratamento de 16 trabalhos publicados (n= 66) coletados da literatura

Item1	CNDT	CMOd	CEM
Teste de Mayer			
Intercepto	5,39	46,5	31,89
Inclinação	1,01	0,91	0,89
P-valor	0,85	0,61	0,13
RMSE	117,9	113,6	121,4
CCC	0,73	0,77	0,74
QMEP	13909	12914	22704
Vício médio %	0,50	0,02	4,5
Vício sistemático %	0,01	1,52	1,7
Erros aleatórios %	99,5	98,5	93,81
Média predita			
Desvio médio	-8,06	1,79	-25,7

RESUMO DE EQUAÇÕES

○ **Estimação da contaminação microbiana de volumosos incubados *in situ*:**

- $A_{PBCC} = 1,99286 + 0,98256 \times A_{PBSC}$
- $B_{PBCC} = -17,2181 - 0,0344 \times B_{PBSC} + 0,65433 \times PB + 1,03787 \times FDN + 2,66010 \times PIDN - 0,85979 \times FDNi$
- $kd_{PBCC} = 0,04667 + 0,35139 \times B_{PBSC} + 0,0020 \times PB - 0,00055839 \times FDN - 0,00336 \times PIDN + 0,00075089 \times FDNi$
- $\%C = 79,21 \times (1 - e^{-0,0555t}) \times e^{-0,0874PB}$

○ **Correção nas estimativas da PBmic estimadas a partir de ensaios com sistema de indicador único e duplo:**

- $NM_{corrigido} (g/dia) = 49,71 + 0,66 NM_{único}$
- $NM_{corrigido} (g/dia) = 43,04 + 0,71 NM_{dúplo}$

○ **Fração endógena de derivados de purinas na urina em zebuínos: 0,30 mmol/kg^{0,75}**

○ **Excreção diária de ácido úrico na urina a partir da excreção diária de alantoína na urina**

- $AU (mmol/dia) = 0,1104 \times ALA$

• **Estimação da excreção diária de creatinina na urina em bovinos:**

- $ECU (mg/dia) = 66,2158 \times PC^{0,8384}$;

• **Predição do fluxo de PBmic para o intestino delgado:**

- $PBmic = -53,07 + 304,9 \times CPB + 90,8 \times CNDT - 3,13 \times CNDT^2$
- $PBmic = -84,87 + 328,7 \times CPB + 28,3 \times CEM - 0,25 \times CEM^2$

$$PBmic = -93,62 + 381,7 \times CPB + 90,7 \times CMOd - 3,13 \times CMOd^2$$

REFERÊNCIAS

- Barbosa, A. M.; Valadares, R. F.; Valadares Filho, S. C.; Pina, D. S.; Detmann, E.; and Leao, M. I. 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nellore cattle. *Journal of Animal Science* 89:510-519.
- Bowen, M. K.; Poppi, D. P.; MClennan, S. R.; and Doogan, V. J. 2006. A comparison of the excretion rate of endogenous purine derivatives in the urine of *Bos indicus* and *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research* 57:173-177.
- Braga, J.M.D.S., Valadares, R.F.D., Pellizzoni, S.G., Valadares Filho, S.D.C., Prates, L.L. and Costa e Silva, L.F., 2012. Estimation of endogenous contribution and urinary excretion of purine derivatives from the total digestible nutrient intake in Nellore heifers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41:1899-1906.
- BR-CORTE. Valadares Filho, S. C.; Costa e Silva, L. F., Gionbelli, M. P., Rotta, P. P., Marcondes, M. I., Chizzotti, M. L. *Nutrient Requirements of Zebu Beef Cattle – BR-CORTE*, 3 ed. – Viçosa: UFV, DZO. 193 p. 2016.
- Broderick, G. A.; and Cochran, R. C. 2000. In vitro and in situ methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. In: Theodorou, M.K. and France, J. (eds) *Feeding Systems and Feed Evaluation models*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 53–85.
- Broderick, G. A.; and Merchen, N. R. 1992. Markers for Quantifying Microbial Protein Synthesis in the Rumen. *Journal of Dairy Science* 75:2618-2632.
- Cabral, L.S., de Campos Valadares Filho, S., Zervoudakis, J.T., de Souza, A.L. and Detmann, E., 2005. Degradabilidade in situ da matéria seca, da proteína bruta e da fibra de alguns alimentos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 40(8), pp.777-781.
- Casali, A. O. et al. 2008. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37: 335-342.
- Casalmiglia, S., e M. D. J. Stern. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal Animal Science*. 73:1459-1465.
- Chen, X. B.; and Gomes, M. J. 1992. *Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details*. Bucksburnd Aberdeen:Rowett Research Institute, 21p.
- Chen, X. B.; and Ørskov, E. R. 2003. *Research on urinary excretion of purine derivatives on ruminants: past, present and future*. International Feed Research Unit, United Kingdom. p. 1 – 34.
- Chen, X. B.; Hovell, F. D. D.; Orskov, E. R.; and Brown, D. S. 1990 a. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *British Journal of Nutrition* 63:131-142
- Chen, X. B.; Mathieson, J.; Hovell, F. D. D.; and Reeds, P. J. 1990 b. Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. *Journal of Scientific Food Agriculture* 53:23-33.
- Chen, X. B.; Orskov, E. R.; and Hovell, F. D. D. 1990 c. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *British Journal of Nutrition* 63:121-129.
- Duchesne, C., MacGregor, J.F. 2001. Jackknife and bootstrap methods in the identification of dynamic models. *Journal Process Control* 11: 553–564.
- Faichney, G. J. 1980. Measurements in sheep of the quantity and composition of rumen digesta and the fractional outflow rates of digesta constituents. *Australian Journal of Agricultural Research* 31:1129-1137.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of nutrition* 126:1347S-1354S.
- Fox, D. G.; Tylutki, T. P.; Van Amburgh, M. E.; Chase, L. E.; Pell, A. N.; Overton, T. R.; Tedeschi, L. O.; Rasmussen, C. N.; Durbal, V. M. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion (*AnSci Mimeo* 213 Ed.). Animal Science Department, Cornell University, Ithaca, NY, 2000.
- France, J.; López, S.; Dijkstra, J.; and Dhanoa, M. S. 1997. Particulate matter loss and the polyester-bag method. *British Journal of Nutrition* 78, 1033–1037.
- France, J.; Thornley, J. H. M.; López, S.; Siddons, R. C.; Dhanoa, M. S.; Van Soest, P. J.; and Gill, M. 1990. On the two-compartment model for estimating the rate and extent of feed degradation in the rumen. *Journal of Theoretical Biology* 146, 269–287.

- Harper, H. A.; Rodwell, V. W.; Mayes, P. A. *Manual de Química Fisiológica*. 28^o ed. São Paulo: Atheneu. 2013. 736p.
- Higgs, R. J.; Chase, L. E.; Ross, D. A.; Van Amburgh, M. E. Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. *Journal of Dairy Science*, 98:6340-6360, 2015.
- Huntington, J. A.; and Givens, D. I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews Series B. Livestock Feeds and Feeding* 65, 63-93.
- Hvelplund, T. and Weisbjerg, M.R., 2000. In Situ Techniques for the Estimation of Protein Degradability and Postrumen. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, p.233.
- Ipharraguerre, I. R.; Reynal, S. M.; Lineiro, M.; Broderick, G. A. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the post ruminal supple of nutrients in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90:1904-1919, 2007.
- Koren, A. Creatinine urine. *Medical encyclopedia*, 2000.
- 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*, 93:1138-1147, 2010.
- Leal, T. L.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Leão, M. I.; Detmann, E.; Barbosa, A. M.; Chizzotti, M. L.; Paixão, M. L. 2007. Daily variation in the excretion of creatinine and purine derivatives in steers. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:896-904.
- Ling, J. R.; Buttery, P. J. 1978. The simultaneous use of ribonucleic acid, 35S, 2,6-diaminopimelic acids and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *British Journal of Nutrition* 39:165.
- López, S. 2005. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: Djistra, J.; Forbes, J. M.; and France, J. (eds) *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2nd edn. CAB International, Wallingford, UK, pp.87-121.
- López, S. 2008. Non-linear functions in animal nutrition. *Mathematical Modelling in Animal Nutrition* 47-88.
- López, S.; France, J.; and Dhanoa, M.S. 1994. A correction for particulate matter loss when applying the polyester-bag method. *British Journal of Nutrition* 71:135-137
- López, S.; France, J.; Dhanoa, M.; Mould, F.; and Dijkstra J. 1999. Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. *Journal of Animal Science* 77:1875-1888
- Machado, P. A. S.; Valadares Filho, S. C.; Detmann, E.; Santos, S. A.; Valadares, R. F. D.; Ducatti, C.; Rotta, P. P.; and Silva, L. F. C. 2013. Development of equations to estimate microbial contamination in ruminal incubation residues of forage produced under tropical conditions using n as a label. *Journal of Animal Science* 91: 3836-3846.
- Magalhães, K. A. et al. 2005. Produção de proteína microbiana, concentração plasmática de uréia e excreções de uréia em novilhos alimentados com diferentes níveis de uréia ou casca de algodão. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34: 1400-1407.
- Mariz, L. D. S., Amaral, P. D. M., Valadares Filho, S. D. C., Santos, S. A., Marcondes, M. I., Prados, L. F., and Faciola, A. P. (2018). 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 15N as markers. *Journal of Animal Science*, 96, 2453-2467.
- Martins, A.S., Zeoula, L.M., do Prado, I.N. and Nunes, E., 1999. Degradabilidade ruminal in situ da matéria seca e proteína bruta das silagens de milho e sorgo e de alguns alimentos concentrados. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28(5), pp.1109-1117.
- Mayer, D.; Stuarde, M.; Swain, A. 1994. Regression of real-world data on model output: An appropriate overall test of validity. *Agricultural Systems* 45: 93-104.
- Menezes, A. C. B., Filho, S. V., Rotta, P. P., Santos, S. A., Pacheco, M. V. C., Silva, B. C., ... & Caton, J. S. (2017). Does microbial nitrogen contamination affect the estimation of crude protein degradability of concentrate feeds?. *Journal of Animal Science*, 95(9), 4164-4171.
- Menezes, A. C. B., Valadares Filho, S.C., Pucetti, P., C. Pacheco, M. V, Godoi, L. A., Zanetti, D., Alhadas, H. M; Paulino, M. F, Caton, J. S. Oscillating and static dietary crude protein supply: II. Energy and protein requirements of young Nellore bulls. *Translational Animal Science*, v. 3, p. 1216-1226, 2019.

- Mcalian, A. B.; Smith, R. H. 1973. Degradation of nucleic acids in the rumen. *British Journal of Nutrition* 29:331-345.
- Mcallan, A. B. 1980. The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *British Journal of Nutrition* 44:99-112.
- Michalet-Doreau, B.; and Ould-Bah, M.Y. 1992. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology* 40, 57–86.
- NASEM. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2016. *Nutrient requirements of beef cattle*. 8th revised edition. National Academy Press, Washington DC, USA.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC
- Nocek, J. E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *Journal of dairy science* 71: 2051-2069.
- Nocek, J. E. 1997. *In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review*. In: Teixeira, J. C. (Ed.) *Digestibilidade em ruminantes*. Lavras: FAEPE, p.197-240.
- Nocek, J. E.; and Grant. A. L. 1987. Characterization of in situ nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *Journal of Animal Science* 64: 552-564.
- Oliveira, A. S.; Campos, J. M. S.; Valadares Filho, S. C.; Assis, A. J.; Teixeira, R. M. T.; Rennó, L. N.; Pina, D. S.; and Oliveira, G. S. 2007. Substituição do milho pela casca de café ou de soja em dietas para vacas leiteiras: Comportamento ingestivo, concentração de nitrogênio uréico no plasma e no leite, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. *Revista Brasileira Zootecnia* 36: 205-215.
- Oliveira, A. S.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho S. C.; Cecon, P. R.; Rennó, L. N.; Queiroz, A. C.; and Chizzotti, M. L. 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30:1145-1152.
- Orellana Boero, P.; Balcells, J.; Martín-Orúe, S. M.; Liang, J. B.; and Guada, J. A. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science* 68:243-250.
- Ørskov, E. R.; McDonald, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92:499-503, 1979.
- Ørskov, E. R.; Hovell, F. D.; De, B.; and Mould, F. 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production* 5:195–213.
- Pereira, V. S. A. 2009. *Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas Nelore*. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa.
- Pina, D. S.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Detmann, E.; Campos, J. M. S.; Fonseca, M. A.; Teixeira, R. M. A.; and Oliveira, A. S. 2006. Estimation of microbial protein synthesis and urea nitrogen metabolism in lactating dairy cows fed diets supplemented with different protein sources. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:1552-1559.
- Pires, A. J. V.; Reis, R. A.; Carvalho, G. G. P. D.; Siqueira, G. R.; Bernardes, T. F.; Ruggieri, A. C.; Almeida, E. D. O.; Roth, M. D. T. P. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da fração fibrosa e da proteína bruta de forrageiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:643-648, 2006.
- Prates, L. L., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. C., Detmann, E., Ouellet, D. R., Batista, E. D., ... & Silva, B. C. (2017). Investigating the effects of sex of growing Nelore cattle and crude protein intake on the utilization of recycled N for microbial protein synthesis in the rumen by using intravenous 15N15N-urea infusion. *Animal Feed Science and Technology*, 231, 119-130.
- Prates, L. L.; Valadares, R. F. D.; Valadares Filho, S. C.; Detmann, E.; Santos, S. A.; Braga, J. M. S.; Pellizzoni, S. G.; and Barbosa, K. S. 2012. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives in Nelore and Holstein heifers with abomasal purine infusion. *Livestock Science* 150:179-186.

- Puchala, R., and Kulasek, G. 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Canadian Journal of Animal Science* 72: 821-830.
- Rennó, L. N., Valadares, R. F. D.; and Leão, M. I. 2000. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29: 1223-1234.
- 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*, 88:4065–4082, 2005.
- Rotta, P. P.; Valadares Filho, S. C.; Detmann, E.; Costa e Silva, L. F.; Paulino, M. F.; Marcondes, M. I.; Lobo, A. A.; and Villadiego, F. A. 2014a. 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* 92: 2996-3006.
- Rotta, P. P.; Valadares Filho, S. C.; Costa e Silva, L. F.; Detmann, E.; Villadiego, F. A.; Engle, T. E.; Valadares, R. F. D.; Silva, B. C.; M. V. C. Pacheco; and Zanetti, D. 2014b. Comparison of purine bases and 15 n for quantifying microbial nitrogen yield using three marker systems and different sampling sites in zebu cross breed bulls. *Livestock Science* 167: 144-153.
- Santos, S. A.; Campos, J. M.; Valadares Filho, S. C.; Oliveira, A. S.; Souza, S. M.; and Santiago, A. M. F. 2010. Balanço de nitrogênio em fêmeas leiteiras em confinamento alimentadas com concentrado à base de farelo de soja ou farelo de algodão. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 1135-1140.
- Schwab, C. G.; Tylutki, T. P.; and Ordway, R. S. 2003. Characterization of proteins in feeds. *Journal of Dairy Science* 86:88–103.
- Seo, S.; Tedeschi, L. O.; Lanzas, C.; Schwab, C. G.; Fox, D. G. Development and evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 128:67-83, 2006.
- Silva Júnior, J. M., Rennó, L. N., Valadares Filho, S. C., Paulino, M. F., Detmann, E., Menezes, G. C. C., Martins, T. S., Paula, R. M., Rodrigues, J. P. P., & Marcondes, M. I. (2018). Evaluation of collection days and times to estimate urinary excretion of purine derivatives and nitrogen compounds in grazing Nellore cattle. *Livestock Science*, 217, 85– 91.
- Silva Júnior, J. M., Rodrigues, J. P. P., Valadares Filho, S. D. C., Detmann, E., Paulino, M. F., & Rennó, L. N. (2021). Estimating purine derivatives and nitrogen compound excretion using total urine collection or spot urine samples in grazing heifers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(5), 861-873.
- Sniffen, C. J.; O'Connor, J. D.; Van Soest, P. J.; Fox, D. G.; Russell, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70:3562-3577, 1992.
- Storm, E., Brown, D. S., & Ørskov, E. R. (1983). The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants: 3. The digestion of microbial amino and nucleic acids in, and losses of endogenous nitrogen from, the small intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 50(2), 479-485.
- Susmel, P.; Stefanon, B.; Plazzotta, E.; Spanghero, M.; and Mills, C. R. 1994. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. *The Journal of Agricultural Science* 123:257-265.
- Tamminga, S.; and Chen, X. B. 2000 Animal based techniques for the estimation of protein value of forages. In: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E., et al. (Ed). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*, Wallingford: CABI Publishing, p. 215-232.
- Tas, B. M.; and Susenbeth, A. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science* 111:181-192.
- Teixeira, R. M. A.; Campos, J. M. S.; Valadares Filho, S. C.; Valadares, R. F. D.; Oliveira, A. S.; Pina, D. S. 2007. Balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana em novilhas leiteiras alimentadas com casca de café em substituição à silagem de milho. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:1691-1698.
- Topps, J. H.; Elliott, R. C. 1965. Relationship between Concentrations of Ruminal Nucleic Acids and Excretion of Purine Derivatives by Sheep. *Nature* 205:498-499.
- Ushida, K.; Lassalas, B.; Jouany, J. P. 1985. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry: Influence of sample treatment and preservation. *Reproduction, Nutrition and Development* 25:1037- 1046.

- Vagnoni, D. B., Broderick, G. A., Clayton, M. K., & Hatfield, R. D. (1997). Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1695-1702.
- Valadares, R. F.; Broderick, G. A.; Valadares Filho, S. C.; and Clayton, M. K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82:2686-2696.
- Van Milgen, J.; Murphy, M.; and Berger, L. 1991. A compartmental model to analyze ruminal digestion. *Journal of Dairy Science* 74:2515-2529.
- Vanzant, E. S.; Cochran, R. C.; and Titgemeyer, E. C. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science* 76:2717-2729.
- Verbic, J.; Chen, X. B.; Macleod, N. A.; and Ørskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *The Journal of Agricultural Science* 114:243-248.
- Waldo, D. R.; Smith, L. W.; and Cox, E. L. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. *Journal of Dairy Science* 55:125-129.
- Weisbjerg, M.R., Bhargava, P.K., Hvelplund, T. and Madsen, J. (1990) Anvendelse af Nedbrydningsprofiler i Fodermiddelvurderingen. Beretning, 679, Statens Husdyrbrugsforsøg, Foulum, Denmark, 33 pp.
- Barbosa, A.M., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Pina, D.S., Detmann, E., and Leão, M.I., 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nellore cattle, *Journal of Animal Science*, 89, 510-519.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Leão, M.I., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Magalhães, K.A., and Marcondes, M.I., 2005. Partial replacement of elephant grass silage with cottonseed hulls. 2. Ruminal and serum metabolites, microbial protein synthesis, and urinary excretion of nitrogenous compounds in steers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 2103-2111.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Marcondes, M.I., and Fonseca, M.A., 2007. Intake, digestibility and nitrogen metabolism in Holstein cows with different milk production levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 138-146.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Campos, J.M.S., Marcondes, M.I., and Fonseca, M.A., 2006. Intake, digestibility and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1813-1821.
- Diniz, L.L., Valadares Filho, S.C., Oliveira, A.S., Pina, D.S., Silva, L.D., Benedeti, P.B, Baião, G.F., Campos, J.M.S., and Valadares, R.F.D., 2011. Castor bean meal for cattle finishing: nutritional parameters, *Livestock Science*, 135, 153-167.
- Gionbelli, M.P., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Paulin, P.V.R., Valadares, R.F.D., Santos, T.R., Costa e Silva, L.F., and Magalhães, F.A., 2012. Intake, performance, digestibility, microbial efficiency and carcass characteristics of growing Nellore heifers fed two concentrate levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 1243-1252.
- Leal, T.L., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Campos, J.M.S., Detmann, E., Barbosa, A.M., Teixeira, R.M.A., and Marcondes, M.I., 2007a. Daily variation in the urinary excretion of creatinine and purine derivatives in heifers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 905-911.
- Leal, T.L., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Leão MI, Detmann E, Barbosa AM, Chizzotti ML, and Paixão ML., 2007b. Daily variation in the excretion of creatinine and purine derivatives in steers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 896-904.

APÊNDICES

Apêndice 3.1

- Azevêdo, J.A.G., Valadares Filho, S.C., Pina, D.S., Detmann, E., Valadares, R.F.D., Pereira, L.G.R., Souza, N.K.P., and Costa e Silva, L.F., 2011. Intake, total digestibility, microbial protein production and the nitrogen balance in diets with fruit by-products for ruminants, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 1052-1060.
- Barbosa, A.M.; Valadares, R.F.D.; Valadares Filho, S.C., Vêras, R.M.L., Leão, M.I., Detmann, E., Paulino, M.F., Marcondes, M.I., and Souza, M.A., 2006. Effect of urinary collection days, concentrate levels and protein sources on creatinine, urea and purine derivatives excretions and microbial protein synthesis in Nellore cattle, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 870-877.

- Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C., Chizzotti, M.L., 2001a. Microbial Protein Production, Purine Derivatives and Urea Excretion Estimate in Lactating Dairy Cows Fed Isoprotein Diets with Different Non Protein Nitrogen Compounds Levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1621-1629.
- Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Oliveira, G.A., Silva, R.M.N., and Costa, M.A.L., 2001b. Intake, apparent digestibility, milk composition and production of lactating cows fed four non-protein nitrogen compounds levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1358-1366.
- Pellizzoni, S.G., 2011. *Estimativa da excreção urinária de derivados de purinas a partir do consumo de NDT e determinação da contribuição endógena em vacas de leite*, (unpublished Master Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil).
- Pereira, M.L.A., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Campos, J.M.S., Leão, M.I., Pereira, C.A.R., Pina, D.S., and Mendonça, S.S., 2005. Intake, Total Apparent Digestibility, Milk Production and Composition in Early Lactation Cows Fed with Increasing Levels of Crude Protein in the Concentrate, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1029-1039.
- Pereira, V.S.A., 2009. *Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas nelore*, (unpublished Master Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil).
- Prates, L. L., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. C., Detmann, E., Ouellet, D. R., Batista, E. D., Silva, B. C., 2017. Investigating the effects of sex of growing Nellore cattle and crude protein intake on the utilization of recycled N for microbial protein synthesis in the rumen by using intravenous ¹⁵N¹⁵N-urea infusion. *Animal Feed Science and Technology*, 231, 119-130.
- Silva, F. A. S., Valadares Filho, S. C., Detmann, E., Santos, S. A., Godoi, L. A., Silva, B. C., ... & Rotta, P. P., 2016. Effect of different forage types and concentrate levels on energy conversion, enteric methane production, and animal performance of Holstein× Zebu heifers. *Animal Production Science*, 57, 2042-2050.
- Silva, F. A. S., Valadares Filho, S. C., Godoi, L. A., Silva, B. C., Pacheco, M. V. C., Zanetti, D., Felix, T. L., 2020. Effect of duration of restricted-feeding on nutrient excretion, animal performance, and carcass characteristics of Holstein× Zebu finishing steers. *Animal Production Science*, 60, 535-544.
- Sales Silva FA, Valadares Filho SD, Rennó LN, Trópia NV, Souza CW, Alhadas HM, Mafort EG, Felix TL., 2020. Effect of restricted-feeding strategies on blood concentrations of hormones, metabolites, and minerals in Holstein× Zebu finishing steers. *Ciência Animal Brasileira*. 19, 21.
- Silva Júnior, J. M., Rodrigues, J. P. P., Valadares Filho, S. D. C., Detmann, E., Paulino, M. F., & Rennó, L. N. 2021. Estimating purine derivatives and nitrogen compound excretion using total urine collection or spot urine samples in grazing heifers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105, 861-873.
- Silva Júnior, J. M. D., Rennó, L. N., Detmann, E., Valadares Filho, S. D. C., & Rodrigues, J. P. P., 2023. Creatinine recovery from bovine urine under the effect of different times and temperatures of storage. *Plos one*, 18, e0282145.
- Silva, R.M.N., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C., and Chizzotti, M.L., 2001. Urea for Dairy Cows. 2. Estimates of Urinary Volume, Microbial Production and Urea Excretion, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1948-1957.
- Zanetti, D., Godoi, L. A., Estrada, M. M., Engle, T. E., Silva, B. C., Alhadas, H. M., Valadares Filho, S. C., 2017. Estimating mineral requirements of Nellore beef bulls fed with or without inorganic mineral supplementation and the influence on mineral balance. *Journal of Animal Science*, 95, 1696-1706.

Apêndice 3.2

- Azevêdo, J.A.G., Valadares Filho, S.C., Pina, D.S., Detmann, E., Valadares, R.F.D., Pereira, L.G.R., Souza, N.K.P., and Costa e Silva, L.F., 2011. Intake, total digestibility, microbial protein production and the nitrogen balance in diets with fruit by-products for ruminants, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 1052-1060.
- Barbosa, A.M., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Pina, D.S., Detmann, E., and Leão, M.I., 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives obtained by different methods in Nellore cattle, *Journal of Animal Science*, 89, 510-519.

- Barbosa, A.M.; Valadares, R.F.D.; Valadares Filho, S.C., Vêras, R.M.L., Leão, M.I., Detmann, E., Paulino, M.F., Marcondes, M.I., and Souza, M.A., 2006. Effect of urinary collection days, concentrate levels and protein sources on creatinine, urea and purine derivatives excretions and microbial protein synthesis in Nellore cattle, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 870-877.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Leão, M.I., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Magalhães, K.A., and Marcondes, M.I., 2005. Partial replacement of elephant grass silage with cottonseed hulls. 2. Ruminal and serum metabolites, microbial protein synthesis, and urinary excretion of nitrogenous compounds in steers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 2103-2111.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Marcondes, M.I., and Fonseca, M.A., 2007. Intake, digestibility and nitrogen metabolism in Holstein cows with different milk production levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 138-146.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Campos, J.M.S., Marcondes, M.I., and Fonseca, M.A., 2006. Intake, digestibility and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1813-1821.
- Diniz, L.L., Valadares Filho, S.C., Oliveira, A.S., Pina, D.S., Silva, L.D., Benedeti, P.B., Baião, G.F., Campos, J.M.S., and Valadares, R.F.D., 2011. Castor bean meal for cattle finishing: nutritional parameters, *Livestock Science*, 135, 153-167.
- Gionbelli, M.P., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Paulin, P.V.R., Valadares, R.F.D., Santos, T.R., Costa e Silva, L.F., and Magalhães, F.A., 2012. Intake, performance, digestibility, microbial efficiency and carcass characteristics of growing Nellore heifers fed two concentrate levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 1243-1252.
- Leal, T.L., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Campos, J.M.S., Detmann, E., Barbosa, A.M., Teixeira, R.M.A., and Marcondes, M.I., 2007a. Daily variation in the urinary excretion of creatinine and purine derivatives in heifers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 905-911.
- Leal, T.L., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Leão MI, Detmann E, Barbosa AM, Chizzotti ML, and Paixão ML., 2007b. Daily variation in the excretion of creatinine and purine derivatives in steers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 896-904.
- Machado, P.A.S., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Detmann, E., Paixão, M.L., Pina, D.S., 2008. Nutritional evaluation of elephantgrass at different regrowth ages, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 1121-1128.
- Magalhães, K.A., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Paixão, M.L., Pina, D.S., Paulino, P.V.R., Chizzotti, M.L., Marcondes, M.I., Araújo, A.M., and Porto, M.O., 2005. Effects of Feeding Different Levels of Urea or Cottonseed Hulls on Microbial Protein Synthesis, Plasma Urea Concentration and Urea Excretion in Steers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1400-1407.
- Marcondes, M.I., Valadares Filho, S.C., Oliveira, I.M., Paulino, P.V.R., Valadares, R.F.D., and Detmann, E., 2011. Feed efficiency of pure and crossbred cattle fed high or low concentrate level, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 1313-1324.
- Marcondes, M.I., Valadares Filho, S.C., Paulino, P.V.R., Valadares, R.F.D., Paulino, M.F., Nascimento, F.B., and Fonseca, M.A., 2009. Nutrient requirements of protein, energy and macro minerals of Nellore cattle of three genders, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 1587-1596.
- Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C., Chizzotti, M.L., 2001a. Microbial Protein Production, Purine Derivatives and Urea Excretion Estimate in Lactating Dairy Cows Fed Isoprotein Diets with Different Non Protein Nitrogen Compounds Levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1621-1629.
- Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Oliveira, G.A., Silva, R.M.N., and Costa, M.A.L., 2001b. Intake, apparent digestibility, milk composition and production of lactating cows fed four non-protein nitrogen compounds levels, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1358-1366.
- Pellizzoni, S.G., 2011. *Estimativa da excreção urinária de derivados de purinas a partir do consumo de NDT e determinação da contribuição endógena em vacas de leite*, (unpublished Master Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil).
- Pereira, M.L.A., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Campos, J.M.S., Leão, M.I., Pereira, C.A.R., Pina, D.S., and Mendonça, S.S., 2005. Intake, Total Apparent Digestibility, Milk Production and Composition in Early Lactation Cows Fed with Increasing Levels of Crude Protein in the Concentrate, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1029-1039.

- Pereira, V.S.A., 2009. *Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas nelore*, (unpublished Master Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil).
- Pina, D.S., Valadares Filho, S.C., Azevêdo, J.A.G., Barbosa, A.M., Valadares, R.F.D., and Detmann, E., 2010. Effects of inclusion and exposition times of sugar cane to calcium oxide on the physiologic and digestive parameters of Nelore heifers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1579-1586.
- Pina, D.S., Valadares Filho, S.C., Tedeschi, L.O., Barbosa, A.M., Azevêdo, J.A.G., Valadares, R.F.D., Souza, N.K.P., and Fonseca, M.A., 2011. Levels of inclusion and exposure time of sugar cane to calcium oxide on digestive parameters and performance of Nelore heifers, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 648-656.
- Silva, R.M.N., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C., and Chizzotti, M.L., 2001. Urea for Dairy Cows. 2. Estimates of Urinary Volume, Microbial Production and Urea Excretion, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1948-1957.
- Souza, S. M., Lopes, F. C. F., de Campos, S., Filho, V., da Gama, M. A. S., Rennó, L. N., & Rodrigues, J. P. P., 2019. Milk fatty acid composition of Holstein x Gyr dairy cows fed sugarcane-based diets containing citrus pulp supplemented with sunflower oil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 40, 1663-1680.
- Souza, S.M., 2007. *Farelo de glúten de milho na alimentação de vacas em lactação*, (unpublished Master Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil).
- Apêndice 3.3**
- Campos, A. F., Pereira, O. G., Ribeiro, K. G., Santos, S. A., & de Campos Valadares Filho, S., 2014. Impact of replacing soybean meal in beef cattle diets with inactive dry yeast, a sugarcane by-product of ethanol distilleries and sugar mills. *Animal Feed Science and Technology*, 190, 38-46.
- Cardoso, R. C., Valadares Filho, S. D. C., Silva, J. F. C. D., Paulino, M. F., Valadares, R. F. D., Cecon, P. R., & Oliveira, R. V. D., 2000. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais de rações contendo diferentes níveis de concentrado, em novilhos F1 Limousin x Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 1832-1843.
- Cezário, A. S., Ribeiro, K. G., Santos, S. A., de Campos Valadares Filho, S., & Pereira, O. G., 2015. Silages of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu harvested at two regrowth ages: Microbial inoculant responses in silage fermentation, ruminant digestion, and beef cattle performance. *Animal Feed Science and Technology*, 208, 33-43.
- Chizzotti, F. H. M., Pereira, O. G., Tedeschi, L. O., Valadares Filho, S. C., Chizzotti, M. L., Leão, M. I., & Pereira, D. H., 2008. Effects of dietary nonprotein nitrogen on performance, digestibility, ruminal characteristics, and microbial efficiency in crossbred steers. *Journal of Animal Science*, 86, 1173-1181.
- Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S. D. C., Leão, M. I., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Magalhães, K. A., & Marcondes, M. I., 2005. Partial replacement of elephantgrass silage with cottonseed hulls. 2. Ruminal and serum metabolites, microbial protein synthesis, and urinary excretion of nitrogenous compounds in steers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 2103-2111.
- Corrêa, A. M. V. 2007. *Utilização da soja em diferentes formas na alimentação de vacas leiteiras*. Tese Doutorado. UFV. 128p.
- Costa e Silva, L. C., Valadares Filho, S. C., Chizzotti, M. L., Rotta, P. P., Zanetti, D., Valadares, R. D. F., & Detmann, E., 2014. Models to predict muscle tissue and crude protein in beef cattle. *Livestock Science*, 160, 186-193.
- Costa e Silva, L. F., de Campos Valadares Filho, S., Engle, T. E., Rotta, P. P., Marcondes, M. I., Silva, F. A. S., & Tokunaga, A. T., 2015. Macrominerals and trace element requirements for beef cattle. *PLoS One*, 10, e0144464.
- Dias, H. L. C., Valadares Filho, S. D. C., Coelho da Silva, J. F., Paulino, M. F., Cecon, P. R., Leão, M. I., & Oliveira, R. V. D., 2000. Consumo e digestões totais e parciais em novilhos F1 Limousin x Nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 545-554.
- Dias, M., Detmann, E., Leão, M. I., Souza, S. M. D., Valadares Filho, S. D. C., Vasconcelos, A. M. D., & Valadares, R. F. D., 2007. Indicadores para estimativa da digestibilidade parcial em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 689-697.
- Figueiredo, D. M. D., Paulino, M. F., Detmann, E., Moraes, E. H. B. K. D., Valadares Filho, S. D. C., & Souza, M. G. D., 2008. Fontes de proteína em suplementos múltiplos para bovinos em pastejo no período das águas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 2222-2232.

- Ladeira, M. M., Valadares Filho, S. D. C., Silva, J. F. C. D., Leão, M. I., & Sampaio, R. L., 1999. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais de dietas contendo diferentes níveis de concentrado, em novilhos Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28, 395-403.
- Machado, P. A. S., Valadares Filho, S. C., Valadares, R. F. D., Paulino, M. F., Paulino, P. V. R., & Marcondes, M. I., 2012. Desempenho e exigências de energia e proteína de bovinos de corte em pasto suplementados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 683-692.
- Malafaia, P. A., Valadares Filho, S. D. C., & Coelho Da Silva, J. F., 1996. Sebo bovino em rações para vacas em lactação. 1. Consumo dos nutrientes, produção e composição do leite. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 25, 153-163.
- Marcondes, M. I., Valadares Filho, S. D. C., Oliveira, I. M. D., Paulino, M. F., Paulino, P. V. R., Detmann, E., & Silva, L. F. C., 2011. Exigências de energia de animais Nelore puros e mestiços com as raças Angus e Simental. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 872-881.
- Marcondes, M. I., Valadares Filho, S. D. C., Paulino, P. V. R., Detmann, E., Paulino, M. F., Diniz, L. L., & Santos, T. R., 2008. Consumo e desempenho de animais alimentados individualmente ou em grupo e características de carcaça de animais Nelore de três classes sexuais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 2243-2250.
- Oliveira, A. S. D., Campos, J. M. D. S., Valadares Filho, S. D. C., Assis, A. J. D., Teixeira, R. M. A., Valadares, R. F. D., & Oliveira, G. S. D., 2007. Substituição do milho por casca de café ou de soja em dietas para vacas leiteiras: consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 1172-1182.
- Oliveira, A. S., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. D. C., Cecon, P. R., Rennó, L. N., Queiroz, A. C. D., & Chizzotti, M. L., 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1621-1629.
- Paiva, V. A., Lana, R. P., Oliveira, A. S., Leão, M. I., & Teixeira, R. M. A., 2013. Teores proteicos em dietas para vacas Holandesas leiteiras em confinamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 1183-1191.
- Pereira, M. L. A., Valadares Filho, S. D. C., Valadares, R. F. D., Campos, J. M. D. S., Leão, M. I., Pereira, C. A. R., & Mendonça, S. D. S., 2005. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1029-1039.
- Pina, D. D. S., Valadares Filho, S. D. C., Azevêdo, J. A. G., Barbosa, A. M., Valadares, R. F. D., & Detmann, E., 2010. Effects of inclusion and exposition times of sugar cane to calcium oxide on the physiologic and digestive parameters of Nelore heifers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1579-1586.
- Pina, D. S., Tedeschi, L. O., Valadares Filho, S. C., Azevedo, J. A. G., Detmann, E., & Anderson, R., 2009. Influence of calcium oxide level and time of exposure to sugarcane on in vitro and in situ digestive kinetics. *Animal Feed Science and Technology*, 153, 101-112.
- Prates, L. L., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. C., Detmann, E., Santos, S. A., Braga, J. M. S., & Barbosa, K. S., 2012. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives in Nelore and Holstein heifers with abomasal purine infusion. *Livestock Science*, 150, 179-186.
- Rabello, T. G., Valadares Filho, S. D. C., & Coelho da Silva, J. F. (1996). Grão de soja moído na alimentação de vacas em lactação III. Eficiência microbiana, amônia e pH. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 25, 270-281.
- Rennó, L. N., Valadares Filho, S. D. C., Valadares, R. F. D., Paulino, M. F., Rennó, F. P., & Silva, P. A., 2008. Níveis de ureia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: estimativa da produção de proteína microbiana por meio dos derivados de purinas na urina utilizando duas metodologias de coleta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 546-555.
- Rotta, P. P., Valadares Filho, S. C., Detmann, E., Costa e Silva, L. F., Paulino, M. F., Marcondes, M. I., & Villadiego, F. A. C., 2014. 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*, 92, 2996-3006.
- Silva, R. M. N. D., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. D. C., Cecon, P. R., Rennó, L. N., & Silva, J. M. D., 2001. Ureia para vacas em lactação: 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de ureia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1948-1957.

- Souza, S. M., Lopes, F. C. F., de Campos, S., Filho, V., da Gama, M. A. S., Rennó, L. N., & Rodrigues, J. P. P., 2019. Milk fatty acid composition of Holstein x Gyr dairy cows fed sugarcane-based diets containing citrus pulp supplemented with sunflower oil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 40, 1663-1680.
- Tibo, G. C., Valadares Filho, S. D. C., Silva, J. F. C. D., Valadares, R. F. D., Leão, M. I., Cecon, P. R., & Sampaio, R. L., 2000. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços F1 Simental x Nelore: 2. Balanço nitrogenado, eficiência microbiana e parâmetros ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 921-929.
- Véras, R. M. L., Valadares Filho, S. D. C., Azevêdo, J. A. G., Detmann, E., Paulino, P. V. R., Barbosa, A. M., & Marcondes, M. I., 2008. Níveis de concentrado na dieta de bovinos Nelore de três condições sexuais: consumo, digestibilidades total e parcial, produção microbiana e parâmetros ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 951-960.
- Villela, S. D. J., Paulino, M. F., de Campos Valadares Filho, S., Leão, M. I., & de Figueiredo, D. M., 2008. Fontes de proteína em suplementos para abate de bovinos em pastejo: período de transição águas-seca. *Revista Ciência Agronômica*, 39, 317-326.
- Vilela, S. D. J. (1995). *Utilização de caroço de algodão na alimentação de vacas em lactação*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 82p.
- Apêndice 3.4**
- Barbizan, M., Valente, E. E. L., Damasceno, M. L., Lopes, S. A., de Souza Tanaka, E., Junior, C. P. B., & Melo, B. V. R., 2020. Balanced protein/energy supplementation plan for beef cattle on tropical pasture. *Livestock Science*, 241, 104211.
- Hoffmann, A., Cardoso, A. S., Fonseca, N. V. B., Romanzini, E. P., Siniscalchi, D., Berndt, A., & Reis, R. A., 2021. Effects of supplementation with corn distillers' dried grains on animal performance, nitrogen balance, and enteric CH₄ emissions of young Nelore bulls fed a high-tropical forage diet. *Animal*, 15, 100155.
- Carvalho, V. V., Paulino, M. F., Detmann, E., Chizzotti, M. L., Martins, L. S., Silva, A. G., & Moura, F. H., 2017. Effects of supplements containing different additives on nutritional and productive performance of beef cattle grazing tropical grass. *Tropical Animal Health and Production*, 49, 983-988.
- Conceição, M. G., de Andrade Ferreira, M., de Lima Silva, J., Costa, C. T. F., Chagas, J. C. C., & de Figueiredo Monteiro, C. C. (2018). Can cactus (*Opuntia stricta* [Haw.] Haw) cladodes plus urea replace wheat bran in steers' diet? *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31, 1627.
- Corte, R. R., Brito, F. O., Leme, P. R., Pereira, A. S. C., Freitas, J. E., Rennó, F. P., & Nogueira Filho, J. C. M., 2018. The effects of partial substitution of soybean with urea or slow-release urea on finishing performance, meat quality, and digestion parameters of Nelore steers. *Animal Production Science*, 58, 2242-2248.
- Dórea, J. R., Gouvêa, V. N., Agostinho Neto, L. R. D., Da Silva, S. C., Brink, G. E., Pires, A. V., & Santos, F. A., 2020. Beef cattle responses to pre-grazing sward height and low level of energy supplementation on tropical pastures. *Journal of Animal Science*, 98, skaa163.
- Ferreira Costa, C. T., de Andrade Ferreira, M., de Souza Campos, J. M., de Lima Silva, J., Xavier de Andrade, R. D. P., & Gabriela da Conceição, M., 2017. Multiple supplements containing spineless cactus enriched with urea for cattle. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, 39, 363-369.
- Granja-Salcedo, Y. T., Ribeiro Junior, C. S., de Jesus, R. B., Gomez-Insuasti, A. S., Rivera, A. R., Messana, J. D., & Berchielli, T. T., 2016. Effect of different levels of concentrate on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nelore steers. *Archives of Animal Nutrition*, 70, 17-32.
- Jose Neto, A., Granja-Salcedo, Y. T., Messana, J. D., Malheiros, E. B., Reis, R. A., Pires, A. V., & Berchielli, T. T., 2019. Soybean hulls as feed substitute of ground corn can increase the fiber digestibility and bacterial fibrolytic profile of grazing Nelore steers during the rainy season. *Semina: Ciências Agrárias*, 40, 3577-3594.
- Mariz, L. D. S., Amaral, P. M., Valadares Filho, S. C., Santos, S. A., Detmann, E., Marcondes, M. I., & Faciola, A. P., 2018. Dietary protein reduction on microbial protein, amino acid digestibility, and body retention in beef cattle: 2. Amino acid intestinal absorption and their efficiency for whole-body deposition. *Journal of Animal Science*, 96, 670-683.
- Meschiatti, M. A., Gouvêa, V. N., Pellarin, L. A., Batalha, C. D., Biehl, M. V., Acedo, T. S., & Santos, F. A., 2019. Feeding the combination of essential oils and exogenous α -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, 97, 456-471.

- Lana Ferreira, M. F., Rennó, L. N., Detmann, E., Paulino, M. F., de Campos Valadares Filho, S., Moreira, S. S., & de Paula Cidrine, I., 2020. Performance, metabolic and hormonal responses of grazing Nellore cows to an energy-protein supplementation during the pre-partum phase. *BMC Veterinary Research*, 16, 1-13.
- Sathler, D. F. T., Prados, L. F., Zanetti, D., Silva, B. C., Filho, S. V., Pacheco, M. V. C., & Paulino, M. F., 2017. Reducing mineral usage in feedlot diets for Nellore cattle: I. Impacts of calcium, phosphorus, copper, manganese, and zinc contents on microbial efficiency and ruminal, intestinal, and total digestibility of dietary constituents. *Journal of Animal Science*, 95, 1715-1726.
- Batalha, C. D. A., Morelli, M., Branco, R. H., dos Santos Goncalves Cyrillo, J. N., Carrilho Canesin, R., Zerlotti Mercadante, M. E., & Figueiredo Martins Bonilha, S., 2020. Association between residual feed intake, digestion, ingestive behavior, enteric methane emission and nitrogen metabolism in Nellore beef cattle. *Animal Science Journal*, 91, e13455.
- da Silva, A. G., Paulino, M. F., Detmann, E., Fernandes, H. J., da Silva Amorim, L., Ortega, R. E. M., & Bitencourt, J. A., 2017. Energetic-protein supplementation in the last 60 days of gestation improves performance of beef cows grazing tropical pastures. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 1-9.
- Toseti, L. B., Goulart, R. S., Gouvêa, V. N., Acedo, T. S., Vasconcellos, G. S., Pires, A. V., & Silva, S. L., 2020. Effects of a blend of essential oils and exogenous α -amylase in diets containing different roughage sources for finishing beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 269, 114643.
- Godoi, L. A., Silva, B. C., Silva, F. A. S., Pucetti, P., Pacheco, M. V. C., Souza, G. A. P., & Valadares Filho, S. C., 2021. Effect of flint corn processing methods on intake, digestion sites, rumen pH, and ruminal kinetics in finishing Nellore bulls. *Animal Feed Science and Technology*, 271, 114775.
- Silva, B. D. C., Pacheco, M. V. C., Godoi, L. A., Alhadas, H. M., Pereira, J. M. V., Renno, L. N., & Valadares Filho, S. D. C., 2020. Reconstituted and ensiled corn or sorghum grain: Impacts on dietary nitrogen fractions, intake, and digestion sites in young Nellore bulls. *Plos one*, 15(8), e0237381.
- Silva, Y. R. V. B., Zervoudakis, J. T., Hatamoto-Zervoudakis, L. K., Abreu, M. L. C., da Silva Cabral, L., da Freiria, L. B., & Possamai, A. J., 2021. Supplementation with different protein profiles for grazing beef cattle supplemented in tropical grass during the rainy-dry transition season. *Tropical Animal Health and Production*, 53, 1-10.
- Tseu, R. J., Perna Junior, F., Carvalho, R. F., Sene, G. A., Tropaldi, C. B., Peres, A. H., & Rodrigues, P. H. M., 2020. Effect of tannins and monensin on feeding behaviour, feed intake, digestive parameters and microbial efficiency of nellore cows. *Italian Journal of Animal Science*, 19, 262-273.