

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos

Ana Luiza Schaefer Bitarães de Miranda

Pelotas, 2024

Ana Luiza Schaefer Bitarães de Miranda

Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Nutrição de Ruminantes).

Orientadora: Profa. Dra. Carla Joice Härter

Co-orientador: Prof. Dr. Gilberto V. Kozloski

Co-orientador: Dra. Maria Patrícia Mezzomo

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M672a Miranda, Ana Luiza Schaefer Bitarães de

Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos [recurso eletrônico] / Ana Luiza Schaefer Bitarães de Miranda ; Carla Joice Härter, orientadora ; Gilberto Vilma Kozloski, Mariana Patricia Mezzomo, coorientadores. — Pelotas, 2024.

60 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Derivados de purinas. 2. Purinas. 3. ¹⁵N. 4. Ruminantes. I. Härter, Carla Joice, orient. II. Kozloski, Gilberto Vilma, coorient. III. Mezzomo, Mariana Patricia, coorient. IV. Título.

CDD 636.3084

Ana Luiza Schaefer Bitarães de Miranda

Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/08/2024

Banca examinadora:

.....
Prof. Dra. Carla Joice Härter. (Orientador)
Doutora em Zootecnia. pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal

.....
Prof. Dr Pablo de Souza Castagnino
Doutor em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal

.....
Prof. Dra. Anaiane Pereira Souza
Doutor em Zootecnia pela Universidade . Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Jaboticabal

.....
Prof. Dr. Cássio Brauner Cassal
Doutor em Zootecnia. pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais e avó Nadyr (*in memoriam*)

Agradecimentos

A Deus por me proporcionar e abençoar todos os dias pela dádiva da vida.

Aos meus pais, Sergio e Doris pelo apoio incondicional e compreensão pela minha ausência. Aos meus avós Genesio (*in memoriam*), Maria José, Maria (*in memoriam*), Nadyr (*in memoriam*) e Harben (*in memoriam*), agradeço pelo tempo que passamos juntos nessa jornada e agradeço por me ensinarem a valorizar os estudos.

À minha orientadora Carla, pela confiança, apoio, amizade, conselhos e me proporcionar essa oportunidade de grande aprendizado.

Ao Prof Gilberto, por aceitar me co-orientar, auxiliar na condução do experimento e disponibilidade.

À Mariana, por aceitar me co-orientar, pela amizade, “puxões de orelha” e conselhos.

Ao Mauro Emílio, pelo auxílio nos experimentos, amizade e conversas.

Aos técnicos do LABRUMEN, Clóvis Senger, Gisele Lutz e Susanne Druzian, por me auxiliarem a realizar minhas análises. Aos estagiários do LABRUMEN, que participaram tanto das análises quanto do experimento. Aos pós graduandos da UFSM: Aline, Duda, Lauren e Sofia.

Ao Prof. Tiago Del Valle, por estar sempre disponível para solucionar meus questionamentos.

À amiga Cecilia, que tornou a minha jornada mais leve, obrigada por seus conselhos e risadas.

Aos meus amigos que, mesmo à distância, me incentivavam: Tom, Justino, Marina, Pri, Bruna, Amanda e Carlos.

Aos meus orientadores da graduação, que se tornaram meus amigos: João Carlos de Carvalho Almeida e Mauro Portela Piña Rodrigues

À Prof Leila Piccoli e ao técnico Silvino, por disponibilizarem as instalações da Piscicultura a fim de realizar minhas análises.

Aos meus colegas do PPGZ, em especial as que se tornaram amigas: Adriana e Bianca.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo financiamento do experimento conduzido.

“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo”.

Provérbio africano

Resumo

MIRANDA, Ana Luiza Schaefer Bitarões de. **Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos** 2024. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

O presente estudo teve como objetivo analisar a relação entre marcadores de proteína microbiana (Pmic) e a influência de diferentes fontes de proteína na dieta na estimativa da proteína metabolizável disponível para ovinos. Cinco cordeiros machos castrados da raça Corriedale x Suffolk (de 35 ± 5 kg de peso vivo), implantados cirurgicamente com sondas ruminais e cânulas do tipo "T" no duodeno proximal, foram usados em um delineamento em duplo Quadrado Latino 3×3 incompleto, com um período adicional. As dietas experimentais foram isoproteicas e formuladas com 60% de volumoso e 40% de concentrado, base matéria seca (MS). Como volumoso foi utilizada a silagem de milho e para formulação dos concentrados foram utilizados milho moído, núcleo mineral, sal comum e uma das seguintes fontes proteicas: resíduo seco de destilaria com solúveis (DDG), farelo de soja (FS) ou torta de soja (TS). Os marcadores avaliados foram: derivados de purina, purinas e ^{15}N . As dietas avaliadas no presente estudo não afetaram o fluxo de matéria seca (FMS; $P = 0,58$). O FMS a partir do rúmen esteve diretamente associado ao consumo de MS dos animais (CONSMS) ($P = 0.039$). A influência de marcadores é observada apenas nos tratamentos utilizando FS e TS. Isso sugere que, em situações de baixa degradabilidade ruminal, como observado com o uso de DDGs, a Pmic é estimada de maneira consistente utilizando os diferentes marcadores. No entanto, em cenários onde há maior degradabilidade ruminal, a escolha do método de estimativa da Pmic exerce um impacto significativo, resultando em diferenças nas estimativas fornecidas pelos marcadores utilizados.

Palavras-chave: derivados de purina; ^{15}N ; purinas; ruminantes.

Abstract

MIRANDA, Ana Luiza Schaefer Bitarões de. **Avaliação de marcadores de proteína microbiana ruminal e sua relação com diferentes fontes proteicas na estimativa da oferta de proteína metabolizável em ovinos** 2024. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

The present study aimed to analyze the relationship between microbial protein markers (Pmic) and the influence of different protein sources in the diet on the estimation of metabolizable protein available for sheep. Five castrated male lambs of the Corriedale x Suffolk breed (35 ± 5 kg of live weight), surgically implanted with ruminal probes and "T" type cannulas in the proximal duodenum, were used in an incomplete 3×3 double Latin square design, with an additional period. The experimental diets were isoproteic and formulated with 60% forage and 40% concentrate on a dry matter (DM) basis. Corn silage was used as the forage, and the concentrates were formulated with ground corn, mineral premix, common salt, and one of the following protein sources: dried distillers' grains with solubles (DDG), soybean meal (SBM), or soybean cake (SC). The markers evaluated were purine derivatives, purines, and ^{15}N . The diets evaluated in the present study did not affect the dry matter flow (DMF; $P = 0.58$). The DMF from the rumen was directly associated with the animals' DM intake (DMI) ($P = 0.039$). The influence of markers was observed only in treatments using SBM and SC. This suggests that, in situations of low ruminal degradability, as observed with the use of DDGs, Pmic is consistently estimated using the different markers. However, in scenarios with greater ruminal degradability, the choice of the Pmic estimation method has a significant impact, resulting in differences in the estimates provided by the markers used.

Keywords: purine derivatives; ^{15}N ; purines; ruminants.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Vias de catabolismo de purinas em ruminantes.....	25
Figura 2 - Representação esquemática do princípio do método dos derivados de purina para estimativa da produção microbiana em ruminantes.....	27
Figura 3 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de purinas em ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....	46
Figura 4 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de derivados de purinas em ovinos que consumiram farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....	46
Figura 5 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de 15N em ovinos que consumiram farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....	47
Figura 6 - Efeito dos tratamentos sobre as diferentes metodologias em ovinos que consumiram uma dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado contendo farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs).....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição química dos alimentos.....	32
Tabela 2 - Participação dos ingredientes nas dietas experimentais.....	32
Tabela 3 - Diferentes variáveis que compuseram os cálculos para a estimativa de cada metodologia utilizando ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....	45
Tabela 4 - Estimativa da síntese de proteína microbiana utilizando ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs).....	46
Tabela 5 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados em ovinos alimentados com FS, TS e DDG.....	48
Tabela 6 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados e comparação entre os métodos utilizados.....	48
Tabela 7 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados.....	49

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....	14
2.1 Nutrição proteica de ruminantes.....	14
2.2 Metabolismo de proteína no rúmen.....	14
2.2.1 Fatores que afetam a degradação de proteína no rúmen.....	16
2.2.2 Valor nutricional da proteína microbiana.....	17
2.2.3 Estimativa da proteína metabolizável.....	18
2.3 Fatores que acabam limitando a síntese microbiana.....	18
2.4 Utilização de marcadores na nutrição de ruminantes.....	19
2.5 Técnicas para a estimativa de produção microbiana ruminal.....	20
2.5.1 ¹⁵ N.....	20
2.5.2 Ácido diaminopimélico (DAPA).....	21
2.5.3 Bases de Purinas.....	22
2.5.4 Derivados de purinas.....	25
3 HIPÓTESES.....	28
4 OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1 Local e época.....	30
5.2 Animais, dietas e delineamento experimental.....	30
5.3 Condução do experimento.....	32
5.3.1 Coleta de urina e líquido ruminal.....	33
5.3.2 Análises químico – bromatológicas.....	34
5.3.3 Determinação de purinas.....	35
5.3.4 Determinação de Purinas nas bactérias mistas.....	36
5.3.5 Determinação de derivados de purinas.....	37
5.3.6 Determinação de ¹⁵ N.....	38
5.3.7 Tratamento das amostras de digesta duodenal.....	39
5.3.8 Tratamento das amostras de líquido ruminal para a determinação de purinas.....	39

5.3.9 Determinação de FDNi.....	40
5.3.10 Cálculos realizados para a estimativa de cada metodologia.....	41
5.4 Análise estatística.....	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 Composição da dieta em relação aos cálculos.....	44
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As necessidades nutricionais proteicas dos ruminantes são supridas pela absorção intestinal de aminoácidos e peptídeos, sendo a proteína microbiana (Pmic) sintetizada no rúmen a principal fonte desse nutriente. Nesse contexto, compreender a eficiência da síntese de proteína microbiana é essencial para a formulação de dietas mais precisas e sem desperdícios, promovendo, assim, maior economia na produção animal (BR caprinos e ovinos, 2024).

A proteína de origem microbiana é sintetizada a partir da utilização de proteínas e carboidratos provenientes da dieta, os quais são empregados no crescimento e na reprodução dos microrganismos. Durante a transição do conteúdo ruminal para o abomaso, ocorre a lise celular do pool microbiano, permitindo que a digestão das proteínas microbianas seja realizada no duodeno. Esse processo resulta na liberação de aminoácidos e peptídeos, que são posteriormente absorvidos pelo intestino (BR caprinos e ovinos, 2024).

Os aminoácidos absorvidos pelos ruminantes são utilizados em suas funções fisiológicas de manutenção e produção, em conjunto com a proteína dietética que não foi degradada no rúmen. Dessa forma, é formada a proteína metabolizável (PM). A fração de proteína microbiana que atinge o intestino delgado para ser absorvida é denominada proteína degradável no rúmen (PDR), enquanto a porção da proteína dietética que escapa à degradação microbiana no rúmen é classificada como proteína não degradável no rúmen (PNDR) (BR caprinos e ovinos, 2024).

Para converter as exigências de proteína metabolizável (PM) em proteína bruta (PB) dietética, é fundamental conhecer a quantidade de proteína microbiana (Pmic) que pode ser sintetizada a partir de uma determinada dieta (BR caprinos e ovinos, 2024).

A avaliação da contribuição da proteína microbiana representa um elemento

significativo no âmbito da investigação da nutrição proteica em ruminantes, em virtude de sua elevada qualidade biológica e capacidade de suprir de 50 a 100% da exigência de proteína metabolizável dos bovinos (NRC, 1996). O NRC (1996) fundamenta a produção de proteína microbiana com base nos nutrientes digestíveis totais, ao passo que o ARC (1984) a relacionava à matéria orgânica degradada no rúmen e, posteriormente, o AFRC (1993) considera a eficiência em relação à energia metabolizável fermentável no rúmen. Por sua vez, o sistema Cornell (CNCPS), delineado por Russel *et al.* (1992), quantifica a eficiência de síntese proteica em gramas de matéria seca bacteriana por grama de carboidratos totais degradados no rúmen.

Vários marcadores microbianos têm sido propostos para medir a produção de proteína microbiana no rúmen, incluindo ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), ácido ribonucleico (RNA) e derivados de purina (Broderick; Merchen, 1992; Chen; Gomes, 1992). Além disso, métodos de predição da quantidade de compostos nitrogenados microbianos também utilizam indicadores internos, como purinas (adenina e guanina) e DAPA, bem como indicadores externos, como isótopos de nitrogênio (^{15}N) e enxofre (S^{35}) (Broderick; Merchen, 1992; Chizzotti *et al.*, 2005).

No entanto, a precisão desses marcadores pode ser influenciada por fatores como a dieta dos animais, a espécie a que pertencem e o metabolismo dos microrganismos (Obispo; Dehority, 1999; Firkins *et al.*, 2006). Adicionalmente, o uso de marcadores externos requer a utilização de animais fistulados para determinar o fluxo de matéria seca no duodeno.

Investigar a relação entre marcadores de proteína microbiana e diferentes fontes de proteína pode oferecer informações valiosas para a estimativa da proteína metabolizável, e, conseqüentemente, o desenvolvimento de dietas mais eficientes e balanceadas para ovinos. Isso se deve ao fato de que a proteína microbiana é considerada uma fonte de alta qualidade, especialmente em termos de composição de aminoácidos, quando comparada à proteína que não é degradada no rúmen (PNDR).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo analisar a relação entre marcadores de proteína microbiana e avaliar a influência desses diferentes fontes de proteína na dieta na estimativa da proteína metabolizável disponível para ovinos.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Nutrição proteica de ruminantes

Proteínas são compostos orgânicos formados basicamente por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, subdivididos em unidades básicas denominadas aminoácidos. Essas macromoléculas representam um dos principais nutrientes constituintes da dieta animal, tanto pelo seu valor econômico, quanto pelas funções desempenhadas, como formação de substâncias moleculares, composição de estruturas e órgãos, oxidação para a liberação de energia, entre outras (Araújo; Zanetti, 2016).

A proteína disponível para a absorção no intestino delgado é o resultado dos produtos finais do processo digestivo que envolve o rúmen, retículo, omaso e principalmente o abomaso que faz a digestão ácida e quebra das proteínas até aminoácidos que são absorvidos no intestino delgado. As fontes de proteína que chegam ao intestino delgado são de origem microbiana, proteína dietética que não foi degradada no rúmen e proteínas de descamações endógenas, sendo conhecida também como proteína metabolizável (BR-CORTE, 2020).

2.2 Metabolismo de proteína no rúmen

A proteína bruta dos alimentos é digerida nos ruminantes diferentemente dos monogástricos, há duas frações de digestão. Essas são divididas em proteínas degradadas no rúmen (PDR) e proteínas não degradadas no rúmen (PNDR). A digestão das proteínas ocorre pela ação de enzimas (proteases, peptidases e deaminases) que quebram essas proteínas em peptídeos, aminoácidos e amônia. Os microrganismos que degradam a fração PDR da PB do alimento utilizam peptídeos, aminoácidos e

amônia para a síntese de proteína microbiana e multiplicação celular. Peptídeos e aminoácidos provenientes da degradação ruminal da proteína que não são incorporadas pelo ruminante.

O rúmen possui uma microbiota composta por bactérias, fungos, protozoários, vírus e archeas. Com uma grande contribuição, as bactérias representam 88 a 80,2% de MO das bactérias sólido-aderidas e líquido-associadas, respectivamente (Olubobokum *et al.* 1988) na porção total ruminal e são as principais responsáveis pela degradação da proteína através da atividade das suas proteases. Ao adentrar no rúmen, há a identificação do substrato pelos microrganismos e há a adsorção das bactérias que fazem um biofilme para a quebra das estruturas. Como resultado, há a formação de oligopeptídeos, que irão sofrer a ação de oligopeptidases a pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Estes são transportados para o interior da célula das bactérias onde sofre a degradação dos peptídeos a aminoácidos livres, incorporação dos aminoácidos livres na proteína microbiana através da multiplicação celular, deaminação dos aminoácidos livres em amônia e esqueleto de carbono e a utilização da amônia para a síntese de aminoácidos ou difusão da amônia não utilizada (Berchielli, 2011).

Os protozoários são menos numerosos se comparados com as bactérias e participam da degradação ruminal. Possuem maior tamanho em relação às bactérias e fungos. Seu mecanismo de degradação se dá pela ingestão de pequenas partículas de alimento, fungos e principalmente pelo engolfamento de bactérias, realizam digestão da proteína até aminoácidos. Os protozoários não são capazes de utilizar a amônia para sintetizar aminoácidos e não contribuem significativamente para com o fluxo de proteína microbiana para o intestino, devido ao seu maior tamanho e menor passagem (Berchielli, 2011).

Os fungos ruminais desempenham um papel importante na digestão e no ecossistema do trato digestório dos ruminantes, graças às suas características enzimáticas, fisiológicas e metabólicas (Kamra, 2005). Eles são encontrados em amostras de ruminantes, pequenos ruminantes e equinos. Em ovinos, esses microrganismos estão presentes no rúmen desde as primeiras semanas de vida até o final da vida dos animais (Fonty; Gouet, 1994). A população de fungos ruminais é mais densa em animais adultos e naqueles que consomem dietas ricas em fibras vegetais. Por outro lado, dietas com alta concentração de açúcares ou com níveis muito baixos deles não são favoráveis ao crescimento desses fungos (Grenet *et al.*, 1989).

O nitrogênio que adentra no abomaso e o duodeno, é composto por proporções variáveis de PNDR e proteína presente nas células bacterianas, juntamente com quantidades menores de nitrogênio endógeno (Kozloski, 2002). Nesse sentido, a quantidade de aminoácidos disponíveis para absorção no intestino delgado, denominada de proteína metabolizável (PM), é resultante da digestão enzimática dessas frações. Estima-se que aproximadamente 80% da proteína microbiana é representada pela proteína verdadeira, sendo 80% digestível (NRC, 2000; NRC, 2001; Kozloski, 2002). A digestibilidade da PNDR pode variar, com uma média assumida de 80% (NRC, 2000). A proteína microbiana é a principal fonte de PM dos ruminantes. Em ovinos a proteína microbiana pode representar de 50 a 80% da PM intestinal. Portanto, todo programa nutricional só terá sucesso se a produção de proteína microbiana for otimizada (Berchielli, 2011). Aproximadamente de 50 a 80% da PM total presente no intestino delgado é proveniente da digestão das células bacterianas (Bach *et al.*, 2005).

2.2.1 Fatores que afetam a degradação de proteína no rúmen

Os fatores que afetam a degradação da proteína são diversos e estes muitas vezes são intimamente ligados. Dentre estes podemos citar: a variação da composição química e física da proteína do alimento, o tempo em que o alimento permanece no rúmen, o pH ruminal e o tipo de processamento do alimento. As proporções de proteína verdadeira e de nitrogênio não proteico (NNP) presentes no alimento tem forte influência na degradação da proteína, sendo o NNP degradado mais rapidamente e totalmente no rúmen (Berchielli, 2011).

O tipo de processamento ao qual o ingrediente é submetido pode aumentar ou diminuir a sua degradabilidade. Se esse for submetido a altas temperaturas, pode diminuir a sua degradabilidade devido a formação de complexos entre as proteínas e carboidratos ou mesmo a formação de pontes de dissulfeto. Entretanto, o processamento de ingredientes em temperatura e tempo adequados podem aumentar a quantidade de PNDR da dieta sem que haja um prejuízo na digestibilidade do alimento (Berchielli, 2011).

2.2.2 Valor nutricional da proteína microbiana

Com relação à nutrição proteica, a exigência metabólica do ruminante é por aminoácidos. Suas células necessitam de aminoácidos para seu metabolismo. O valor nutricional da proteína microbiana para os ruminantes depende majoritariamente do seu perfil em aminoácidos essenciais.

A proteína microbiana é uma fonte de nutrição de altíssima qualidade para os ruminantes, desempenha um papel essencial na alimentação desses animais. No rúmen, um processo eficiente transforma compostos nitrogenados não proteicos e carboidratos fermentáveis em proteína de alta qualidade, que depois é disponibilizada no intestino delgado após a digestão.

Essa proteína é rica em aminoácidos essenciais, tornando-a comparável às melhores proteínas de origem animal e vegetal. Clark *et al.* (1992) demonstraram que a proteína microbiana atende de 50% a 80% das necessidades proteicas dos ruminantes.

A produção eficiente dessa proteína depende de fatores como a dieta, a velocidade com que o alimento passa pelo rúmen e a disponibilidade de energia e nitrogênio. Segundo Firkins *et al.* (2007), dietas ricas em carboidratos solúveis e bem balanceadas em energia e proteína favorecem uma produção mais eficiente de proteína microbiana.

Portanto, a proteína microbiana é crucial não só para suprir as necessidades nutricionais dos ruminantes, mas também como uma forma sustentável de otimizar o uso dos recursos alimentares disponíveis (Bach *et al.*, 2005).

A proteína microbiana em ruminantes, possui um perfil de aminoácidos bastante equilibrado, tornando-a uma excelente fonte de proteína para esses animais. Como valores médios dos aminoácidos: lisina: 7-9%; metionina: 2-3%; treonina: 5-6%; valina: 5-6%; isoleucina: 4-5%; leucina: 7-8%; fenilalanina: 4-5%; histidina: 2-3% e arginina: 5-6% (NRC, 2016). Esses percentuais podem mudar dependendo da alimentação do animal e das condições do rúmen. A proteína microbiana é tão boa quanto as melhores proteínas de origem animal e vegetal, pois oferece uma proporção equilibrada de aminoácidos essenciais, que são fundamentais para a síntese de proteínas nos ruminantes.

A célula microbiana é constituída principalmente de proteínas, mas também de carboidratos, lipídeos, minerais e vitaminas. O modelo de Cornell (CNCPS) assume

que apenas bactérias compõem a massa microbiana que passa para o intestino e que essas contém 62,5% de PB, 21% de carboidratos, 12% de lipídeos e 4,4% de cinzas. O modelo assume também que a proteína microbiana é composta de 60% de proteína verdadeira disponível, 25% de proteína da parede celular não disponível e 15% de ácidos nucleicos.

Em sua totalidade, os sistemas proteicos adotados, na sua maioria, assume que a célula microbiana produzida no rúmen possui uma composição constante, tanto para o teor de proteína bruta, quanto a sua composição (Berchielli, 2011).

2.2.3 Estimativa da proteína metabolizável

Denomina-se a proteína metabolizável o conjunto de todos os aminoácidos que estão disponíveis para a digestão e posterior absorção intestinal (BR- CORTE, 2020)

A mensuração dos valores das exigências nutricionais de proteína metabolizável e proteína bruta segue-se a premissa de que se saiba as modificações as quais o rúmen realiza nos compostos nitrogenados da dieta. A mensuração da proteína microbiana que é produzida no rúmen é necessária para que se possa saber os fatores que afetam a sua eficiência de produção dessa proteína, assim como a sua digestão, absorção no trato gastrointestinal (BR-CORTE, 2020).

2.3 Fatores que acabam limitando a síntese microbiana

A síntese microbiana no rúmen é um processo vital para a nutrição dos ruminantes, pois fornece uma fonte importante de proteína de alta qualidade. No entanto, esse processo pode ser afetado por diversos fatores que influenciam a eficiência da fermentação e a produção de proteína microbiana no rúmen.

Para que ocorra o crescimento de microrganismos no rúmen é necessário energia, vem principalmente de carboidratos fermentáveis. Quando há falta desses carboidratos, a produção de ácidos graxos voláteis pode ser limitada. Hall et al.,2010, mostram que a falta de carboidratos rapidamente fermentáveis podem reduzir a eficiência na produção de proteína microbiana.

O crescimento dos microrganismos depende também da disponibilidade de nitrogênio, que pode ser fornecido na forma de amônia, aminoácidos e peptídeos. Se o suprimento de nitrogênio for inadequado, especialmente para bactérias que

decompõem fibras, isso pode limitar o crescimento microbiano (Bryant; Robinson, 1962). Para a atividade microbiana ideal, é essencial que o pH do ruminal esteja em níveis neutros a ligeiramente ácidos (entre 6,0 e 7,0). Se o pH variar muito, como no caso da acidose ruminal, isso pode prejudicar a fermentação de fibras e a atividade dos microrganismos (Owens *et al.*, 1998).

A cinética do conteúdo ruminal pode afetar a retenção de microrganismos. Se o conteúdo passar muito rapidamente, o tempo disponível para a fermentação e a síntese de proteína microbiana pode ser reduzido (Dewhurst *et al.*, 2000). Minerais como enxofre, fósforo e magnésio são vitais para várias funções metabólicas dos microrganismos. A falta desses minerais pode limitar a síntese microbiana (Satter; Slyter, 1974).

2.4 Utilização de marcadores na nutrição de ruminantes

Marcadores são substâncias não digeríveis, geralmente de fácil identificação, que podem ser incluídas na alimentação ou administradas em algum ponto do trato digestório e, posteriormente, detectadas e quantificadas nas fezes ou no final do segmento em análise (Warner, 1981). A utilização de marcadores é de suma importância em pesquisas de nutrição animal, pois permite a estimativa de parâmetros como produção fecal, coeficiente de digestibilidade, consumo de alimentos e fluxo de nutrientes ao longo do trato gastrointestinal dos animais, os quais, em algumas circunstâncias, não podem ser facilmente obtidos devido à impossibilidade de manipulação constante dos animais.

Owens e Hanson (1982) e Faichney (1975) propõem que um marcador ideal apresente as seguintes características: não ser absorvido; não influenciar ou ser influenciado pelo trato gastrointestinal ou pela microbiota; fluir de forma paralela, ser fisicamente semelhante ou intimamente ligado ao material a ser marcado; e possuir um método de estimação específico e sensível.

Considerando que a digesta pode ser segmentada em duas fases distintas, é aconselhável a utilização de um marcador para cada fase, uma vez que essas fases não apresentam a mesma proporção de digesta duodenal (Waller *et al.*, 1980). Os líquidos passam pelo rúmen de forma mais rápida do que as partículas pequenas, e as partículas pequenas e densas movem-se pelo rúmen de maneira mais acelerada do que as partículas grandes. Não há um único marcador que atenda a todos esses

critérios (Merchen, 1993), porém o nível aceitável de erro varia de acordo com a variável em questão (Owens; Hanson, 1992).

Os marcadores podem ser categorizados como internos que são substâncias não digeríveis naturalmente presentes em algum componente da dieta, como por exemplo lignina, FDN, ou externos, quando são adicionados à alimentação dos animais por via oral ou ruminal (Makkar; Becker, 1998).

Os marcadores externos são amplamente empregados em estudos de nutrição de ruminantes, tanto para avaliar o fluxo e a excreção fecal quanto para estimar a digestibilidade das dietas. Entre esses marcadores, incluem-se compostos de metais trivalentes, como cromo, titânio e cobalto (Marais, 2000).

2.5 Técnicas para a estimativa de produção microbiana ruminal

2.5.1 ^{15}N

O ^{15}N é amplamente utilizado como um marcador para medir a produção microbiana devido à sua estabilidade e ao baixo risco de causar contaminação ambiental. Além de ser mais econômico em comparação aos demais marcadores, ele pode ser facilmente incorporado em compostos nitrogenados, como amônia ou ureia. Uma característica importante do ^{15}N é que ele consegue identificar diferentes grupos de nitrogênio microbiano. Isso acontece porque ele não está presente naturalmente nas proteínas dos alimentos e só se integra à proteína do animal quando os aminoácidos microbianos são absorvidos pelos tecidos do animal (Broderick; Merchen, 1992).

Na prática, o ^{15}N é adicionado a fontes de nitrogênio na dieta, como proteínas ou aminoácidos, que são dadas aos animais. A partir daí, os pesquisadores monitoram a presença do ^{15}N nas excreções (urina e fezes), no leite e nos tecidos corporais. Esse rastreamento permite que eles compreendam como o nitrogênio é metabolizado no organismo, oferecendo uma visão detalhada do funcionamento do metabolismo do nitrogênio nos animais.

Para fornecer ao animal, é realizada uma infusão gradual de sais de sulfato de amônio marcado ($^{15}\text{NH}_4$)₂SO₄ diretamente no rúmen. Esse processo permite que os microrganismos presentes no rúmen sintetizem aminoácidos microbianos, utilizando o $^{15}\text{NH}_3$ como precursor. Como resultado, o isótopo se torna um componente da

proteína microbiana. De acordo com Broderick e Merchen (1992), é recomendável realizar uma infusão contínua no rúmen com sulfato de amônio marcado ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ durante um período de 48 horas. Em seguida, é realizada uma análise para estimar o teor de ^{15}N utilizando o método de Siddons *et al.* (1985).

A metodologia desenvolvida por Siddons *et al.* (1985) é uma técnica laboratorial que ajuda a medir o nível de ^{15}N em amostras biológicas, permitindo entender melhor como o nitrogênio é processado. Primeiro, coleta-se as amostras biológicas, como fezes, urina, leite ou tecidos, de animais que consumiram dietas com compostos marcados com ^{15}N .

Depois de coletadas, as amostras são secas e, se necessário, moídas para garantir que fiquem bem homogêneas. Isso é importante para garantir que as medições sejam precisas. Após a homogeneização, as amostras passam por um processo de digestão, geralmente usando ácidos fortes como o ácido sulfúrico, para transformar todo o nitrogênio presente em uma forma que possa ser medida como por exemplo, a amônia.

A amônia liberada durante o processo de digestão é destilada e capturada em uma solução ácida, preparando-a para a análise isotópica. A amônia capturada é convertida em um composto adequado para análise isotópica, como o nitrato, através de reações químicas adicionais.

A proporção entre ^{15}N e ^{14}N é medida com um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS), que permite detectar com precisão o enriquecimento de ^{15}N em comparação ao nitrogênio natural. Os dados obtidos do IRMS são usados para calcular o enriquecimento de ^{15}N nas amostras, comparando-os com padrões de referência conhecidos.

Finalmente, os resultados são analisados para entender a dinâmica do nitrogênio no organismo, como a eficiência no uso de nutrientes e a produção microbiana. Esse método é altamente valorizado por sua precisão e pela capacidade de oferecer insights detalhados sobre o metabolismo do nitrogênio em estudos nutricionais e fisiológicos.

2.5.2 Ácido diaminopimélico (DAPA)

O ácido diaminopimélico é um aminoácido que está presente na parede celular de várias bactérias ruminantes. O DAPA é um aminoácido que ocorre em concentrações

variadas nas células bacterianas. Segundo Hutton *et al.* (1971), a presença do DAPA nas células bacterianas e sua ausência em protozoários e plantas, determinaram seu uso como um indicador da presença de nitrogênio em ruminantes.

Broderick e Merchen (1992) discutiram o uso do DAPA como um marcador para estimar a síntese de proteína microbiana no rúmen. Eles destacam que o DAPA é um componente único da parede celular bacteriana e sua concentração varia entre diferentes espécies de bactérias ruminais. Essa abordagem é valiosa porque permite avaliar a contribuição das bactérias para a nutrição dos ruminantes, ajudando a entender melhor e a gerenciar a dieta desses animais para maximizar a produção de proteína.

Para determinar a presença de DAPA em ruminantes, é necessário coletar amostras do conteúdo do ruminal e analisá-las para medir a quantidade de DAPA. Esse processo geralmente envolve a extração de líquido ruminal e a aplicação de técnicas laboratoriais, como cromatografia ou espectrofotometria, que ajudam a identificar e medir a concentração de DAPA. Essa medição é fundamental para estimar a produção de proteína microbiana, já que o DAPA atua como um marcador específico das bactérias no rúmen, permitindo avaliar sua contribuição para a nutrição do animal (Broderick; Merchen 1992).

O método mais utilizado para mensurar o DAPA na digesta ruminal começa com a hidrólise da amostra, seguida pela separação dos aminoácidos através de cromatografia de troca iônica, e finaliza com uma reação usando ninhidrina. Por outro lado, o método proposto por Czerkawski em 1974 é uma alternativa mais acessível e menos cara para analisar o DAPA. Porém, esse método é bastante trabalhoso, exige muitas etapas no preparo das amostras e pode sofrer contaminação com o aminoácido prolina.

2.5.3 Bases de Purinas

As bases purinas são componentes dos ácidos nucleicos presentes no RNA e DNA de todos os organismos vivos. Os ruminantes podem consumir quantidades significativas de ácidos nucleicos provenientes da dieta, além dos sintetizados pela microbiota no rúmen. Conforme descrito por Chen e Orskov (2004), os pesquisadores McAllan e Smith na década de 70, conduziram estudos abrangentes sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos no intestino dos ruminantes (Figura 1).

Os estudos realizados por McAllan e Smith (1973) evidenciaram que as fontes exógenas de ácidos nucleicos foram totalmente degradadas no líquido ruminal. Essa constatação sugere que os ácidos nucleicos provenientes da dieta não contribuem de forma significativa para o conteúdo de ácidos nucleicos que deixam o rúmen, indicando que os ácidos nucleicos que alcançam o duodeno dos ruminantes são exclusivamente de origem microbiana. Os ácidos nucleicos provenientes da dieta e seus derivados são prontamente degradados no rúmen e não exercem uma contribuição relevante para o total de ácidos nucleicos que alcançam o duodeno (McAllan,1982). A utilização das bases de purina como marcador de síntese bacteriana fundamenta-se nesse princípio.

A estimativa da síntese microbiana por meio de purinas pode apresentar variações devido à proporção de bactérias associadas à fase sólida presente no rúmen (Carro, 2001). Conforme relatado por Merry e McAllan (1983), essa proporção está correlacionada com a dieta fornecida ao animal, podendo atingir até 90% em dietas compostas exclusivamente por forragens.

Segundo a metodologia de Makkar e Becker (1999), para a quantificação de purinas o primeiro passo envolve a extração de purinas das amostras, geralmente é feita utilizando soluções ácidas ou enzimáticas para liberar as purinas dos tecidos ou células. Posteriormente, as amostras são submetidas a hidrólise ácida para quebrar os ácidos nucleicos em nucleotídeos e, posteriormente, em bases purínicas livres.

Após a hidrólise, as purinas são separadas e quantificadas. Isso pode ser feito por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), técnicas cromatográficas ou espectrofotometria que permitam a separação e identificação precisa das bases purínicas, como adenina e guanina.

Makkar e Becker (1999) propõem ajustes ao método proposto por Zinn e Owens (1986), levantando a possibilidade de que alimentos não digeridos no ambiente ruminal possam introduzir imprecisões na determinação de purinas. No entanto, os autores afirmam a confiabilidade do método na quantificação de purinas após a conversão dos valores de absorvância em proteína microbiana. Broderick e Mercken (1992) ressaltam a inexistência de um marcador completamente adequado, e as estimativas obtidas são relativas e não absolutas. Entretanto, os autores apontam as purinas totais como um marcador robusto da atividade microbiana.

A principal restrição na estimativa da proteína microbiana no duodeno consiste na necessidade de coletar amostras de digesta ruminal e isolar as bactérias para

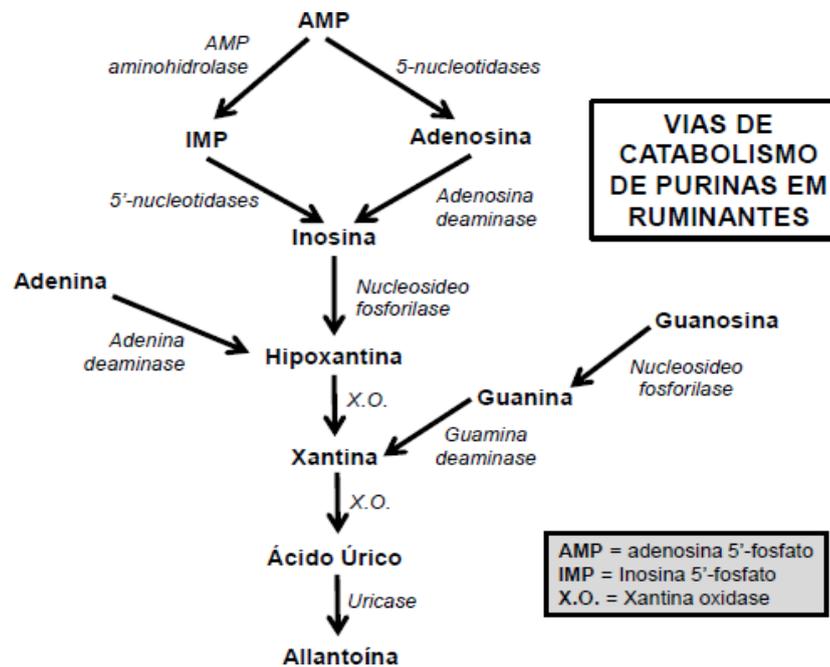
estabelecer um padrão bacteriano, sendo essencial que essa amostra seja representativa da população bacteriana total.

No ambiente ruminal, diversas cepas bacterianas em diferentes fases de crescimento, bem como protozoários e outras espécies de microrganismos, estão presentes. A complexidade da amostragem decorre da exigência de proporções semelhantes entre essas espécies e os diversos estágios de crescimento (Obispo; Dehority, 1999).

Em um estudo conduzido por Obispo e Dehority (1999), as concentrações de purinas em bactérias isoladas de amostras de digesta ruminal representaram aproximadamente um terço das quantidades encontradas em bactérias puras, sugerindo que as amostras bacterianas isoladas do conteúdo ruminal podem estar contaminadas, possivelmente com partículas muito pequenas da dieta. A utilização desses valores poderia resultar em uma subestimação da síntese de proteína microbiana. Outro aspecto relevante na tentativa de estimar a síntese de proteína microbiana é a medição do fluxo duodenal. A precisão da previsão da síntese microbiana utilizando purinas depende da estimativa precisa do fluxo de digesta.

Na estimativa do fluxo, o método mais frequentemente empregado consiste no uso de cânulas duodenais simples em forma de "T", que possibilitam a coleta pontual da digesta duodenal. Para determinar o volume total da digesta, é essencial utilizar um marcador de fluxo.

Figura 1 - Vias de catabolismo de purinas em ruminantes



Fonte: Adaptada de Chen e Gomes (1992)

2.5.4 Derivados de purinas

Os derivados de purina presentes na urina dos ruminantes desempenham um papel significativo como produtos finais do metabolismo de nitrogênio, sendo essenciais para estudos e para o estabelecimento de correlações entre a concentração de ácidos nucleicos no rúmen e a excreção de derivados de purina na urina dos ruminantes (Topps; Elliot, 1965). Com base na informação deste conceito, deu-se origem ao uso de derivados de purina na urina como método não invasivo para a estimativa do aporte de proteína microbiana no intestino dos ruminantes (Chen; Gomes, 1992).

A metodologia adota como premissa fundamental que os ácidos nucleicos que deixam o rúmen são predominantemente de origem microbiana (McAllan; Smith, 1973). Essa constatação decorre do fato de que os alimentos usualmente empregados na dieta dos ruminantes apresentam baixo teor de purinas, as quais são degradadas no rúmen como resultado da fermentação microbiana (McAllan; Smith, 1973). Os ácidos nucleicos de origem bacteriana que alcançam o intestino são majoritariamente digeridos e absorvidos no intestino delgado (Topps; Elliot, 1965).

Assim, a estimativa do fluxo de nitrogênio microbiano no intestino delgado pode ser realizada por meio da avaliação da excreção dos derivados de purina. A excreção

de derivados de purina está estreitamente relacionada e é proporcional à quantidade de purinas absorvidas no duodeno. Isso permite calcular a síntese de nitrogênio microbiano com base na quantidade de purinas absorvidas. A estimativa dessa absorção é feita através da excreção urinária de derivados de purina, conforme descrito por Chen e Gomes (1992).

No intestino delgado, os nucleotídeos das purinas são quebrados em componentes menores, como nucleosídeos (guanosina, adenosina e inosina) e bases livres (guanina e adenina). Esses componentes podem ser absorvidos pelo organismo no lúmen intestinal. No entanto, durante sua passagem pela mucosa intestinal, eles são intensamente degradados por enzimas específicas, como a guanina deaminase, adenosina deaminase e xantina oxidase (Chen; Gomes, 1992).

É importante mencionar que quando as purinas são degradadas, afeta sua disponibilidade metabólica para os animais (Stangassinger, 1995). Essa degradação acontece através de ações enzimáticas: a xantina oxidase transforma hipoxantina em xantina e depois em ácido úrico. O ácido úrico, por sua vez, é convertido em alantoína pela urease (Lehninger, 1995). Por ser uma metodologia indireta de estimativa da produção microbiana, é susceptível a uma série de fontes de variação (Chen *et al.*, 1990; Chen; Gomes, 1992; Tamminga; Chen, 2000; Tas; Susenbeth, 2007). Sendo fontes de variação: dieta, microbiota ruminal, eficiência na digestão, taxa de passagem ruminal, estado fisiológico e genética.

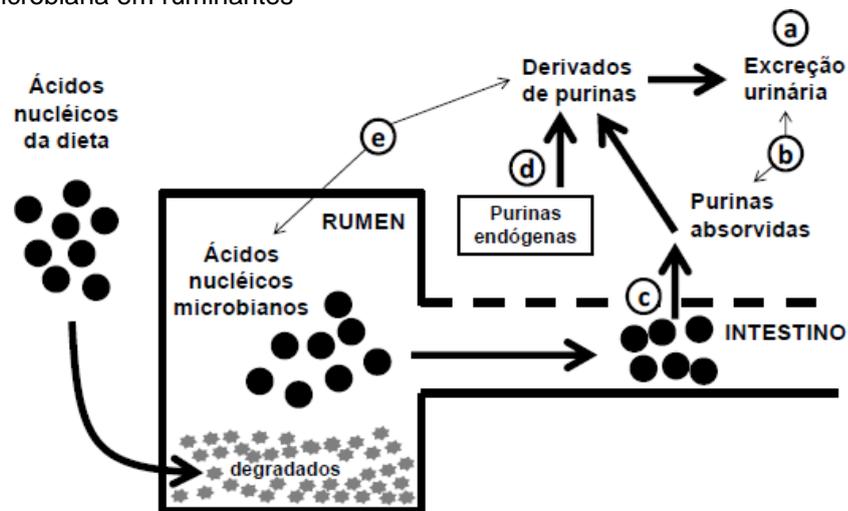
O conceito de derivado de purina foi introduzido pela primeira vez por Topps e Elliot (1965). Esses pesquisadores evidenciaram que a excreção de alantoína na urina está correlacionada com a concentração de ácidos nucleicos no rúmen. Além disso, os autores afirmaram que a presença de alantoína na urina poderia ser utilizada como um indicador para a produção de ácidos nucleicos no rúmen.

Ao longo dos anos, as pesquisas têm confirmado a relação entre a síntese de proteína microbiana e a excreção urinária de derivados de purina (Serrano *et al.*, 2011). Foi observada uma correlação positiva entre o fluxo de nitrogênio microbiano e a excreção urinária de derivados de purina em comparação com os métodos baseados em ácidos nucleicos microbianos (Puchala; Kulasek, 1992).

A estimativa da síntese microbiana por meio de derivados de purina tem apresentado uma forte correlação com as medidas de fluxo de purinas no duodeno (González-Ronquillo *et al.*, 2004; Rennó *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2013). Os autores também sugerem o uso de derivados para estimar a síntese de proteína microbiana,

porém observaram que o método das purinas geralmente apresenta coeficientes de determinação mais elevados e coeficientes de variação mais baixos em comparação com os derivados. Como representação gráfica desses fatores é apresentada na Figura 2, sendo eles: (a) coleta e amostragem, (b) recuperação urinária de purinas absorvidas, (c) digestão e absorção intestinal de purinas microbianas e (d) fração endógena de purinas na urina (BR-CORTE, 2020).

Figura 2 - Representação esquemática do princípio do método dos derivados de purina para estimativa da produção microbiana em ruminantes



Fonte: BR-CORTE (2020). Adaptada de Chen e Gomes (1992)

Os pontos mais discutíveis do método são: (a) coleta, amostragem e estimativa da produção urinária, (b) recuperação urinária de purinas absorvidas, (c) digestão e absorção intestinal de purinas microbianas e (d) fração endógena de purinas na urina. O ponto (e) representa um exemplo de aplicação para estimativa da produção microbiana a partir dos derivados de purina na urina.

3 HIPÓTESES

- A utilização de marcadores específicos de proteína microbiana pode melhorar a precisão da mensuração da síntese de proteína microbiana em ovinos quando são utilizadas diferentes fontes de proteína na dieta.
- A relação entre marcadores de proteína microbiana e fontes de proteína na dieta influencia diretamente a estimativa da quantidade de proteína metabolizável disponível para ovinos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Melhorar a compreensão da interação entre marcadores de proteína microbiana e fontes de proteína o que pode levar ao desenvolvimento de dietas mais balanceadas que atendam de forma mais eficaz às necessidades nutricionais dos ovinos.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar qual marcador de síntese de proteína microbiana melhor prediz a proteína metabolizável;
- Identificar se o tipo de dieta ofertada interfere na predição da proteína metabolizável.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e época

O experimento foi conduzido nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRÚMEN) do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde também foram realizadas parte das análises.

O experimento foi conduzido de acordo com as recomendações preconizadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria (processo CEUA nº 8788040222) no período de abril a setembro de 2022.

5.2 Animais, dietas e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental de duplo quadrado latino 3 x 3 incompleto. Foram utilizados cinco ovinos machos castrados mestiços da raça Corriedale x Suffolk com peso vivo médio de 35kg (\pm 5 kg de peso corporal, (PC)) e média de 5 meses de idade. Como um animal não conseguiu participar dos períodos 2 e 3, um período adicional foi realizado para aumentar o número de repetições, obtendo-se 5, 6 e 7 repetições para os tratamentos DDGs, FS e TS, respectivamente.

As dietas experimentais eram isoproteicas, constituídas de 60% de volumoso (silagem de milho) e 40% de concentrado, sendo estas compostas por três diferentes fontes de proteína: farelo de soja (FS), torta de soja (TS) e grão seco de destilaria com solúveis (dry distiller grain – DDGs). Todas as dietas foram formuladas para suprir as exigências nutricionais dos cordeiros com base no NRC (2007). A oferta foi restrita a 90% do consumo a fim de gerar um consumo uniforme de todos os animais e evitar a

seleção. As composições químicas da dieta e dos alimentos são apresentadas na Tabela 1. Antes de introduzir os animais ao experimento, os cordeiros foram preparados cirurgicamente para colocação de sonda ruminal e cânula duodenal do tipo "T". Após o período de recuperação (40 dias), os ovinos foram alojados em gaiolas de metabolismo com cocho individual para alimento e água para a adaptação durante 15 dias, onde permaneceram por cada período experimental com duração de 21 dias cada, o experimento foi conduzido no total de quatro períodos experimentais de 21 dias, sendo os primeiros 10 dias para adaptação às dietas e os últimos 11 dias para coleta de amostras.

Antes de cada alimentação, os volumosos e concentrados eram pesados em baldes individuais para cada animal e então oferecidos como ração totalmente misturada (TMR) duas vezes ao dia com horários fixos (8:30 e 16:30 horas), sendo ofertados nas proporções de 40 e 60% da alimentação total, respectivamente. Amostras dos alimentos foram coletadas no início de cada período experimental e secas em estufas com ventilação forçada a 55°C, moídas (peneira com porosidade de 1 mm) e armazenadas para posterior análise.

A silagem de milho foi armazenada em sacos plásticos de 20 kg em câmara frigorífica à temperatura de 0°C. Antes do fornecimento, a silagem de milho foi triturada em trituradora elétrica de forragem TRF-70 a fim de reduzir o tamanho médio de partícula para 1 cm para favorecer a mistura com o concentrado e reduzir a seleção pelos animais. Os concentrados foram preparados antes de cada período experimental em misturador horizontal com capacidade para 50 kg e posteriormente armazenados em sacos.

Tabela 1 - Composição química dos alimentos

Item	Silagem de milho	Farelo de soja	Torta de Soja	DDGs	Milho grão
MS (g/kg)	457	868	878	890	865
Composição (g/kg da MS)					
MO	960	925	941	941	991
FDN	458	102	147	147	108
FDA	233	70	74	74	70
EE	8,6	14,1	25,5	25,5	8,0
CNF	443	281	319	319	798
Nt	9,3	89	77,7	77,7	14,2
N Sol (% / Nt)	60,4	7,47	12,7	12,7	21,2
NIDIN (%/ Nt)	14,1	5,13	7,27	7,27	12,5

DDGs = grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS); MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; EE= extrato etéreo; CNF= carboidratos não fibrosos; $^1 = MO - [(FDN - (NDIN \times 6,25)) + (N \text{ total} \times 6,25 + EE)]$; Nt= nitrogênio total; N Sol= nitrogênio soluvel; NDIN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro

Tabela 2 - Participação dos ingredientes nas dietas experimentais

Item	Tratamentos (g/Kg MS)		
	FS	TS	DDGs
Silagem de milho			
Milho grão	600	600	600
DDGs	154	110	88,0
Farelo de Soja	--	--	294,0
Torta de Soja	--	272,4	--
Sal	4,4	4,4	4,4
Núcleo Mineral ^a	13,6	13,6	13,6
Composição dos nutrientes			
MS, g do alimento	605	608	612
MO	939	941	950
FDN	315	326	391
FDA	166	167	186
EE	9,6	13,0	17,9

FS= tratamento com farelo de soja; tTS= tratamento com torta de soja; DDGs= tratamento com DDGs; DDGs = resíduos de granos de destilaria; MS= Matéria Seca, MO= Matéria Orgânica, FDA = Fibra Detergente Neutro, FDA= Fibra Detergente Ácido, EE= Extrato Etéreo, Composição do núcleo mineral= Cálcio 140 g/Kg, Fósforo 70 g/Kg; Enxofre 27g/kg; Sódio 110g/kg; Manganês 1270 mg/kg; Zinco 4200 g/kg; Cobalto 220 g/kg; Iodo 148 mg/kg; Selênio 9 mg/kg; Ferro 1400 mg/kg; Flúor 710 mg/kg.

5.3 Condução do experimento

Amostras dos alimentos foram coletadas no início de cada período experimental e secas em estufas com ventilação forçada a 55°C, moídas (peneira com porosidade de 1 mm) e armazenadas para posterior análise. A produção total de fezes de cada animal foi coletada diariamente do 11º ao 16º dia de cada período experimental e armazenada em câmara frigorífica a -5°C. Ao final de cada período, as fezes foram pesadas e coletadas uma amostra representativa de em torno de 5%

do peso total, as quais foram então secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas e, em seguida, moídas e armazenadas para posterior análise.

5.3.1 Coleta de urina e líquido ruminal

No 11° ao 17° dia realizou-se a coleta de urina, totalizando 7 dias. No 14° dia e 20° dia de cada período experimental, foram coletadas oito amostras de líquido ruminal (50 ml) com intervalos de duas horas entre cada amostragem.

Foi realizada a coleta total de urina diariamente durante o período de cinco dias, os recipientes continham 100 mL de solução de H₂SO₄ a 20%. Este volume de ácido foi definido como sendo necessário a fim de manter o pH da urina a valores abaixo de 2. Foi mensurada a produção total de urina e retirada uma amostra de 1% do total, a qual foi transferida para um balão de 100 mL, completou-se com água destilada e armazenou-se a -20 °C para posterior análise. Após o término de cada período experimental, as amostras de urina foram descongeladas e filtradas em papel filtro (7,5 µm de porosidade) comum. A seguir, sub-amostras correspondentes a 1% do volume total diário foram coletadas e misturadas em uma amostra composta por animal e período para análise.

Entre os dias 19° e 21° de cada período experimental foram coletadas amostras de digesta duodenal três vezes ao dia (70 ml por coleta) com intervalo de 8 horas entre as coletas, avançando duas horas para cada dia de forma a abranger um período de 24 horas, armazenadas a -20°C e posteriormente liofilizadas para a realização de análise. Ao final de cada período experimental os ovinos eram retirados das gaiolas e passavam por um período de descanso.

Entre os dias 18° e 21° de cada período experimental foram coletadas amostras de digesta duodenal três vezes ao dia (75 ml por coleta) com intervalo de 8 horas entre as coletas, avançando duas horas para cada dia de forma a obter uma amostragem abrangendo um período de 24 horas. Essas amostras foram compostas por animal e período, armazenadas a -20°C e posteriormente liofilizadas para análise.

No 12° dia de cada período experimental, foram coletadas oito amostras de líquido ruminal (50 ml) com intervalos de duas horas entre cada amostragem. A primeira coleta foi realizada antes da refeição matinal e as seguintes 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 16 horas após a refeição matinal. De cada amostra foi retirada 1 alíquota de 4,5 mL e armazenadas em potes individuais, contendo 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA)

(50% V/V), as quais foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

Entre os dias 19º e 21º de cada período experimental foram coletadas amostras de digesta duodenal três vezes ao dia (70 mL por coleta) com intervalo de 8 horas entre as coletas, avançando duas horas para cada dia de forma a abranger um período de 24 horas, armazenadas a -20°C e posteriormente liofilizadas para a realização de análise. Adotou-se 72 horas para que a liofilização fosse totalmente realizada.

5.3.2 Análises químico - bromatológicas

O teor de matéria seca (MS) das amostras de alimento, digesta duodenal e fezes foi obtido por secagem em estufa a 105°C durante pelo menos 8 horas. A matéria mineral (MM) foi determinada pela queima em mufla a 600°C durante 4 horas. O conteúdo total de nitrogênio (N) do alimento, digesta duodenal e urina foram determinados pelo método de Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997).

Nas amostras de alimento, a análise da fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada a partir do método descrito por Mertens (2002) com o uso de α -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos de poliéster com porosidade de 16 μ m e tratadas com detergente neutro em autoclave, à 110°C por 40 minutos (SENGER *et al.*, 2008).

A concentração de fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada de acordo com o método 937.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos de poliéster com porosidade de 16 μ m e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER *et al.*, 2008). O teor de extrato etéreo (EE) foi obtido por extração com éter de petróleo a 90°C por 60 minutos, utilizando o equipamento XT15 da ANKOM, através do método AOCS Am 5-04 (AM; AOCS, 2005).

As amostras de líquido ruminal com adição de TCA foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C, foi coletado o sobrenadante para a determinação N alfa amino de acordo com Palmer e Peters (1969).

Para a análise de N α -amino foi realizada uma primeira etapa de digestão na qual o sobrenadante coletado foi tratado com HCl 6 M (0,5 ml de amostra e 0,5 ml de HCl 6 M) em tubos com tampa de rosca, por 24 horas a 110°C. Na segunda etapa a amostra foi transferido para um balão volumétrico de 10 ml e completado o volume com hidróxido de sódio 0,375 N e filtrada com papel de filtro (7,5 μ m de porosidade).

A solução de NaCl foi utilizada com a finalidade de neutralizar as amostras. Na terceira etapa a concentração de N α -amino foi analisada por espectrofotometria pelo método não automático adaptado de Palmer e Peters (1969) da seguinte forma: foram pipetados 200 μ L da amostra filtrada em um tubo e adicionados 1650 μ L de borato tampão (19,1 g/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,05M), 250 μ L 1 g/L 2,4,6-Trinitrobenzeno Sulfonato (TNBS). Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Imediatamente, 500 μ L de HCl 1N foram adicionados cada tubo e a absorbância foi medida a 420 nm (UV BEL Photonic 2000) contra um branco contendo água destilada. A L-Serina foi usada para realizar uma curva padrão que incluía tubos de ensaio contendo 7,87; 15,75; 23,62 e 31,50 μ g/tubo de serina. Adicionalmente foram analisadas as concentrações de N α -amino no sobrenadante das mesmas amostras de líquido ruminal sem a etapa de digestão, com o objetivo de avaliar a concentração de AA livres no rúmen.

Para a análise de N α -amino no duodeno, as amostras foram tratadas seguindo os mesmos procedimentos utilizados nas amostras de líquido ruminal, com a diferença de que foi pesado 0,1 g de amostra previamente liofilizadas e tratada com 2 ml de HCl 6 M em tubos com tampa de rosca, por 24 h a 110°C. Após a hidrólise, 8 ml de NaOH 1,5 N foram adicionados a cada tubo e o conteúdo foi diluído em balão volumétrico de 50 ml e completado o volume com água destilada. Essa solução foi filtrada em papel filtro (7,5 μ m de porosidade) e, em seguida, a leitura das concentrações de N α -amino.

5.3.3 Determinação de purinas

O teor de purinas foi quantificado nas amostras de digesta duodenal e pellet de bactérias seguindo a metodologia de Makkar e Becker (1999). A técnica foi realizada seguindo os seguintes procedimentos:

Para a confecção do padrão foram utilizadas 25 mg de adenina e 25 mg de guanina que passaram pelos mesmos processos das amostras de duodeno (descritos abaixo).

Amostras duodenais: 200 mg de amostra liofilizada foi pesada e colocada em tubo de 25 mL com tampa rosca (com borracha de vedação). Foi adicionado 2,5 de HClO_4 (2M) e a amostra foi então submetida a banho-maria por 1h a 90 – 95 °C, agitando o periodicamente. Após esse processo, foi adicionado 7,5 mL $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (28,5 mM). A amostra foi novamente submetida a banho-maria em temperatura de 90-

95°C por 15 minutos. Após, a amostra foi centrifugada 4000 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado. Uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante foi retirada e adicionado a ela 4,5 mL 0,2M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, misturado vigorosamente e adicionado 0,25 mL de AgNO_3 0,4 M. A amostra foi mantida a 4°C por um período de 12 horas.

Após esse período a amostra foi novamente centrifugada a 4000 xg por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 4,5 mL água destilada com pH ajustado para 2,0 (utilizou-se H_2SO_4). Após este processo, a amostra foi novamente submetida à centrifugação a 4000 xg por 20 minutos.

O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet foi ressuspenso em 5 mL de HCl 0,5M. Agitou-se vigorosamente e submeteu-se a amostra novamente em banho-maria 90-95 °C por 30 minutos (cobertos afim de não haver evaporação). Realizou-se uma nova centrifugação por 4000 xg por 20 minutos. A absorvância foi lida a 260 nm contra o branco de HCl 0,5M. A quantidade de purinas foi expressa como mg de purinas.

5.3.4 Determinação de Purinas nas bactérias mistas

Inicialmente a análise foi realizada, mas a absorvância foi bem abaixo das registradas pela literatura. Em um novo dia, foi realizada uma nova análise a fim de realizar uma contrapartida das absorvâncias analisadas anteriormente, mas as absorvâncias apresentavam-se abaixo da esperada pela literatura.

Propoe-se realizar as amostras de forma composta por tratamentos, mas os resultados apresentaram-se piores que os realizados por cada animal. A absorvância média foi menor que a metade esperada pela literatura.

Houve uma nova tentativa utilizando as amostras compostas por tratamentos. Foram realizadas amostras compostas por tratamento utilizando as amostras basais. Pesou-se um total de 0,5g em cada tubo de centrífuga (foram utilizados dois tubos). Adicionou-se 15 mL de solução tampão (solução utilizada para a análise de *in vitro* gás). Colou-se em banho maria a 39°C por 3h. As amostras ficaram em refrigeração durante a noite. No dia seguinte, o tubo retornou ao banho a 39°C por mais 3h. Foi feita uma centrifugação a 1 000 xg por 10 minutos a 15 °C.

Coletou-se o sobrenadante e foi descartado que ficou no fundo. Realizou-se uma nova centrifugação a 12 000 xg por 20 min a 15°C. Descartou-se o sobrenadante e para a lavagem do pellet foi utilizada 3mL de solução tampão. Um vórtex foi utilizado

afim de homogeneizar a lavagem. Uma nova centrifugação foi realizada a 12 000 xg por 20 min a 15°C. Descartou-se o sobrenadante e liofilizou-se o pellet. Após a total liofilização do pellet foi feita a análise de purinas, mas as absorbâncias estavam bem abaixo das relatadas na literatura.

A fim de realização uma contraprova de amostras sem tratamento, coletou-se 1200 mL de digesta ruminal do bovino pertencente ao laboratório. A digesta foi filtrada em um pano de nylon com 50 micras de porosidade. O que ficou no pano foi desprezado e coletou-se o que passou pelo pano.

A digesta foi submetida a diferentes centrifugações:

1 000xg por 5 minutos; 12 000xg por 15 minutos e 12 000xg por 15 minutos;
500xg por 10 minutos; 12 000xg por 15 minutos e 12 000xg por 15 minutos; 500xg por 5 minutos; 12 000xg por 15 minutos e 12 000xg por 15 minutos;

Na primeira etapa o pellet era desprezado e coletava-se o sobrenadante. Na segunda etapa houve a centrifugação e posteriormente lavou-se o pellet com solução salina a 0,9%. Foi feita a análise para a determinação de purinas e a absorbância ficou dentro da preconizada pela literatura.

5.3.5 Determinação de derivados de purinas

As concentrações de alantoína e ácido úrico foram determinadas colorimetricamente de acordo Chen e Gomes (1992). O ácido úrico foi determinado usando o kit comercial (QUIMIURIC, São Paulo, SP, Brasil), após xantina e hipoxantina serem convertidas a ácido úrico com xantina oxidase. Assim, os teores de ácido úrico foram calculados como a soma de ácido úrico, xantina e hipoxantina (convertidas a ácido úrico) e, os derivados purinas totais (DP) como a soma do ácido úrico e alantoína.

O fluxo de nitrogênio microbiano no intestino delgado foi estimado com base na excreção urinária dos derivados de purinas (DP), conforme Chen e Gomes (1992). A quantidade de purinas absorvidas (X, mmol/dia) correspondeu à quantidade de DP excretada (Y, mmol/dia, considerando 158 mg/mmol de alantoína e 168 mg/mmol de ácido úrico), onde:

$$Y = 0,84 X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25X})$$

O cálculo de X baseado no valor de Y foi feito usando o processo iterativo de Newton – Raphson:

$$X (n+1) = Xn - (((0,84X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25x})) - Y) / (0,84 - (0,038 PV^{0,75} e^{-0,25x})))$$

O N microbiano (Nm) foi estimado como proposto por Chen e Gomes (1992):

$$Nm (g/dia) = 70X / (0,116 X 0,83 X 1000) = 0,727 X$$

Onde X e Y representam, respectivamente, a absorção de purinas e excreção de DP assumindo que a digestibilidade das purinas microbinas é 0,83. O conteúdo de N nas purinas foi considerado ser 70 mg/mmol e a proporção de N purina: N microbiano foi considerado ser 0,116.

Adicionalmente, o fluxo de Nm foi calculado utilizando a mesma equação acima, exceto que a proporção N purina: N microbiano utilizada foi obtida pelo isolamento das bactérias ruminais.

Para a determinação da proteína microbiana, o Nm foi multiplicado por 6,25

5.3.6 Determinação de ¹⁵N

As análises para determinação do isótopo ¹⁵N da digesta duodenal, do líquido ruminal basal e líquido ruminal após a infusão do ¹⁵N5 foram realizadas pelo Laboratório de Biotransformações de Carbono e Nitrogênio (LABCEN), pertencente ao Departamento de Solos da UFSM.

As amostras foram previamente liofilizadas e homogeneizadas em um almofariz. Pesadas em balança de precisão, aproximadamente 5mg de amostra em cápsulas de estanho. Depois de fechadas as cápsulas foram introduzidas no espectrômetro de massa para razão isotópica (IRMS).

A determinação da abundância de ¹⁵N foi realizada por espectrômetro de massa de razão isotópica (DELTA V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um analisador elementar (Flash 2000 IRMS, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). O excesso de ¹⁵N foi calculado assumindo a abundância natural de 0,3663 atm % para o padrão (3.663 mg ¹⁵N/ g N). O resultado

final foi expresso como ug excesso N15/g MS residual. Foram utilizadas as seguintes equações:

1. Razão isotópica do padrão:

$$R \text{ padrão} = \left(\frac{0,366\% (15N)}{99,633\% (14N)} \right)$$

$$R \text{ padrão} = 0,0036765 \text{ ou atm \% padrão} = 0,3663$$

2. Delta da amostra:

$$\delta \text{ amostra} = \left(\frac{\frac{15N}{14N} \text{ amostra} - \frac{15N}{14N} \text{ padrão}}{\frac{15N}{14N}} \right) \times 1000$$

3. Excesso de 15N do N total:

$$\text{Excesso de N15 (\%)} = \text{atm \% amostra} - \text{atm \% padrão}$$

5.3.7 Tratamento das amostras de digesta duodenal

As amostras coletadas foram descongeladas, homogeneizadas e pesadas para congelamento e posteriormente liofilizadas. Adotou-se o protocolo de 72h para que todas amostras fossem liofilizadas.

5.3.8 Tratamento das amostras de líquido ruminal para a determinação de purinas

Para obtenção das amostras utilizou-se um protocolo adaptado de Ranilla e Carro (2003), as amostras de líquido ruminal foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas com o auxílio de um liquidificador por 30 segundos. As amostras foram pesadas e centrifugadas a 500 xg por 5 minutos a 15°C.

As bactérias aderidas às partículas foram coletadas, pesadas e foi adicionada uma solução de metilcelulose a 1% + solução salina a 0,9%, o volume de solução foi três vezes o peso das bactérias. Incubou-se por 24h em refrigerador.

As bactérias livres foram coletadas em um novo frasco e pesadas para uma nova centrifugação a 20.000 xg por 20 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante adicionou-se solução salina a 0,9% (cerca de 10 mL), homogeneizou-se com um vórtex a fim de desfazer o pellet.

Centrifugou-se novamente a 20.000 xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, coletou-se o pellet e transferiu-se para um novo frasco. Caso tenha sido necessário, acrescentou-se solução salina para a remoção total do pellet. A amostra foi armazenada a -20°C para posterior liofilização.

No dia seguinte após a incubação, homogeneizou-se as amostras de bactérias aderidas às partículas com o auxílio de um liquidificador por 30 segundos. As amostras foram pesadas e centrifugadas a 500 xg por 5 minutos a 15°C.

Coletou-se o sobrenadante em um novo frasco e descartou-se o pellet. Uma nova centrifugação foi realizada a 20 000 xg por 20 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante adicionou-se solução salina a 0,9% (cerca de 10 mL), homogeneizou-se com um vórtex afim de desfazer o pellet.

Centrifugou-se novamente a 20 000 xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, coletou-se o pellet e transferiu-se para um novo frasco. Caso tenha sido necessário, adicionou-se solução salina para a remoção total do pellet. A amostra foi armazenada a -20°C para posterior liofilização.

Adotou-se 72h como protocolo para que as amostras fossem totalmente liofilizadas.

5.3.9 Determinação de FDNi

As amostras de alimento e fezes foram submetidas à digestão ruminal por meio de incubação de um bovino provido de cânula ruminal recebendo dieta fibrosa, por 288 horas para a determinação de FDNi. Foi incubado 2 gramas de amostras moídas 1 mm em saquinhos de poliéster com porosidade 16 micras medindo 5x5cm, de acordo com o proposto por Kriszan e Huhtanen (2013).

Estimativa do fluxo de MS aplicado a todos os marcadores

O cálculo foi baseado na metodologia Francis e Siddons (1986) seguindo a seguinte equação:

$$Fd = \frac{Fm}{Cm, x}$$

Onde:

Fd: fluxo de digesta passado pela cânula (g/dia) Cm,x: concentração do

marcador na amostra (mg/g) Fm: fluxo do marcador passado na cânula (mg/dia)

5.3.10 Cálculos realizados para a estimativa de cada metodologia

FMS: fluxo MS (g/dia) FDNi = MS fezes (g/dia) X FDNi fezes (MS) / FDNi Duodeno

TN: Cálculo N% elementar (%MS) = análise de ^{15}N digesta duodenal

BASAL: Nível basal ruminal (‰) = pellet de bactérias ruminais (análise ^{15}N no pellet de bactérias)

RAZBAC: Razão isotópica do pellet de bactérias (pellet misto de bacterias) (‰) = (Nível ^{15}N ruminal) – (pellet de bactérias ruminais. com infusão de ^{15}N)

RAZDUO: Razão isotópica da digesta duodenal (‰) = Nível basal digesta duodena(‰ ^{15}N)

ENRBAC: Enriquecimento do pellet ruminal (‰)= (Nível basal ruminal: pellet de bactérias ruminais basal) - (Nível ^{15}N ruminal : pellet de bactérias ruminais com enriquecimento de ^{15}N)

ENRDUO: Enriquecimento digesta duodenal (‰) = (nível basal de digesta duodenal) - (nível ^{15}N duodenal : pellet de digesta duodenal com enriquecimento de ^{15}N)

PROPMIC: Proporção do fluxo de N que tem origem microbiana (‰) = [(nível basal de digesta duodenal) - (nível ^{15}N duodenal : pellet de digesta duodenal com enriquecimento de ^{15}N) ou ENRDUO] / [(Nível basal ruminal: pellet de bactérias ruminais basal) - (Nível ^{15}N ruminal : pellet de bactérias ruminais com enriquecimento de ^{15}N) ou ENRBAC]

FN: Fluxo de nitrogênio (g/dia) = MS duodeno (g/dia) X %N duodeno (MS) / 100

FNMICN15: Nitrogênio microbiano (g/dia) = N total (g/dia) do duodeno X proporção de

N nas bactérias

FNNDEGN15: Fluxo de N de origem dietética (não degradável) (g/dia) = [(MS duodeno (g/dia) X %N duodeno (MS) / 100 ou FN] – [N total (g/dia) do duodeno) X (Proporção proporção de N de bactérias ou FNMICN15] ou FN – FNMICN15

PURDIG: Concentração de purinas na digesta (g/kg) = [Concentração média de purinas (mg/g MS)] – (quantidade de purinas obtidas através da leitura)

PURBACT: Concentração de purinas no pellet de bactérias (g/kg) = Análise determinação de purina

NBACT: N% concentração de pellet ruminal com infusão de ¹⁵N (%)

FNMICP: Fluxo de nitrogênio microbiano estimado por purinas (g/dia) = [MS fezes (g/dia) X FDNi fezes (MS) / FDNi Duodeno] X [Concentração média de purinas (mg/g MS) - Aba purinas leitura, planilha Flujo Mauro] X [N% concentração de pellet ruminal com infusão de 15N] / [Análise determinação de purinas, coluna N] * 100

FNNDEGP: Fluxo nitrogênio microbiano não degradado no rumen (g/dia) = [(Cálculo fluxo MS (g/dia) FDNi = MS fezes (g/dia) X FDNi fezes (MS) / FDNi Duodeno)] [MS fezes (g/dia) X FDNi fezes (MS) / FDNi Duodeno] X [Concentração média de purinas (mg/g MS) - purinas leitura] X [N% concentração de pellet ruminal com infusão de 15N] / [Análise determinação de purinas] * 100

FNMICDP: Fluxo nitrogênio microbiano estimado por derivados de purina (g/ dia)

CONSND: Consumo de N diário (g/dia)

CONSPBD: Consumo de proteína bruta diário (g/dia)

CONSMS: Consumo de matéria seca (g/d)

FALFN: Fluxo de alfa amino N (g/d)

5.4 Análise estatística

Neste estudo, utilizamos um modelo de efeitos mistos para analisar a variância dos dados coletados. O modelo foi ajustado utilizando a função lme do pacote nlme (Pinheiro e Bates, 2000) no software R (R Core Team, 2020). Abaixo está uma descrição detalhada do modelo estatístico, das etapas da análise e das funções utilizadas, incluindo o modelo matemático.

O modelo ajustado foi um modelo linear misto com a seguinte estrutura:

$FNMIC_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 Method_{ij} + \beta_2 TRAT_{ij} + \beta_3 (Method \times TRAT)_{ij} + u_{ik} + v_{jk} + \epsilon_{ijk}$, onde:

- $FNMIC_{ijk}$ é o valor da variável dependente (FNMIC) para a i -ésima observação do j -ésimo nível de tratamento e o k -ésimo nível do fator aleatório.
- β_0 é o intercepto do modelo.
- β_1 , β_2 , e β_3 são os coeficientes associados aos efeitos fixos dos fatores Method, TRAT e sua interação (Method \times TRAT), respectivamente.
- u_{ik} é o efeito aleatório associado ao fator ANI (animais), modelado como $u_{ik} \sim N(0, \sigma_u^2)$, onde σ_u^2 é a variância dos efeitos aleatórios associados a ANI.
- v_{jk} é o efeito aleatório associado ao fator PER (períodos), modelado como $v_{jk} \sim N(0, \sigma_v^2)$, onde σ_v^2 é a variância dos efeitos aleatórios associados a PER.
- ϵ_{ijk} é o erro residual, modelado como $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_\epsilon^2)$, onde σ_ϵ^2 é a variância do erro residual.

As variâncias residuais foram modeladas utilizando diferentes agrupamentos (ou seja, sem agrupamento, Method, ANI, PER, ou TRAT) usando a função `weights=varIdent(form = ~ 1 | Method)`. O melhor agrupamento para cada variável foi escolhido utilizando o menor critério de informação de Akaike (Akaike, 1974), corrigido para amostras pequenas (AICc) (Sugiura, 1978). Foi considerado o nível de significância a 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 Composição da dieta em relação aos cálculos

Os resultados obtidos através dos cálculos realizados para a estimativa de cada metodologia estão apresentados na tabela 3. Já a tabela 4, apresenta os valores médios dos marcadores utilizados para estimar a síntese de proteína microbiana utilizando ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). Os marcadores avaliados foram DP (derivados de purinas), ¹⁵N (isótopo de nitrogênio 15) e P (purinas).

Tabela 3 - Diferentes variáveis que compuseram os cálculos para a estimativa de cada metodologia utilizando ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Variáveis	Tratamentos			EPM	P valor
	DDGs	FS	TS		
FMS (g/dia)	482±54,3	435±48,9	453±51,9	51,7	0,580
TN (% MS)	4,72±0,18 ^a	4,45± 0,18 ^c	4,31±0,18 ^b	0,18	0,138
BASAL (%o)	25.6 ±3.02 ^a	17.4± 3.02 ^c	21.1± 3.01 ^b	3,01	<0,001
RAZBAC (%o)	144.5± 5.45 ^a	80.5 ±5.45 ^b	76.7± 5.44 ^c	5,44	<0,001
RAZDUO (%o)	68,7± 4.83 ^a	56,4± 4.66 ^b	58,2±4.58 ^b	4,69	0,002
ENRBAC (%o)	137.3±5.69 ^a	74.5 ±5.69 ^b	70.4±5.69 ^b	5,69	<0,001
ENRDUO (%o)	61.6 ±4.90 ^a	51.6 ±4.81 ^b	50.6 ±4.82 ^b	4,84	<0,001
PROPMIC (%)	0,4± 0.03 ^b	0,7± 0.03 ^a	0,6± 0.03 ^a	0,03	0,398
FNDEGN15 (g/dia)	11.49 ±1.89 ^a	7.06 ±1.60 ^b	7.08± 1.77 ^b	1,75	0,046
PURDIG (g/kg)	4,21±0.161 ^c	5,84±0.117 ^b	6,29±0,115 ^a	0,13	<0,001
PURBAC (g/kg)	6,19±0.583	6.97±0,596	5.21±0,506	0,561	0,070
FNMICN15 (g/dia)	9,24±1,23 ^b	12,39±1,41 ^a	12,33±1,39 ^a	1,34	0,035
FNDEGN15 (g/dia)	11,49±1,89	7,06±1,60	7,08±1,77	1,75	0,046
NBAC (%)	4.73±0.206 ^b	5.55 ±0.168 ^a	4.95 ±0.153 ^b	0,18	0,004
FNMICP (g/dia)	18.1± 3.62 ^b	19.3± 2.99 ^b	30.3± 2.84 ^a	3,15	0,001
FNNDEGP (g/dia)	3.38±1.25	0.513± 1.29	-2.757 ±1.16	1,23	0,0030
FNMICDP (g/dia)	11.48 ±0.405 ^a	8.54 ±0.424 ^c	9.71± 0.395 ^b	0,40	<0,001
CONSND (g/dia)	25.2 ±2.38	27.7± 2.27	27.6± 2.22	2,29	0,376
CONSMS (g/dia)	841± 52.6 ^b	845± 53.5 ^b	881± 52.6 ^a	52,9	0,039
FALFN (g/dia)	18.3± 3.06	16.2± 2.81	17.8 ±2.68	2,85	0,8009
FN (g/dia)	25.6 ±3.02 ^a	17.4 ±3.02 ^c	21.1± 3.01 ^b	3,01	<0,001

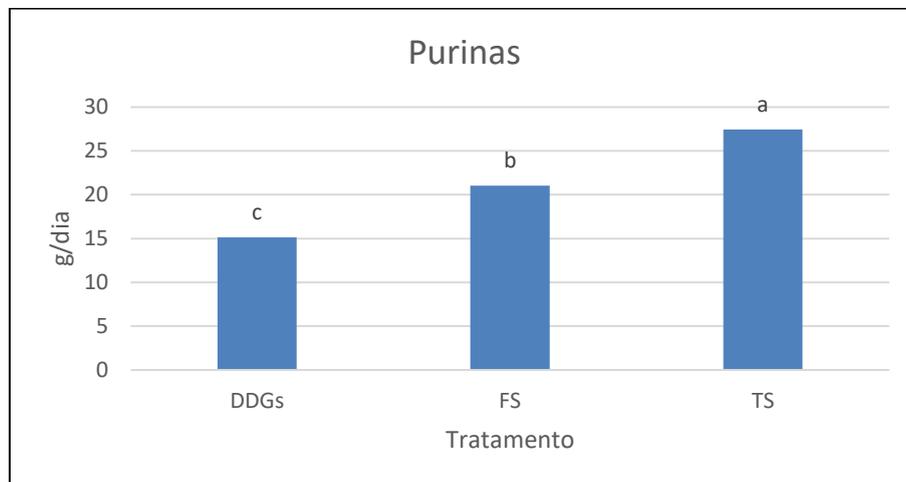
EPM: erro padrão da média; Médias nas linhas seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. FMS: Fluxo de MS (calculado FDNi) (g/dia). TN: teor de nitrogênio na digesta (%MS). BASAL: Nível basal ruminal (%o). RAZBAC: Razão isotópica do pellet de bactérias (pellet misto de bactérias) (%o). RAZDUO: Razão isotópica da digesta duodenal (%o). ENRBAC: Enriquecimento do pellet misto de bactérias (%o). ENRDUO: Enriquecimento da digesta (%o). PROPMIC: Proporção de nitrogênio mic que chega no duodeno (%). FN: Fluxo duodenal de nitrogênio microbiano (g/dia). FNDEGN15: Fluxo de proteína microbiana estimado utilizando 15N (g/dia). PURDIG: Concentração de purinas na digesta (g/kg). PURBAC: Concentração de purinas no pellet de bactérias (g/kg). PBAC: Teor de N no pellet de bactérias (%). FNDEGP: Nitrogênio microbiano não degradado no rumen (g/dia). FNMICP: Fluxo de n microbiano (purinas) (g/d). FN: Fluxo duodenal de nitrogênio microbiano (g/dia).

Tabela 4 - Estimativa da síntese de proteína microbiana utilizando ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs)

Marcador	Tratamento			EPM	P valor
	DDG	FS	TS		
DP	10,59±1,18 ^a	10,39±1,13 ^b	10,45±1,10 ^b	1,13	<0,001
¹⁵ N	9,97±2,40 ^b	13,00±2,22 ^a	14,43±2,08 ^a	2,23	<0,001
P	15,14±3,54 ^c	21,02±3,24 ^b	27,44±3,02 ^a	3,26	<0,001

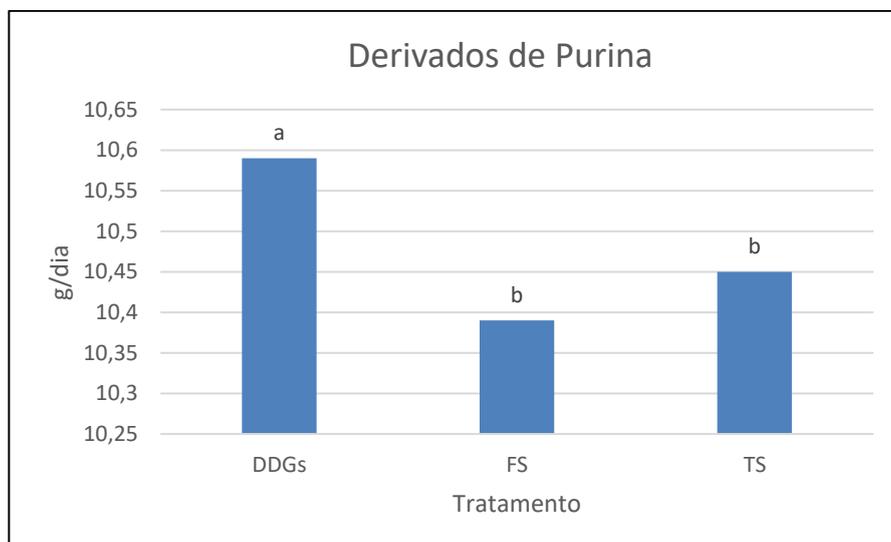
FS: farelo de soja; TS: torta de soja; DDG: resíduo de destilaria com solúveis; EPM: erro padrão da média; DP: derivados de purina; ¹⁵N: isótopo de nitrogênio 15; P: purinas

Figura 3 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de purinas em ovinos alimentados com farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade



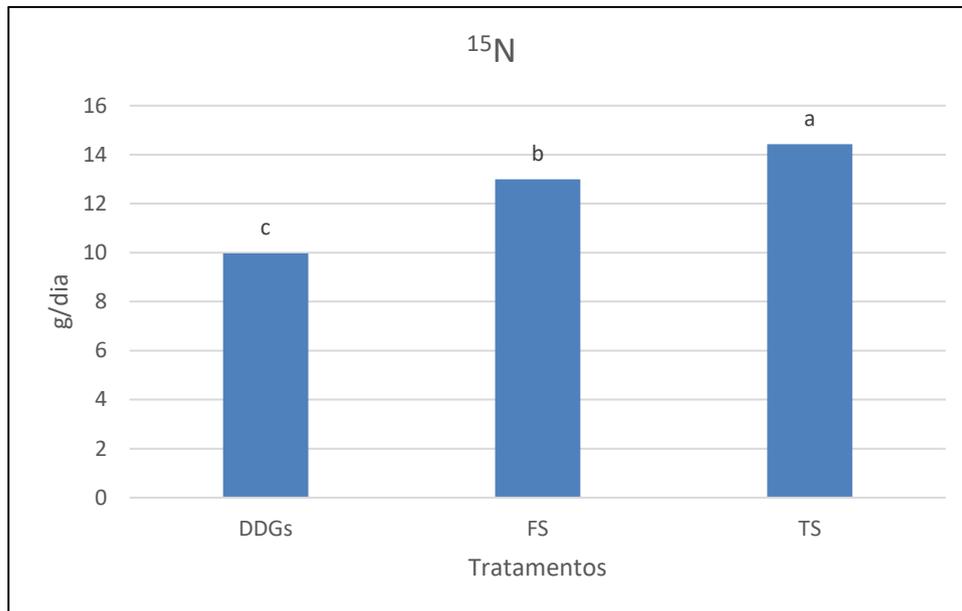
Fonte: A autora (2024)

Figura 4 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de derivados de purinas em ovinos que consumiram farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade



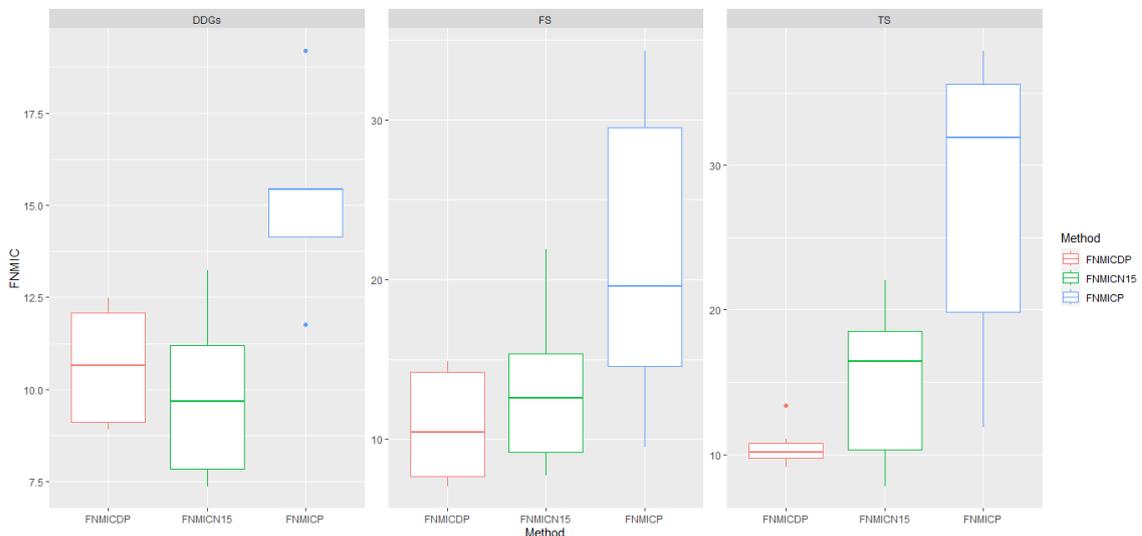
Fonte: A autora (2024)

Figura 5 - Efeito de fontes de proteína sobre a metodologia de ^{15}N em ovinos que consumiram farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs). As médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade



Fonte: A autora (2024)

Figura 6 - Efeito dos tratamentos sobre as diferentes metodologias em ovinos que consumiram uma dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado contendo farelo de soja (FS), torta de soja (TS) ou resíduo de destilaria com solúveis (DDGs)



Fonte: A autora (2024)

A tabela 5 apresenta a interação entre os tratamentos (TRAT) e os marcadores utilizados para estimar a síntese de proteína microbiana em diferentes condições. Os tratamentos incluem DDGs (resíduo de destilaria com solúveis), FS (farelo de soja) e TS (torta de soja), enquanto os marcadores avaliados são DP (derivados de purinas), N15 (isótopo de nitrogênio 15) e P (purinas).

Tabela 5 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados em ovinos alimentados com FS, TS e DDG

Efeito	TRAT	Marcador	_TRAT	_Marcador	Estimativa	EP	DP	P valor
TRAT*Marcador	DDGs	DP	DDGs	N15	0.6124	2.3158	38	1.0000
				P	-4.5520	3.4816		0.9229
			FS	DP	0.1935	0.9953		1.0000
				N15	-2.4139	2.1542		0.9673
			P	DP	-10.4398	3.2052		0.0537
				N15	-16.8560	2.9782		<.0001
		N15	DDGs	P	-5.1644	4.0622		0.9336
				DP	-0.4189	2.3175		1.0000
			FS	N15	-3.0263	3.0035		0.9828
				P	-11.0522	3.8279		0.1241
			TS	DP	-0.4812	2.3008		1.0000
				N15	-4.4546	2.9021		0.8320
		P	FS	DP	4.7455	3.4827		0.9047
				N15	2.1381	3.9723		0.9998
			P	DP	-5.8878	4.6273		0.9332
				N15	4.6832	3.4716		0.9094
			TS	N15	0.7098	3.8963		1.0000
				P	-12.3040	4.4731		0.1646

A tabela 6 apresenta a interação entre o tratamento com farelo de soja (FS) e os marcadores utilizados para estimar a síntese de proteína microbiana, considerando diferentes combinações de tratamentos e marcadores. Os marcadores avaliados incluem DP (derivados de purinas), N15 (isótopo de nitrogênio 15) e P (purinas).

Tabela 6 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados e comparação entre os métodos utilizados

Efeito	TRAT	Marcador	_TRAT	_Marcador	Estimativa	EP	DP	P valor	
TRAT*Marcador	FS	DP	FS	N15	-2.6075	2.1140	38	0.9436	
				P	-10.6333	3.1783		0.0433	
			TS	DP	-0.06235	0.8997		1.0000	
				N15	-4.0357	1.9845		0.5309	
			P	DP	-17.0495	2.9607		<.0001	
				N15	-8.0259	3.7083		0.4479	
		N15	FS	DP	2.5451	2.1118		0.9504	
				N15	-1.4283	2.7547		0.9998	
			TS	P	-14.4420	3.5236		0.0059	
				DP	10.5710	3.1768		0.0452	
			P	TS	N15	6.5976		3.6360	0.6727
				P	-6.4162	4.2483		0.8438	

A tabela 7 apresenta os efeitos da interação entre o tratamento com torta de soja (TS) e os marcadores utilizados para estimar a síntese de proteína microbiana. Os marcadores avaliados incluem DP (derivados de purinas), N15 (isótopo de nitrogênio 15) e P (purinas).

Tabela 7 - Estimativa da síntese de proteína microbiana efeito do tratamento em função da interação marcador e tratamento utilizados e comparação entre os métodos utilizados

Efeito	TRAT	Marcador	_TRAT	_Marcador	Estimativa	EP	DP	P valor
				N15	-3.9734	1.9572		0.5332
TRAT*Marcador	TS	DP	TS	P	-16.9871	2.9425	38	<.0001
		N15			-13.0138	3.4332		0.0137

7 DISCUSSÃO

As dietas avaliadas no presente estudo não afetaram ($P = 0,58$) o FMS (Tabela 3). O FMS a partir do rúmen está diretamente associado ($P = 0.039$) ao CONSMS dos ovinos. A literatura apoia esses achados, sugerindo que o tipo de dieta pode influenciar o consumo de MS, mas nem sempre afeta diretamente o FMS do rúmen. Vargas (2023) em sua avaliação da torta de soja como fonte proteica para ruminantes, observou que dietas com DDGS resultaram em maior consumo em FDN, o que pode impactar o CONSMS, mas não necessariamente o FMS.

O estudo avaliou o teor de nitrogênio da digesta (TN) em diferentes dietas compostas por DDGS, farelo de soja e torta de soja. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa no teor de nitrogênio da digesta entre as dietas ($P = 0,1386$).

Quando da utilização de purinas como indicador, a inclusão de torta de soja aumentou ($P = 0,001$) as estimativas de fluxo microbiano em relação a utilização de farelo de soja e DDGs. Com a utilização de purinas como indicador, houve uma subestimativa da síntese microbiana. De acordo com Del Valle et al. (2019), a utilização de PB como indicador superestima a síntese microbiana pois a técnica parte do pressuposto que o fluxo de purinas de origem dietética é zero. Além disso, as perdas de purinas durante o processo de preparação de amostras de pellets de bactérias levam a uma superestimativa do fluxo microbiano com a utilização de P.

As dietas testadas no experimento mostraram ter um impacto marcante na média de síntese de proteína microbiana. Isso ficou claro através de análises estatísticas que indicaram uma diferença significativa, com um valor de $P < 0,001$ (tabela 4). Valadares et al. (1999), ao avaliarem o impacto da substituição da silagem de alfafa por milho de alta umidade na dieta de ruminantes, utilizaram a excreção de derivados purínicos totais como indicador da síntese de proteína microbiana no

rúmen. Os resultados demonstraram que a inclusão de milho de alta umidade como substituto pode influenciar significativamente a eficiência da síntese de proteínas ruminais, refletindo em alterações na produção de leite e na saúde animal. Esse estudo evidenciou que mudanças na dieta resultam em variações mensuráveis na excreção de derivados purínicos, indicando diferenças na atividade microbiana do rúmen.

Na tabela 5, há algumas interações, como DDGs com TS utilizando o marcador P, há diferenças significativas ($P < 0,0001$), indicando um efeito relevante do tratamento. Em outras combinações, como DDGs com FS utilizando o marcador DP, os valores de P indicam ausência de diferença significativa ($P = 1,0000$). Esses resultados destacam a variabilidade na estimativa da síntese de proteína microbiana dependendo do tratamento e do marcador utilizado, reforçando a importância da escolha metodológica em estudos nutricionais.

A interação TS com o marcador N15, a estimativa não foi estatisticamente significativa ($P = 0,5332$). A interação TS com o marcador P apresentou significância estatística em dois casos: quando combinada com DP ($P < 0,0001$), indicando um efeito altamente significativo. Quando combinada com N15 ($P = 0,0137$), também indicando relevância estatística (tabela 6). Esses resultados sugerem que o marcador P foi mais sensível para detectar diferenças na interação com o tratamento TS, enquanto o marcador N15 apresentou menor significância em algumas combinações.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, a maior parte das variáveis analisadas no presente estudo indicaram que a escolha do método de estimativa da produção de Pmic é crucial em contextos de alta degradabilidade ruminal. Observou-se que, em dietas com FS, a metodologia empregada para estimar a Pmic influenciou significativamente os resultados. Isso contrasta com os cenários de baixa degradabilidade ruminal, como no uso de DDGS, onde as estimativas de Pmic permaneceram consistentes entre os diferentes tratamentos. Assim, em situações onde a degradabilidade ruminal é elevada, a seleção do método adequado para estimativa de Pmic é fundamental para garantir a precisão e a confiabilidade dos dados obtidos.

REFERÊNCIAS

AFRC. Agricultural and Food Research Council. **Energy and protein requirements of ruminants**. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on responses to nutrients. CAB International, Wallingford, UK, 1993. 151p.

ARAÚJO, L. F.; ZANETTI, M. A. **Nutrição animal**. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2016.

ARC. Agricultural Research Council. **The Nutrient Requirements of Livestock**. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, 1984.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, D. C., 1997.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9-E21, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 1. ed. São Paulo: Editora, 2011. 596 p.

BR – Caprinos e ovinos. **Exigências Nutricionais de Caprinos e Ovinos**. São Carlos: Editora Scienza, 2024. 270 p.

BR-CORTE. **Formulação de dietas, predição de desempenho e análise econômica de zebuínos puros e cruzados**. 2020. Disponível em: <<https://brcorte.com.br/blog/sobre/>> Acesso em: 20 jul. 2024

BRODERICK, G. A.; MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2618-2632, 1992.

BRYANT, M. P.; ROBINSON, I. M. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 84, n. 3, p. 605-614, 1962.

CARRO, M. D. La determinación de la síntesis de proteína microbiana em el rumen: comparación entre marcadores microbianos. **Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales**, v. 16, n. 1, p. 5-28, 2001.

CHEN, X. B.; HOVELL, F. D.; ORSKOV, E. R. *et al.* Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 63, p. 131-142, 1990.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. **International Feed Research Unit**, 1992. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/265323654_Estimation_of_Microbial_Protein_Supply_to_Sheep_and_Cattle_Based_on_Urinary_Excretion_of_Purine_Derivatives_-_An_Overview_of_Technical_Details> Acesso em: 20 jul. 2024.

CHIZZOTTI, F. H. M.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. de C. *et al.* Intake, apparent total tract digestibility and production of Nelore steers fed diets containing different proportions of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and sorghum silages. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2427-2436, 2005.

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

CZERKAWSKI, J. W.; FAULDS, C. Methods for determining 2-6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 25, n. 1, p. 45-55, 1974.

DEL VALLE, T. A. **Metabolismo de nitrogênio, de ácidos nucleicos e ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com lipídeos**. 107f. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2018.

DEWHURST, R. J.; HEPPEL, D.; WEBSTER, A. J. F. Comparison of energy and protein sources offered to beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-18, 2000.

FAICHNEY, G. J. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: **Digestion and Metabolism in the Ruminant** (ed. McDonald, I. W. and Warner, A. C. I.), p. 277–291. Armidale, N. S. W.: University of New England, 1975.

FIRKINS, J. L.; HRISTOV, A. N.; HALL, M. B. *et al.* Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 31-51, 2006.

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

FONTY, G.; GOUET, P. H. Plant cell wall degradation of anaerobic fungi. In: PRINS, R.A.; STEWART, C.S. (Eds). **Micro-organisms in ruminant nutrition**. Nottingham: Nottingham University, 1994. p. 97-112.

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; BELENGUER, A. *et al.* A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2211-2221, 2004.

GRENET, E.; JAMONT, J.; FONTY, G. *et al.* Kinetics study of the degradation of wheat straw and maize stem by pure cultures of anaerobic fungi observed by scanning electron microscopy. **Journal of Animal Science**, v. 2, p. 456-457, 1989.

HALL, M. B., HOOVER, W. H., JENNINGS, J. P. *et al.* A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n.12, p. 2931-2940, 2010.

HUTTON, K.; BAILEY F. J.; ANNISON, E. F. Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. **British Journal of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 165-173, 1971.

IPARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Impacts of the sources and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E22-E37, 2005.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 125-135, 2005.

KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. Board-invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 5, p. 1223-1231, 2008.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Editora UFSM, 2002.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2005. 1202 p.

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

MARAIS, J. P. **Use of markers in Farm Animal**. Metabolism and Nutrition. In: MELLO, J. P. F. D. (Ed.) CABI Publishing, Wallingford, UK, 2000. p. 255–277.

MCALLAN, A. B.; SMITH, R. H. Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 29, p. 467-474, 1973.

MCALLAN, A. B. The fate of nucleic acids in ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 41, p. 309, 1982.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorption and excretion in ruminants In: CHURCH, D. C. (Ed.) **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 4 ed. Carvallis: O&B Books, 1993. p. 172-201.

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

MERRY, R. J.; McALLAN, A. B. A. Comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 701-709, 1983.

NRC. National Research Council. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7th rev. ed. Washington, D. C., 1996.

NRC. National Research Council. **Nutritional Requirements of Beef Cattle**. Washington, D. C., 2000.

NRC. National Research Council. **Nutrient Requirements of the Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, D. C., 2001. 363 p.

NRC. National Research Council. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D. C., 2007. 384 p.

NRC. National Research Council. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8th rev. ed. Washington, D. C., 2016.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 3084-3095, 1999.

OLUBOBOKUM, J. A.; CRAIG, W. M.; NIPPER, W. A. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 2701-2710, 1988.

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2605-2617, 1992.

OWENS, F. N.; ZINN, R. Protein metabolism of ruminant animal. In: CHURCH, D.C. (Ed.). *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. **Englewood Cliffs: Simon & Schuster**, p. 227-249, 1988.

PALMER D. W.; PETERS JÚNIOR, T. Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate. **Clinical Chemistry**, v. 15, p. 891-901, 1969.

PUCHALA, R.; KULASEK, G. W. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and excretion of purine derivatives. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 72, p. 821-830, 1992.

RANILLA, M. J.; CARRO, M. D., Rusitec fermenters influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 537-544, 2003.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I. *et al.* Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1223-1234, 2000.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 199-208,

1974.

SENGER, C. C. D.; KOZLOSKI, G. V.; SANCHEZ, L. M. B. *et al.* Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 169-174, 2008.

SERRANO, R. D. C.; SIERRA, L. M. P.; CONEGLIAN, S. M. *et al.* Síntese microbiana no rúmen. **Revista PUBVET**, v. 5, n. 5, 2011.

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

STANGASSINGER, M.; CHEN, X. B.; LINDBERG, J. E. *et al.* Metabolism of purines in relation to microbial production. In: ENGELHARDT, W.V., LEONHARD-MAREK, S., BREVES, G., GIESECKE, D. (Eds.) **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**, p. 387-406, 1995.

TAMMINGA, S.; CHEN, X. B. Animal based techniques for the estimation of protein value of forages. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, & H. M. Omed (Eds.), **Forage evaluation in ruminant nutrition**, p. 215-231, 2000.

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

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

VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L. *et al.* (2020) **CQBAL 4.0. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos**. Disponível em: <<https://www.cqbal.com.br/#/>> Acesso em: 20 jul. 2024

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd ed. Cornell University Press: New York, USA, 1994. 476 p.

VARGAS, M. E. A. **Avaliação da torta de soja como fonte proteica para ruminantes: digestibilidade e oferta de proteína metabolizável em ovinos**. 53f. 2023. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2023.

WALLER, J.; MERCHEN, N.; HANSON, T. *et al.* Effect of sampling intervals and digesta markers on abomasal flow determinations. **Journal of Animal Science**, v. 50, p. 1122-1126, 1980.

WARNER, A. C. I. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 51, p. 789-820, 1981.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, p. 157-166, 1986.