



**CORALLINE BARBOSA DA SILVA**

**EFFECT OF CRUDE PROTEIN SOURCE ON IN VITRO  
RUMINAL AMMONIA ACCUMULATION AND  
NITROGEN PARTITION IN DAIRY COWS**

**LAVRAS - 2022**

**CORALLINE BARBOSA DA SILVA**

**EFFECT OF CRUDE PROTEIN SOURCE ON IN VITRO  
RUMINAL AMMONIA ACCUMULATION AND  
NITROGEN PARTITION IN DAIRY COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS - 2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Coralline Barbosa da.

Effect of crude protein source on ruminal ammonia  
accumulation and nitrogen partition in dairy cows / Coralline  
Barbosa da Silva. - 2022.

138 p. : il.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.  
Bibliografia.

1. Extrusado amido-ureia. 2. Nitrogênio ureico no leite. 3.  
Partição do nitrogênio. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

**CORALLINE BARBOSA DA SILVA**

**EFFECT OF CRUDE PROTEIN SOURCE ON IN VITRO RUMINAL  
AMMONIA ACCUMULATION AND NITROGEN PARTITION IN DAIRY  
COWS**

***EFEITO DA FONTE DE PROTEÍNA BRUTA SOBRE O ACÚMULO RUMINAL  
DE AMÔNIA IN VITRO E A PARTIÇÃO DO NITROGÊNIO EM VACAS  
LEITEIRAS***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 17 de AGOSTO de 2022.

Marcos Neves Pereira ....	.....UFLA
Marina de Arruda Danés	UFLA
Erick Darlisson Batista	UFLA
Rafael Fernandes	UFSJ
Milton Luiz Moreira Lima	UFG
Renata Apocalypse N. Pereira	EPAMIG

Prof. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS - 2022**

*“Ninguém pode fazer você se sentir inferior sem o seu consentimento”.*

(Eleanor Roosevelt, ex-primeira-dama norte-americana)

*"Aceitei contradições, lutas e pedras como lições de vida e delas me sirvo. Aprendi a viver."*

(Cora Coralina)

À minha mãe, Terezinha, e ao meu pai, Sinval, pela confiança e apoio sempre.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção constante.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de pós-graduação em Zootecnia (PPGZ) pela oportunidade de cursar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

À empresa Amireia Pajoara que possibilitou à condução do estudo.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Neves Pereira pela orientação.

A todos os professores que participaram da minha formação e que de alguma forma colaboraram com a elaboração e execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia e do Laboratório de Nutrição Animal, em especial ao Márcio pela atenção, ajuda, prontidão e disposição em todas as horas e principalmente pelas conversas de apoio e incentivo.

A todos os amigos de pós-graduação e graduação.

Às amigas de outros departamentos, Daiane e Vanessa pela amizade e apoio.

Ao grupo do leite em especial, pelo aprendizado e colaboração durante condução dos experimentos na fazenda e aos bolsistas pelo auxílio durante todas as fases do experimento, principalmente à Cassia, Ana Flávia e Cecília.

Ao meu amigo Ítalo Lima por sempre olhar por mim e pela prontidão em ajudar sempre que era preciso.

À Rayana Brito pelas orientações, auxílios e conversas.

Aos meus amigos que torcem pela minha vitória, não me deixaram desistir e são força em minha vida.

Ao meu pai, Sinval, minha mãe, Terezinha, e ao meu irmão, Nícollas, pelo apoio, incentivo e amor incondicional em todas as fases da minha vida, mesmo quando é difícil entender. Sem vocês nada disso seria possível.

A todos vocês minha **GRATIDÃO!**

## RESUMO GERAL

Dois experimentos avaliaram o efeito de fontes de proteína bruta (PB) no acúmulo de N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal *in vitro* e no desempenho da lactação, consumo de matéria seca (MS), digestibilidade, comportamento alimentar e de ruminação, N-ureia no leite e plasma e partição de nitrogênio (N) de vacas em lactação alimentadas com dietas com oferta excessiva de N. Avaliamos o efeito da composição dos produtos e tamanho de partícula na liberação do N. Frações de tamanho de partícula de ESU200 com variação na razão PB para amido causaram acúmulo similar de N-NH<sub>3</sub> *in vitro*. O acúmulo de N-NH<sub>3</sub> foi maior para Ureia, menor para farelo de soja (SBM) e intermediário para Ureia revestida com cera (WCU) e amido-ureia extrusada com 138% e 210% PB (EAU200). Dezesesseis vacas Holandesas (159 ± 117 dias no leite) foram alimentadas individualmente em uma sequência de 4 tratamentos em quadrados latinos 4×4, períodos de 21 dias. Os tratamentos foram: Controle (CTL, 16,4% PB na MS) e 3 dietas com 18,1% PB na MS com adição de N de SBM, Ureia ou EAU200. O N-ureico no plasma (PUN) foi medido em 0, 1,5, 3, 6, 9, 12, 15 e 21h pós-alimentação. A partição de N em leite, urina e fezes e a digestibilidade da dieta foram medidas pela coleta total de urina e fezes. O rendimento microbiano ruminal foi estimado pela alantoína na urina. Médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Os tratamentos não tiveram efeito no CMS, produção de leite, produção microbiana ruminal e digestibilidade da dieta ( $P > 0,28$ ). A dieta SBM aumentou a produção de proteína do leite em relação ao CTL e a EAU200 reduziu a produção de gordura do leite em relação ao SBM e Ureia. Dietas ricas em proteína aumentaram a proporção de ingestão diária à noite e não tiveram efeito sobre os comportamentos alimentares e de ruminação. O N-ureia do leite (MUN) e o PUN foram menores em CTL (15,6 e 17,1 mg/dL), maiores em EAU200 (21,3 e 22,5 mg/dL) e intermediários em SBM (19,3 e 21,6 mg/dL) e Ureia (19,4 e 21,2 mg/dL). O padrão de variação do PUN ao longo do tempo diferiu por tratamento ( $P < 0,01$  para a interação entre tratamento e tempo). Vacas alimentadas com alto teor de PB apresentaram menor eficiência de N para a lactação (22,9 vs. 25,2% da ingestão de N) e excretaram mais N-ureia na urina (162 vs. 121 g/d) do que CTL. O N urinário foi maior na Ureia (317 g/d e 43,5% da ingestão de N) do que no CTL (246 g/d e 37,3% do N-ingerido) e SBM (274 g/d e 36,9% da ingestão de N), e intermediário e sem diferença das outras 3 dietas no EAU200 (300 g/d e 41,0% do N-ingerido), refletindo a classificação das rações com base no acúmulo de N-NH<sub>3</sub> *in vitro*. A oferta excessiva de PB na dieta reduziu a eficiência da utilização de N para a lactação e aumentou o N urinário, independentemente da fonte de PB.

**Palavras-chave:** amido-ureia extrusado, N-ureia do leite, partição de nitrogênio, N-ureia-plasmática, ureia de liberação lenta, nitrogênio urinário.

## GENERAL ABSTRACT

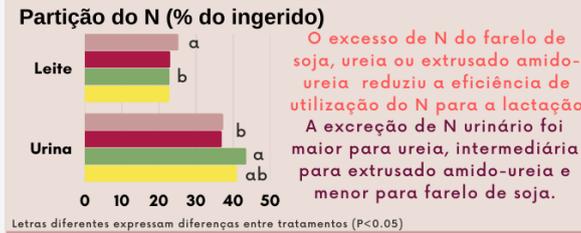
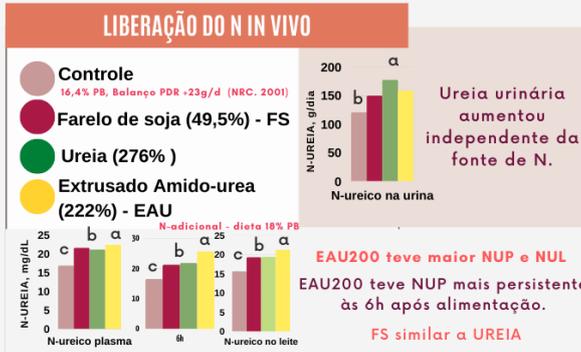
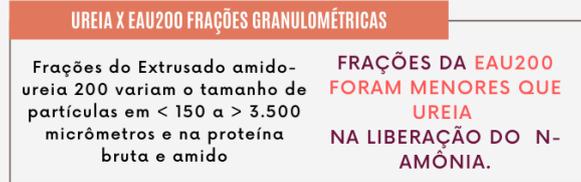
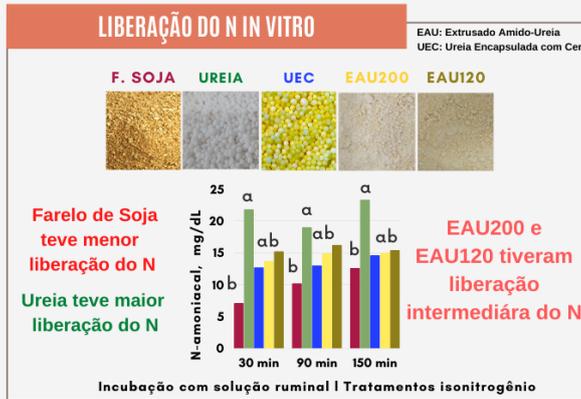
Two experiments evaluated the effect of crude protein (CP) sources on N-NH<sub>3</sub> accumulation in rumen fluid *in vitro* and on lactation performance, dry matter (DM) intake (DMI), digestibility, eating and rumination behaviors, urea-N in milk and plasma, and N partition of lactating cows fed diets with excessive N supply. We evaluated the effect of products composition and particle size on nitrogen (N) release. Particle size fractions of ESU200 with variation in CP to starch ratio caused similar N-NH<sub>3</sub> accumulation *in vitro*. The N-NH<sub>3</sub> accumulation *in vitro* was highest for urea, lowest for soybean meal (SBM) and intermediate for wax-coated urea (WCU) and extruded starch-urea with 138% and 210% CP (ESU200). Sixteen Holstein cows (159 ± 117 days in milk) were individually fed a sequence of 4 treatments in 4×4 Latin squares, with 21-d periods, and 14 d of adaptation. Treatments were: Control (CTL, 16.4% CP in DM) and 3 diets with 18.1% CP in DM with added N from SBM, urea, or ESU200. Plasma urea-N (PUN) was measured at 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, and 21 h post-feeding. Partition-N into milk, urine, and feces and diet digestibility were measured by total collection of urine and feces. Rumen microbial yield was estimated by allantoin in urine. Treatment means were compared by tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Treatments had no effect on DMI, milk yield, rumen microbial yield, and diet digestibility ( $P > 0.28$ ). Diet SBM increased milk protein yield relative compared to CTL and ESU200 reduced milk fat yield relative to SBM and Urea. High protein diets increased the proportion of daily intake at night and had no effect on eating and rumination behaviors. The milk urea-N (MUN) and PUN were lowest on CTL (15.6 and 17.1 mg/dL), highest on ESU200 (21.3 and 22.5 mg/dL), and intermediate on SBM (19.3 and 21.6 mg/dL) and urea (19.4 and 21.2 mg/dL). The pattern of PUN variation over time differed by treatment ( $P < 0.01$  for the interaction between treatment and sampling time). Cows fed high CP had lower N efficiency for lactation (22.9 vs. 25.2% of N intake) and excreted more urea-N in urine (162 vs. 121 g/d) than CTL. Urine-N was higher on urea (317 g/d and 43.5% of N intake) than on CTL (246 g/d and 37.3% of N intake) and SBM (274 g/d and 36.9% of N intake), and intermediate and with no difference from the other 3 diets on ESU200 (300 g/d and 41.0% of N intake), reflecting the ranking of feeds based on N-NH<sub>3</sub> accumulation *in vitro*. Excessive dietary CP supply reduced the efficiency of N utilization for lactation and increased urine-N, independently of CP source.

**Key words:** extruded starch-urea, milk urea-N, nitrogen partition, plasma urea-N, slow-release urea, urine nitrogen.

# RESUMO GRÁFICO

## FONTES DE PROTEÍNA PARA VACAS LEITEIRAS

### DIFERENÇAS NA LIBERAÇÃO DO NITROGÊNIO



Letras diferentes expressam diferenças entre tratamentos (P<0.05)

**A OFERTA EXCESSIVA DE PB NA DIETA REDUZIU A EFICIÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE N PARA A LACTAÇÃO E AUMENTOU O N URINÁRIO, INDEPENDENTEMENTE DA FONTE DE PB.**

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

FIGURA 1 - Visão geral dos pools e fluxos de nitrogênio em ruminantes em lactação.	21
FIGURA 2 - Vias de assimilação de amônia por bactérias ruminais em alta ou baixa concentrações de amônia no fluido.....	28
FIGURA 3 - Conexão entre o ciclo da ureia e o metabolismo energético de ruminantes. ....	30
FIGURA 4 - Estrutura molecular da amilose e amilopectina.....	43
FIGURA 5 - Representação esquemática da estrutura lamelar de um grânulo de amido .....	44
FIGURA 6 - Estrutura química da molécula de ureia. ....	46

### SEGUNDA PARTE

FIGURE 1 - Ammonia-n (N-NH <sub>3</sub> ) concentration in rumen fluid <i>in vitro</i> . a) urea (●), extruded starch-urea with 210% (esu200. ●) and 138% (esu120. ●) crude protein (cp), wax-coated urea (wcu, 249% cp. ●), and soybean meal (sbm, 47.5% cp. ●). b) particles of esu200 retained on screens with mesh diameters (μm) 3,500 (●), 2,000 (●), 1,180 (●), 600 (●), 300 (●), 150 (●), and pan (●). <i>p-values</i> : < 0.01 for treatment, < 0.01 for time, < 0.01 for the interaction between treatment and time. means with different superscripts differ at $p \leq 0.05$ (slice).....	134
FIGURE 2 - Plasma urea-N (PUN) over time on treatments control (CTL, ●) and with additional protein from soybean meal (SBM, ●), urea (●), and extruded starch-urea (ESU200, ●). $P < 0.01$ for treatment, $P < 0.01$ for time, $P < 0.01$ for the interaction between treatment and time. Cows were fed once per day at 07:00 h.....	135
FIGURE 3 - Scanning electron microscopy of extruded starch urea with 138% (A, B, C) and 210% (D, E, F) crude protein in dry matter (47X, 1000X, 2700X, respectively).....	136

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

TABELA 1 - Propriedades granulares de amidos .....	45
TABELA 2 - Concentração de nitrogênio amoniacal e síntese de proteína microbiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de grãos não-processados mais ureia ou EAU nos Estados Unidos.....	49
TABELA 4 - Efeito do grau de gelatinização de amido ureia extrusados com 45% PB e diferentes fontes de amido (sorgo, batata, milho, trigo) sobre a digestibilidade da matéria seca (DMS), digestibilidade da proteína bruta (DPB), relação acetato e propionato ruminal e balanço de N .....	50
TABELA 5 - Caracterização nutricional da mistura de milho e ureia e ureia extrusada (% da matéria seca). .....	51
TABELA 6 - Utilização de nitrogênio de EAU, grão expandido + ureia e grão moído + ureia <i>in vitro</i> pela determinação de proteína bacteriana (precipitável em ácido tricloroacético) e nitrogênio amoniacal <sup>a</sup> .....	56
TABELA 7 - Teor de proteína bruta dos produtos de amido ureia extrusado.....	57
TABELA 8 - Efeito de misturas processadas por extrusão ou não processadas de grão e ureia no pH ruminal, amônia ruminal e concentração de amônia no sangue <sup>1</sup> .....	61
TABELA 9 - Comportamento diurno do nitrogênio amoniacal no rúmen (N-NH <sub>3</sub> ) de novilhos suplementados com diferentes fontes de proteína. ....	73
TABELA 10 - Valores de n-amônia e agv's ruminais para farelo de soja, ureia e EAU em diferentes relações amido ureia. ....	77

### SEGUNDA PARTE

TABLE 1. Proportion of particles retained on screens varying in mesh diameter (% of total), geometrical mean particle size (GMPS), surface area, and concentrations of crude protein (CP) and starch (% of dry matter) of extruded starch-urea 200 (ESU200) and 120 (ESU120).....	126
TABLE 2. Composition of diets in ingredients and nutrients (% of dry matter) on treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200).....	127
TABLE 3. Composition of feed ingredients.....	128
TABLE 4. Particle size distribution (% retained on screens), geometrical mean particle size (GMPS), and surface area of urea and extruded starch-urea (ESU200). Mean ± standard deviation of 4 composite samples (1/period).....	128
TABLE 5. Dry matter intake (DMI), lactation performance, feed efficiency, body condition score (BCS), and body weight (BW) on treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200).....	129
TABLE 6. Milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N at 0,1.5, 3, 6, 9, 12,15 and 21 h post-feeding, area under the curve (AUC), duration of PUN ≥ 21 mg/dL, N partition, urine N, and the fractional rate of urea reabsorption (kRE) on treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal	

	(SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200).....	130
TABLE 7.	Linear regressions between plasma urea nitrogen (PUN, mg/dL) at 0,1.5, 3, 6, 9, 12, 15 and 21 h post-feeding and milk urea nitrogen (MUN, mg/dL). PUN = Intercept + Slope MUN.....	131
TABLE 8.	Eating and rumination behaviors, intake during the day, and particle size sorting behavior on treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200).....	132
TABLE 9.	Total-tract apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), and crude protein (CP), digestible OM intake (DOMI), excretion of feces and urine, and urinary allantoin excretion (Allan) on treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200).....	133

## SUMARIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1. Ureia na alimentação de ruminantes.....	18
2.2. Metabolismo do nitrogênio em ruminantes .....	19
2.3. Eficiência do uso do nitrogênio em ruminantes .....	22
2.4. Metabolismo ruminal e fatores que determinam a concentração de NH <sub>3</sub> .....	23
2.4.1. Proteína dietética .....	23
2.4.2. Bactérias ureolíticas ruminais e inibidores de ureases.....	24
2.4.3. Absorção e reciclagem de NH <sub>3</sub> pelo epitélio ruminal .....	25
2.4.4. Assimilação de NH <sub>3</sub> para síntese de proteína microbiana .....	27
2.5. Metabolismo hepático e ciclo da ureia .....	29
2.5.1. Relação entre depressão de consumo e NH <sub>3</sub> no sistema portal.....	30
2.6. Metabolismo de N pós-prandial e associações entre NUP, NUL e N-urinário .....	33
2.6.1. Metabolismo renal e variações diurnas entre NUP e NUL .....	35
2.6.2. Reabsorção de ureia renal e ingestão de água .....	36
2.6.3. Proteína bruta da dieta e volume urinário .....	37
2.7. Limitação da ureia para ruminantes e ureia de liberação lenta .....	39
2.8. Amido-ureia extrusado .....	40
2.8.1. Definição, propósito e panorama histórico .....	40
2.8.2. Características dos ingredientes para fabricação da amido-ureia extrusado	
41	
2.8.2.1. Amido: caracterização molecular e granular .....	41
2.8.2.2. Estrutura química da ureia.....	46
2.8.3. Extrusão patenteada de amido-ureia .....	46
2.8.3.1. A gelatinização do amido ureia extrusado .....	47
2.8.3.2. Relação amido:ureia do amido ureia extrusado .....	52
2.8.3.3. Amido ureia extrusado e processamento físico.....	57
2.9. Efeitos comparativos do extrusado ureia-amido, ureia e proteína vegetal em ruminantes .....	58
2.9.1. Efeito das fontes proteicas na toxicidade por amônia .....	58
2.9.2. Amido ureia extrusado e “proteção de cocho” .....	62
2.9.3. Efeito das fontes no consumo, desempenho produtivo e digestibilidade .....	63
2.9.3.1. Vacas leiteiras e amido ureia extrusado.....	65
2.9.4. Efeito das fontes proteicas nos parâmetros ruminais .....	69

2.9.4.1. Relação pH e amônia ruminal .....	69
2.9.4.2. Efeito das fontes proteicas no padrão fermentativo, N-amônia ruminal e síntese de proteína microbiana.....	71
2.9.5. Efeito das fontes proteicas nos parâmetros sanguíneos e N-ureico no leite..	80
2.9.6. Efeito das fontes proteicas no Balanço de nitrogênio.....	83
2.10. Desempenho de bovinos com ureia encapsulada com cera.....	85
2.11. Produtos de ureia de liberação lenta <i>in vitro</i> para ruminantes .....	88
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>105</b>
<b>ARTIGO: Effect of crude protein source on in vitro ruminal ammonia accumulation and nitrogen partition in dairy cows .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE A Índice de temperatura e umidade.....</b>	<b>137</b>
<b>APÊNDICE B Correlação entre N-ureico no leite x N-ureico no plasma.....</b>	<b>138</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

As fontes de nitrogênio não-proteico (NNP), como a ureia, podem ser usadas na dieta de ruminantes para suprir a exigência de proteína bruta ( $PB = N \times 6,25$ ) das bactérias ruminais (RUSSEL *et al.*, 1992; VIRTANEN, 1966). Fontes de NNP possuem alto equivalente proteico e podem ter baixo custo por unidade de N comparativamente a concentrados proteicos de origem vegetal ou animal. No entanto, NNP tem alta taxa de hidrólise ruminal o que pode reduzir a incorporação da amônia na proteína microbiana (BUNTING *et al.*, 1987; TAYLOR-EDWARDS *et al.*, 2009a). O desacoplamento entre as taxas de hidrólise da ureia e incorporação microbiana da amônia pode induzir perda excessiva de N-amoniacal do rúmen para o sangue e alta excreção de N nas fezes e urina (BRODERICK; REYNAL, 2009; LAPIERRE; LOBLEY, 2001; SATTER; SLYTER, 1974; TAYLOR-EDWARDS *et al.*, 2009a). Alta PB dietética aumenta perdas de N urinário e fecal reduz a eficiência de uso do N dietético para síntese de proteína do leite (CALSAMIGLIA *et al.*, 2010; COLMENERO; BRODERICK, 2006ab; MUTSVANGWA *et al.* 2016) e tem impacto ambiental negativo por lixiviação, escoamento, denitrificação no solo a óxido nitroso e volatilização de amônia (DJKISTRA *et al.*, 2013; FIRKINS; REYNOLDS, 2005; GERBER *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2012; POWELL *et al.*, 2013).

Várias tecnologias têm sido utilizadas para reduzir a taxa de hidrólise da ureia no rúmen, como o encapsulamento com ceras (SALAMI *et al.*, 2020; 2021), poliuretano (XIN *et al.*, 2010), cloreto de cálcio (CASS; RICHARDSON, 1994; CHERDTONG *et al.*, 2010; GOLOMBESKI *et al.*, 2006; HUNTINGTON *et al.*, 2006), sulfato de cálcio (CHERTONG *et al.*, 2014), gordura (HIGHSTREET *et al.*, 2010) ou a complexação da ureia por extrusão com amido (MUHRER *et al.*, 1968; HELMER *et al.*, 1970ab). Alguns fatores podem afetar a funcionalidade de ureia extrusada com amido, como o grau de gelatinização do amido (BARTLEY *et al.*, 1981; HELMER *et al.*, 1970a; KOZERSKI *et al.*, 2021a; ; STILES *et al.*, 1970; TELLER; GODEAU, 1984; 1985; 1986), o processamento físico determinante do tamanho de partícula após a extrusão e secagem (PIRES *et al.*, 2004a; TEIXEIRA *et al.*, 1999) e a relação entre amido e N no produto (SALVADOR *et al.*, 2004; SHIEHZADEH; HARBERS, 1975; HARBERS; SHIEHZADEH, 1974; HELMER *et al.*, 1970ab). Estudos *in vitro* com ureia revestida de cera têm demonstrado que a liberação do N neste tipo de produto é intermediária ao farelo de soja e à ureia (GONÇALVES *et al.*, 2015; GALO *et al.*, 2003; MARICHAL *et al.*, 2009; PINOS-RODRIGUEZ *et al.*, 2010). O efeito de NNP de liberação lenta no rúmen sobre o desempenho animal é controverso, apesar de algumas pesquisas sugerirem a possibilidade de

ganho em eficiência alimentar em vacas leiteiras (SANTOS *et al.*, 2011; SALAMI *et al.*, 2021) e em bovinos de corte (SALAMI *et al.*, 2020). Ureia revestida com cloreto de cálcio também promoveu redução do consumo de matéria seca sem afetar a produção de leite (GOLOMBESKI *et al.*, 2006). As ureias de liberação lenta também apresentam melhores características de manuseio industrial pela redução da higroscopicidade (BARTLEY; DEYOE, 1972) e parecem ser mais palatáveis (HELMER *et al.*, 1970b; STILES *et al.*, 1970; THOMPSON *et al.*, 1972) do que ureia.

Em geral os estudos *in vitro* reforçam a função de liberação mais lenta das ureias revestidas, porém apresentam resultados sutis. Em contrapartida estudos *in vivo* não refletem efeito positivo dessa liberação lenta inicial e raras pesquisas demonstram melhoria do desempenho produtivo dos ruminantes. Alguns efeitos são levantados para explicar essas diferenças, como a reciclagem de N em ruminantes (GALO *et al.*, 2003; LAPIERRE; LOBLEY, 2001; SANTOS *et al.*, 2011) ou a falta de sincronismo da degradação dos carboidratos e da PB da dieta (CABRITA *et al.*, 2006). O objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito de Extrusado Amido-Ureia (EAU) sobre o N-ureico no plasma (NUP) e o balanço de N em vacas leiteiras. Assim, dois experimentos foram projetados para avaliar a dinâmica de liberação do N de diferentes fontes proteicas incluindo EAU (200% PB):

No experimento 1, em uma primeira fase nós objetivamos caracterizar o produto de EAU com alta relação proteína bruta:amido (PB/ST) e avaliar o acúmulo do N-amônia liberado em fluido ruminal *in vitro* comparada a EAU de menor relação PB/ST e outras fontes de N. Os tratamentos foram (% PB na matéria seca): ureia (Urea. 260%), farelo de soja (SBM. 47,5%), ureia revestida com cera (WCU, 249%) e EAU200 (210%) e EAU120 (138%). Amostras foram analisadas para PB, amido, calculada a relação PB/ST e incubadas na mesma quantidade de N em frascos com fluido ruminal diluído em tampão saliva por quatro horas. Em uma segunda fase objetivamos caracterizar as frações granulométricas da EAU200 e investigamos se a diversidade dos tamanhos de partículas do produto poderia influenciar em diferenças na taxa de liberação do N do produto e comparamos à ureia. As frações granulométricas da EAU200 foram obtidas em agitador berkel, com peneiras de telas entre 3.500 e 150  $\mu\text{m}$ . Cada amostra composta das batidas no agitador foi analisada para PB, amido e incubada simultaneamente e conforme a primeira fase.

No experimento 2 investigamos o desempenho da lactação, consumo de matéria seca (MS), digestibilidade, comportamento alimentar e de ruminação, N-ureia no leite e plasma e partição do N da EAU200, elucidando as excreções de N via leite, urina e fezes e o metabolismo

da ureia de vacas em meio da lactação comparada à outras fontes proteicas em dietas com oferta excessiva de N. Os tratamentos foram uma dieta controle (CTL) com balanço positivo de proteína degradável no rúmen (PDR) (+ 23 g/d. NRC 2001) e três dietas com fornecimento excessivo de PDR a partir de farelo de soja (SBM. 51,6% PB), Ureia (Urea. 276% PB) ou EAU (EAU. 222% PB. Amireia Pajoara<sup>®</sup>). Nesse estudo as dietas foram formuladas para suprir proteína degradável no rúmen constantes e superiores à capacidade do rúmen de capturar amônia, mantendo crescimento, fermentação e rendimento microbiano semelhantes a fim de assegurar consumo de matéria seca e condição corporal e avaliar o efeito sistêmico pós-prandial das diferenças de degradação ruminal das fontes de N. Nós não desejávamos que diferenças no desempenho das vacas fossem explicadas por mudanças no suprimento de energia da dieta ou por limitação do suprimento de N e proteína verdadeira ao rúmen a fim de que mudanças pós-prandiais fossem reflexo das diferenças da cinética do N dos ingredientes no rúmen.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ureia na alimentação de ruminantes

A ureia para suprir PB na dieta de ruminantes foi um marco da nutrição proteica (SCHWAB; BRODERICK, 2017). A capacidade do ruminante em sintetizar proteínas a partir de ureia foi teorizada por Zuntz em 1891 e determinado que o ingrediente era capaz de ser retido nos tecidos dos animais. Loosli *et al.* (1949) observaram que esse ingrediente era capaz de produzir grandes quantidades de aminoácidos essenciais para o ruminante. O estudo clássico de Virtanen (1966) em dieta livre de proteína verdadeira, contendo carboidratos purificados e ureia como a única fonte de N, demonstrou que ureia era capaz de sustentar rendimento razoável de leite, vacas apresentaram produção total na lactação de até 4.325 kg (1932 a 4325 kg).

O ruminante possui simbiose com microrganismos do rúmen que são capazes de sintetizar proteína microbiana a partir de N da ureia. Essa massa microbiana produzida ao chegar no intestino delgado do hospedeiro é degradada a aminoácidos e absorvidos pelo epitélio. Dessa forma enfatiza-se o potencial de reduzir a competição por proteína vegetal verdadeira destinada aos humanos, ou outras criações, e aumenta as opções de fontes proteicas nas dietas, importante em situações em que há aumento no valor dos insumos proteicos da alimentação. Além disso é proposto que a inserção de coprodutos na dieta de ruminantes reduz a pegada de carbono da ração por unida de leite pois substitui a soja que apresenta alta emissão de CO<sub>2</sub>-equivalente durante a cadeia de cultivo e processamento, e no caso de ureia de liberação lenta também por melhoria da eficiência alimentar (SALAMI *et al.*, 2020; 2021; GROSSI *et al.*, 2020).

As recomendações práticas de inclusão de ureia na dieta proposta há anos atrás são de 3,0% do concentrado ou 1,0% da dieta total, limite máximo em até 27% do N requerido, sem problemas relacionados à toxicidade (REID, 1953). Apesar dessa recomendação ser fundamentada em experimentos de longa data e com grande número de vacas, essas podem ser contestadas já que eram animais menos produtivos e fornecimento em separado para concentrado e forragem. Entretanto Broderick e Reynal (2009) estudando vacas holandesas de 39 kg/d de leite e 23 kg/d de consumo de matéria seca (CMS), observaram consumo e desempenho da lactação similares em inclusão de até 0,84% de ureia na dieta (194 g/dia do produto) quando substituído PDR do farelo de soja por ureia em dieta completa com 16,5% de PB. Esses autores observaram ainda que a inclusão de 1,31% de ureia, apesar de não promover sintomas de toxicidade grave, induziu a redução do consumo e desempenho em leite das vacas, respectivamente queda de 1,1 kg/d e 2,8 kg/d. Boucher *et al.* (2007) não observaram diferenças para CMS (média: 20,8 kg/d) e produção de leite (média: 33,1 kg/d) de vacas suplementadas

com 0,0, 0,3, 0,6 e 0,9% de ureia sobre uma dieta basal com balanço de PDR negativo (-167 g/d, 14,9% de PB, NRC, 2001) e fornecida como dieta total. Nesse estudo a amônia ruminal e nitrogênio do leite (NUL) aumentaram linearmente ( $P < 0,01$ ) e a máxima de síntese microbiana efeito quadrático ( $P < 0,01$ ) e ocorreu em 0,6% de inclusão da ureia (BOUCHER *et al.*, 2007), aparentemente associada ao teor de 16,5% de PB da dieta. Valores em ambos são próximos ao sugerido por Reid (1953) para segurança prática de inclusão de ureia nas dietas.

A inclusão dietética para ureias de liberação lenta seguem as mesmas recomendações da ureia, ajustada para teor de N-ureia no produto, no entanto essa indicação pode estar subestimada já que se espera modificação da taxa de liberação da amônia ( $\text{NH}_3$ ) ruminal (KOZERSKI *et al.*, 2021b; MORAES *et al.*, 2009). Além de considerar manutenção do consumo e desempenho da lactação se torna necessário considerar ainda o impacto das excreções de N nas excretas desses animais no sistema produtivo com a inclusão de ureia.

## 2.2. Metabolismo do nitrogênio em ruminantes

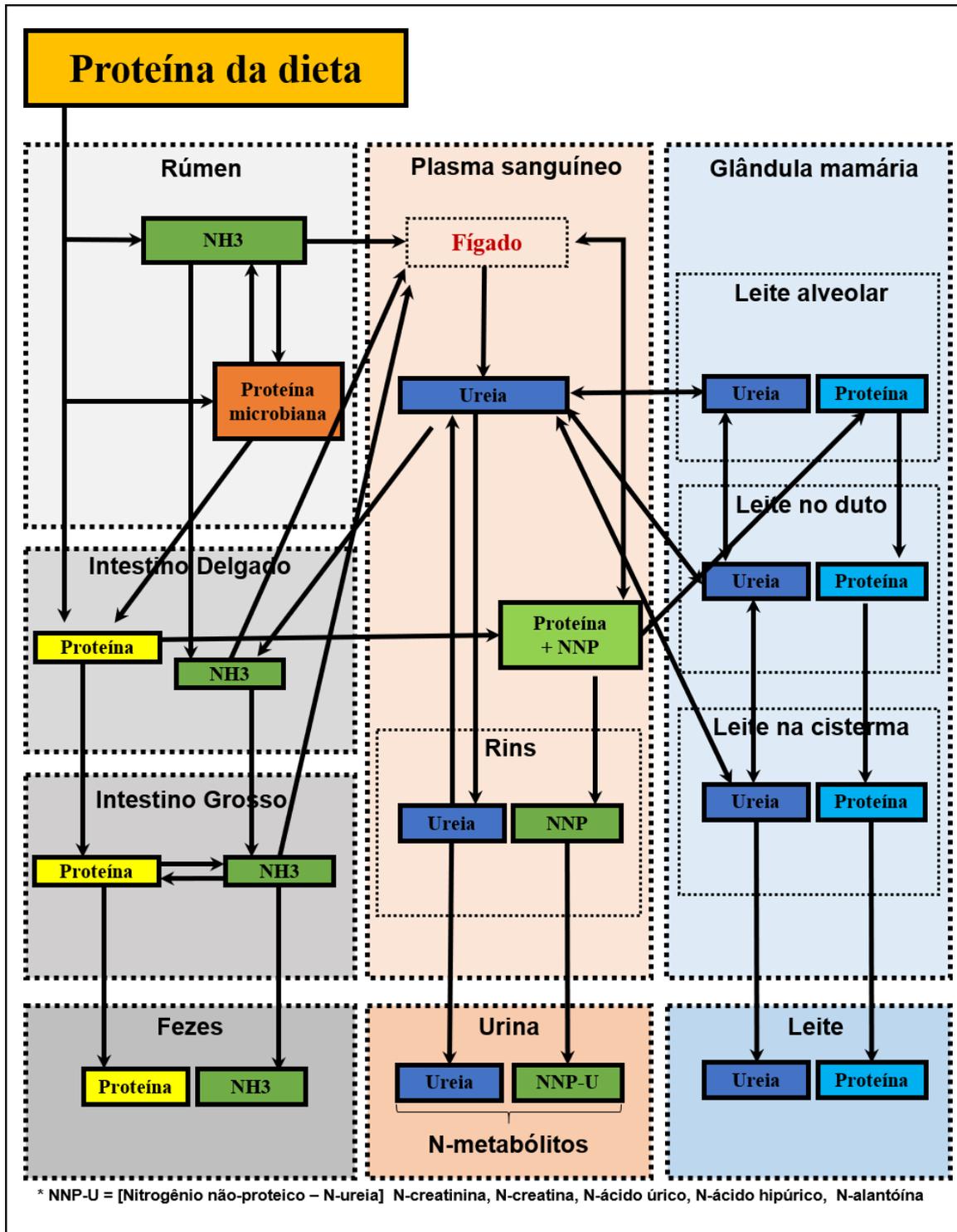
Modelos têm sido propostos para descrever os *pools* e os fluxos do N em ruminantes. O modelo adaptado de Nolan e Leng (1982) é descrito na Figura 1. A quantidade de N ingerido, produto do teor de N na dieta e do consumo de matéria seca, determina o fluxo de entrada de N no sistema (g/d). O rúmen é um *pool* importante no organismo animal pois altera a composição da dieta e modifica o substrato que chega ao intestino para absorção de aminoácidos, contribuindo com proteína metabolizável para o ruminante oriunda de bactérias, e pode ser responsável pela baixa eficiência do uso do N (EUN).

O *Nutrients requirements of dairy cattle* (NASEM, 2021) divide a PB ( $\text{N} \times 6,25$ ) da dieta como proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não-degradável (PNDR) no rúmen. A PDR é uma estimativa da quantidade de N para suprir exigências do rúmen. Nitrogênio não-proteico (NNP) é considerado fração A ou solúvel, mas parte pode sofrer ação da taxa de passagem que agora é estática no modelo NASEM (2021) melhorando o viés da estimativa que subestimava a PDR do modelo anterior. Em resumo, a proteína verdadeira na PDR é degradada por proteases a aminoácidos, peptídeos e  $\text{NH}_3$  e ureia alimentar é convertida em  $\text{NH}_3$ . Esses substratos são usados pelos microrganismos para síntese de proteína microbiana. A amônia pode ser usada no rúmen e intestino grosso para síntese microbiana e parte da proteína verdadeira pode passar pelo rúmen e ser digerida, absorvida como aminoácidos no intestino delgado ou ser perdida nas fezes. A síntese de proteína microbiana é estimada a partir dos carboidratos digestíveis (FDN e amido) mas não contabiliza a participação de açúcares e pectina, melhorando o viés gerado pelo valor de nutrientes digestíveis totais (NDT, NRC, 2001).

A recomendação é formular as dietas para conter PDR 10% a 12%. O modelo não distingue possíveis diferenças na conversãomicrobiana entre os tipos de PDR dos alimentos: ureia *versus* proteína de origem verdadeira.

A proteína que desapareceu do lúmen do intestino para os tecidos do animal é a Proteína Metabolizável (PM). A principal mudança no novo modelodeformulação é que aminoácidos absorvidos tem diferentes eficiências de uso para síntese de leite, após desconto da manutenção (NASEM, 2021). A  $\text{NH}_3$  não utilizada pelas bactérias ruminais é absorvida pelo sangue e transformada em ureia pelo fígado. A ureia do sangue pode retornar ao rúmen para crescimento microbiano por meio de transferência via saliva ou pela parede do rúmen, como também ocorre no intestino grosso. Entretanto o NASEM (2021) permanece não contabilizando diretamente essa fração para suprimento de N para o rúmen. Os rins são a principal via de depuração e excreção de ureia sistêmica e influenciam a concentração de N no sangue (AIRES, 2012; THORTON; WILSON, 1982). A ureia pode ser transferida por transporte passivo para a glândula mamária e ser excretada no leite (SPEK *et al.*, 2012; LAPIERRE; LOBLEY, 2001). O metabolismo do N ruminal, hepático e renal serão melhor detalhados nos próximos tópicos assim como os principais fatores que os afetam.

Figura 1- Visão geral dos *Pools* e fluxos de nitrogênio em ruminantes em lactação.



Fonte: Adaptado de Nolan e Leng (1982)

### 2.3. Eficiência do uso do nitrogênio em ruminantes

A eficiência do uso do nitrogênio ( $EUN = g \text{ de N-leite}/g \text{ N-ingerido}$ ) é altamente variável para vacas leiteiras 15 a 30% (CALSAMIGLIA *et al.*, 2010). Em sistemas norte americanos a EUN média é de 24,7% e para vacas em sistemas europeus 27,7% (HUHTANEN; HRISTOV, 2009). Nessa metanálise Huhtanen e Hristov (2009) observaram que vacas americanas produziram 6 kg/d de leite a mais que as europeias, em consumo de dieta com 17,8% de PB contra 16,5% respectivamente, associando o aumento da PB dietética com aumento da produção de leite. Entretanto a melhoria da EUN está associada a redução da PB da dieta e em menor proporção ao aumento da síntese de proteína do leite em dietas com mesmo teor proteico, esses fatores também foram reforçados por Dijkstra *et al.* (2013). Em contrapartida a degradabilidade da PB não pareceu ser significativa para o modelo na determinação da EUN (HUHTANEN; HRISTOV, 2009).

É desejável que a melhora do EUN esteja acompanhada com máxima produção de leite. Dados citados por Calsamiglia *et al.* (2010) fornecem um paralelo entre sistemas americanos de vacas com alta EUN (32,8%) vs. Baixa (22,0%). Vacas em alta EUN produziam mais leite consumindo dietas com maior proporção de carboidratos não-fibrosos e menor PB comparadas as vacas de baixa EUN, e indica que balanceamento da dieta determina eficiência do N, rendimento de leite e EUN. Já em sistemas europeus a alta EUN (29,8%) está associada ao uso de forrageiras de melhor qualidade e maior CMS, rendimento em leite e EUN, nesse sistema EUN baixa foi de 25,5%. A PDR deve ser suficiente para os microrganismos ruminais, mas é desejável que não exceda  $NH_3$  (HUHTANEN; HRISTOV, 2009). O metabolismo ruminal da PB é considerada a maior causa da baixa EUN em ruminantes, resultando em perda de N fecal e urinário que pode exceder 70% do N consumido (TAMMINGA, 1992). Fatores como a qualidade das forrageiras, taxa de hidrólise da proteína ruminal, síntese microbiana, teor e qualidade da PNDR e aminoácidos absorvidos no sangue podem influenciar a EUN (CALSAMIGLIA *et al.*, 2010).

A EUN melhora significativamente com a redução da ingestão de N ou aumento nos níveis de produção (DIJKISTRA *et al.*, 2013). Devido a oscilações no manejo alimentar que ocorrem na prática, nutricionistas mantêm níveis mais altos de PB da dieta na tentativa de amenizar riscos de queda da produção de leite. Outro ponto é relacionado aos modelos que não conseguem determinar com precisão as exigências ou modelar algumas características fisiológicas, como a reciclagem, que contribui para suprimento de PDR ao rúmen ou síntese de proteína ruminal (REYNOLDS; KRISTENSEN, 2008). O aumento da PB da dieta melhora o

rendimento de leite, mas o teor de PB ideal para rendimentos é diferente do teor de PB para máxima EUN (HUHTANEN *et al.*, 2011). A baixa eficiência tem implicações no desempenho produtivo, econômico e na emissão de contaminantes ao meio ambiente.

O NRC (2001) superestimava a quantidade de leite permitida por PM em rebanhos com alto nível produtivo e a conversão da PM em leite era fixa para todos os aminoácidos que se expressavam como porcentagem da PM. O NASEM (2021) foi priorizado para melhorar a estimativa da eficiência de uso de alguns aminoácidos pela glândula mamária para síntese do leite, tendo capacidades variáveis. O novo modelo busca a melhoria da eficiência de uso dos aminoácidos para possíveis reduções do teor de PB dietética, e conseqüentemente redução de custos econômicos com proteína, e enfatiza o aumento da eficiência de conversão em leite com redução da excreção de nutrientes no meio ambiente.

#### 2.4. **Metabolismo ruminal e fatores que determinam a concentração de NH<sub>3</sub>**

O reservatório de NH<sub>3</sub> no rúmen é oriunda da PB da dieta, da reciclagem de ureia via saliva e pelo epitélio ruminal (PATRA, 2015). A assimilação de N-NH<sub>3</sub> pelas bactérias ruminais, o efluxo para o omaso e o transporte NH<sub>3</sub> pelo epitélio ruminal para o sangue podem refletir em redução do valor absoluto de NH<sub>3</sub> no meio, enquanto a degradação de bactérias por protozoários pode elevar esses níveis (BACH *et al.*, 2005). Abaixo serão discutidos alguns desses fatores: proteína da dieta, bactérias ureolíticas e inibidores, assimilação de N pelas bactérias, absorção via epitélio e reciclagem epitelial de N.

##### 2.4.1. **Proteína dietética**

Os ruminantes são menos eficientes em utilizar proteína de alto valor nutricional na dieta pois grande parte dessa proteína é convertida em NH<sub>3</sub> durante a degradação ruminal pelos microrganismos. Para animais consumindo dieta balanceada a primeira fonte de NH<sub>3</sub> ruminal é a proteína vinda da dieta. O teor de PB da dieta consumida (OLMOS; BRODERICK, 2006a) e a extensão da degradação dessa proteína no rúmen são importantes definidores da concentração de NH<sub>3</sub> ruminal (BRITO; BRODERICK, 2007b). É estimado que 50 a 80% do *pool* de N-bacteriano no rúmen é derivado de NH<sub>3</sub> e 20 a 50% é derivado de aminoácidos pré-formados (OWENS; BERGEN, 1983) indicando a importância da dinâmica do N ruminal (AHVENJARVI *et al.*, 2018).

Do ponto de vista prático é assumido que todas as bactérias do rúmen são capazes de usar NH<sub>3</sub> para seu crescimento (RUSSEL, 2002), no entanto a adição de aminoácidos e peptídeos estimulou a síntese microbiana em fermentadores comparado a apenas amônia

(ARGYLE; BALDWIN, 1989) indicando um efeito aditivo de fontes verdadeiras de PDR. Em resumo, concentrações de  $\text{NH}_3$  no rúmen são principalmente oriundas de PB da dieta, vinda tanto de NNP quanto da proteína verdadeira nos alimentos, não apenas de ureia.

#### 2.4.2. Bactérias ureolíticas ruminais e inibidores de ureases

Seres procariotos, como as bactérias ruminais, possuem alta atividade das ureases. Em meio aquoso as ureases degradam ureia a  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ , aproximadamente em velocidade máxima de reação ( $V_{\text{máx}}$ ) em 0,25 mg de N- $\text{NH}_3$ /g de fluido ruminal/h (PERSON; SMITH, 1943), degradação que pode estar acima da capacidade de assimilação pelos microrganismos do rúmen (HUNGATE; SMITH; CLARKE, 1966). Alguns fatores modulam a atividade das ureases, os principais são concentração de PB, ureia,  $\text{NH}_3$  ruminal, pH ruminal e presença de inibidores. Além disso a regulação pode funcionar diferente para bactérias localizadas próximo ao epitélio, no fluido ruminal ou nas que estão fortemente aderidas às partículas (PATRA *et al.*, 2018; PERSON; SMITH, 1943). É citado por Person e Smith (1943) que os estudos de atividade das ureases *in vivo* com NNP apresentavam difíceis interpretações e indica a técnica *in vitro*, entretanto nesses experimentos uma pequena porção de bactérias ureolíticas são isoladas e os achados podem não determinar a magnitude da atividade dessas enzimas no metabolismo no rúmen (FIRKINS; YO, 2006). A medição analítica da atividade das ureases é realizada em laboratório pela incubação durante 7 a 14 minutos com solução de ureia 0,25% a 37°C e analisada a suspensão do líquido para  $\text{NH}_3$  por método colorimétrico (SPEARS; HATFIELD, 1978).

A atividade das ureases em incubação *in vitro* de líquido ruminal coado de bovinos foi máxima em pH 6 a 9, em temperatura de 39°C (PERSON; SMITH, 1943). Em estudo da atividade das ureases presentes nas fezes frescas de vacas leiteiras Muck *et al.* (1981) observaram pH ótimo dessas enzimas em 6,8 a 7,6, acima e abaixo desse intervalo a atividade decaiu linearmente e a adição de ureia aumentou a atividade das ureases.

Ainda não há um consenso de como a PB dietética pode afetar a atividade das ureases, mas há evidências de que o aumento pode influenciar de formas distintas bactérias ureolíticas em diferentes localizações no rúmen. Marini *et al.* (2004) avaliando o efeito de três níveis de PB da dieta em cordeiros, 9,75%, 17,94% e 25,3% de PB, observaram redução linear da atividade das ureases ( $P = 0,02$ ) presentes na mucosa ruminal conforme aumento da PB. Em contrapartida Zhou *et al.* (2015) observaram aumento linear da atividade das ureases e deaminases ( $P < 0,001$ ) no fluido ruminal de iaques e bovinos castrados com a elevação da PB

dietética em 6,44, 12,1, 17,8 e 23,5%, valores de atividade da urease foram 7,2, 14,3, 26,1 e 37,8  $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$ , aumento de 80%, independente da espécie ( $P > 0,66$ ). Esse experimento foi delineado em quadrado latino 4 x 4 e a coleta do líquido ocorreu por meio de sonda oral no último dia de cada período experimental, em intervalo de 2 horas e iniciadas antes da alimentação da manhã e finalizando 16 h após.

Ureia no meio ruminal regula positivamente a atividade das ureases enquanto a elevação da  $\text{NH}_3$  inibe. Smith *et al.* (1981) observaram redução da atividade de *Selenomonas ruminantium* quando  $\text{NH}_3$  se elevou no meio ruminal *in vitro*, além disso o autor destaca uma relação de aumento da atividade das ureases estimulada pela enzima glutamina sintase quando o sistema está limitado em  $\text{NH}_3$ . É reportado que atividade da urease foi reduzida entre 3 a 20 mM de  $\text{NH}_3$  (SMITH; BRYANT, 1979). Czerskawski e Breckenridge (1981) conduziram diversos experimentos em fermentador de fluxo contínuo (RUSITEC) com o objetivo de estudar o efeito da da adição de ureia na atividade das ureases em diferentes compartimentos do rémen. O líquido ruminal de ovelhas foi coletado como inóculo e solução tampão saliva com ureia foi utilizada no sistema. A atividade da urease foi diferente nos três compartimentos do sistema: fase sólida, fase líquida e na fase intermediária ou fracamente ligada às partículas solidas, independente se a dieta era apenas feno ou feno mais concentrado. Com a adição de ureia houve aumento direto e expressivo da atividade das ureases no compartimento intermediário. A  $\text{NH}_3$  aumentou no meio a medida que se elevou ureia em 0,97 mg N- $\text{NH}_3/\text{mg}$  N-ureia. A  $\text{NH}_3$  média nos experimentos foi de 4 a 21 mM, mas não parece ter afetado em redução da atividade das ureases nessas incubações. O aumento da população de bactérias ureolíticas, medida pelo gene ureC, foi aumentada em fermentador com adição de ureia (JIN *et al.*, 2017).

Inibidores da atividade das ureases ruminais foram avaliados na tentativa de compreender melhor as reações e a possível redução da hidrólise da PB da dieta, principalmente da vinda de ureia. Estudo com infusão abomasal e ruminal de fenilfosforodiamidato em ovelhas (WHITELAW *et al.*, 1991) e Triamida N-(n-butil) tiofosfórica em ovelhas (LUDDEN *et al.*, 2000) reduziram a  $\text{NH}_3$  ruminal e modificaram a dinâmica do N. O aditivo alimentar monensina, a lasalocida (STARNES *et al.*, 1984) e níquel (SPEARS *et al.*, 1977) também estão associados à redução da atividade das ureases. Revestir a ureia para liberação mais lenta de  $\text{NH}_3$  tem a mesma razão básica, sendo uma alternativa viável e segura.

#### 2.4.3. Absorção e reciclagem de $\text{NH}_3$ pelo epitélio ruminal

A  $\text{NH}_3$  ruminal pode variar de 1 a 40 mM (SATTER; ROFFLER, 1975). Amônia possui alto  $\text{pK}_a$  (9,21), característica alcalinizante, e na dieta pode contribuir com elevação do pH ruminal. Além disso logo após a alimentação a taxa fermentativa ainda é baixa, caracterizada por pH mais baixo enquanto a atividade das ureases é alta, assim  $\text{NH}_3$  pode acumular a nível ruminal e favorece o transporte trans-epitelial para a corrente sanguínea (ABDOUN; STUMPF; MARTENS, 2006). No meio ruminal amônia pode estar na forma ionizada, íon amônio ( $\text{NH}_4$ ), ou não ionizada, amônia ( $\text{NH}_3$ ), em pH mais baixo predomina o  $\text{NH}_4$ .

Em situações em que aumento rápido de  $\text{NH}_3$  liberada no rúmen, e pH do rúmen se encontra predominantemente próximo à 7, há maior absorção do  $\text{NH}_3$  por difusão simples através da membrana lipofílica (ABDOUN; STUMPF; MARTENS, 2006). Em altas concentrações de PB dietética geralmente  $\text{NH}_3$  ruminal excede e muito a demanda para síntese de proteína microbiana, aumentando significativamente a quantidade perdida para o sangue e detoxicada pelo fígado. Aschenbach *et al.* (2011) propõe uma interação entre transporte de N pela parede ruminal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Em pH ruminal  $< 6,8$  predomina  $\text{NH}_4$  e transporte via canais de cátions que auxiliam na retirada de hidrogênio da célula (ASCHENBACH *et al.*, 2011). O efluxo de AGCC na forma de ânions na membrana basolateral facilita a passagem de  $\text{NH}_4$  via canais de  $\text{K}^+$ . Quando o pH ruminal é  $> 7$  há predomínio da absorção  $\text{NH}_3$  e efluxo apical, mas  $\text{NH}_3$  pode ser protonado a  $\text{NH}_4$  fim de reduzir o pH citosólico e evitar extrusão apical de cátions via canais de sódio. Amônia absorvida para o sangue é encaminhada para detoxicação via ciclo da ureia e pode retornar ao trato digestivo.

A reciclagem de N por meio da saliva e pelo epitélio ruminal é um contribuidor importante da concentração de  $\text{NH}_3$  ruminal, principalmente em dietas de baixa proteína (MARINI *et al.*, 2004). A reciclagem é uma característica fisiológica realizada em todo o trato digestivo para conservar N. Em ruminantes ureia reciclada para o rúmen é re-hidrolisada em  $\text{NH}_3$  e possível de ser utilizada para anabolismo microbiano (BATISTA *et al.*, 2017; LAPIERRE; LOBLEY, 2001). O influxo de ureia para o rúmen é realizado por meio de transportadores de ureia (UT, MARINI *et al.*, 2004) presentes nas membranas apicais e basolaterais (ASCHENBACH *et al.*, 2011) e aquaporinas (WALPOLE *et al.*, 2015). A regulação ocorre por diversos fatores. A baixa concentração de  $\text{NH}_3$  ruminal, aumento dos AGCC's e pH ruminais e a produção de  $\text{CO}_2$  parecem estimular a reciclagem de N ruminal. Os genes das UT's parecem se expressar quando a PB dietética consumida é baixa (MARINI *et al.*, 2004). Cheng e Wallace (1979) propuseram que bactérias ureolíticas presentes na mucosa ruminal poderiam formar um gradiente que estimularia o influxo de ureia retornando ao rúmen,

no entanto essa evidência foi menos aceita após estudos em que ovinos recebendo altas concentrações de N dietérico, que induziu a alta  $\text{NH}_3$  ruminal, mantiveram a hidrólise da ureia que retornava ao trato digestivo (MARINI *et al.*, 2004).

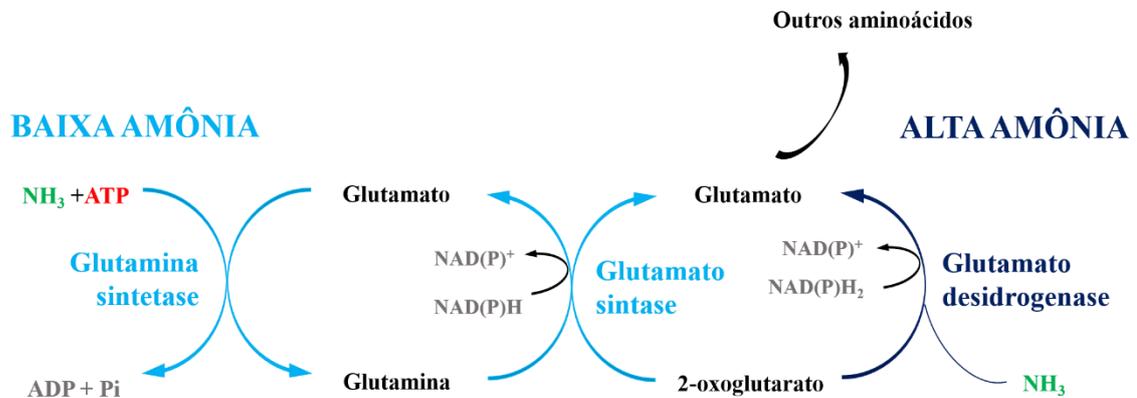
Mesmo que o N perdido seja reciclado na tentativa de conservar N, não significa necessariamente que ele será usado para anabolismo microbiano, ou seja, ureia reciclada é degradada a  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ , usada para anabolismo microbiano ou pode retornar ao ciclo da ureia e ser excretado (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). Batista *et al.* (2017) em estudo meta-analítico com o intuito de avaliar a partição de N, trabalhos com isótopo  $\text{N}^{15}$  (LAPIERRE; LOBLEY, 2001), observaram que acima de 17% de PB na dieta para bovinos estava associado à elevação do N perdido na urina, já que não há aumento da síntese bacteriana com essa fração reciclada, aumentando o N que retorna ao ciclo da ornitina. Reduzir a taxa de hidrólise da ureia e o teor de PB ainda é um ponto importante da nutrição proteica principalmente porque modelos de predição das dietas ainda não conseguem modelar esse influxo de N que ocorre ao rúmen e que pode ser utilizada pelos microrganismos. Com a queda drástica do pH e/ou altas concentrações de  $\text{NH}_3$  há uma redução da permeabilidade da parede ruminal à ureia do sangue forçando o direcionamento desta para excreção principalmente renal (ASCHENBACH *et al.*, 2011) ou para o leite.

#### 2.4.4. **Assimilação de $\text{NH}_3$ para síntese de proteína microbiana**

No rúmen  $\text{NH}_3$  pode ser assimilada por meio de dois sistemas enzimáticos: um de alta e outro de baixa afinidade pela amônia demonstradas na figura 2. O sistema de maior afinidade apresenta duas enzimas a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase. O substrato é catalisado pela GS, que apresenta  $K_m$  entre 0,2 a 1,8 mM (MEERS; TEMPEST; BROWN, 1970) e transforma glutamato em glutamina captando amônio com gasto de 1 ATP (custo energético extra para retirar N do meio em baixa concentração amoniacal), e pela glutamato sintase que transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato e formam dois glutamatos com gasto de hidrogênio oriundo do NADPH (TEMPEST; MEERS; BROWN, 1970). O sistema de menor afinidade é catalisado pela glutamato desidrogenase (GDH), acima de 5 mM de  $\text{NH}_3$  parece favorecer o sistema de alta afinidade, que apresenta  $k_m$  entre 20 a 33 mM (BROWN *et al.*, 1974). Em dietas comuns nos sistemas produtivos com alta PB prevalece esse sistema de assimilação pelas bactérias já que estimulam alta  $\text{NH}_3$  ruminal. A GDH é dependente de NADPH e insere amônia no 2-oxoglutarato para formação do glutamato (MEERS, TEMPEST; BROWN, 1974). O glutamato formado é usado como precursor de outros

aminoácidos por meio de reações de transaminação e são conjugados para formar proteína bacteriana.

Figura 2 - Vias de assimilação de amônia por bactérias ruminais em alta ou baixa concentrações de amônia no fluído.



Fonte: Adaptado de Tempest, Meers e Brown (1970)

Satter e Slyter (1974) demonstraram *in vitro* que não há aumento da produção de proteína microbiana quando o meio excede 2 mg/dL de N- $\text{NH}_3$ , mas os autores sugerem um valor mínimo conservador de 5 mg de N- $\text{NH}_3$ /dL aproximadamente 2,95 mM de N- $\text{NH}_3$ , acima desse valor houve acúmulo da amônia no meio. Nessa incubação a saliva artificial não continha ureia e todo o N do meio veio da adição de NNP do tratamento. Há algumas ressalvas em relação a este trabalho e ao baixo valor de amônia sugerido, como a utilização de fermentadores que mantêm pH, acúmulo dos AGCC e fermentação no meio constantes, além de não considerar a reciclagem de ureia. Os autores analisaram ainda proteína total no efluente por precipitação em ácido túngstico que não distingue entre proteína dietética e proteína microbiana. *In vivo* esses valores são amplos e muito mais altos. De acordo com Owens e Berg (1983) a máxima fermentação *in vitro* ocorre em valores mais baixos de  $\text{NH}_3$  comparado aos *in situ*, possivelmente pela formação de microambientes ecológicos que limitação de  $\text{NH}_3$  para bactérias que formam colônias. É importante destacar ainda que, segundo Lenkeit e Becker (1938) 20% da  $\text{NH}_3$  produzida no rúmen pode ser usada para síntese bacteriana.

O nível mínimo de  $\text{NH}_3$  para estímulo da multiplicação microbiana é dependente da quantidade de carboidratos e da taxa fermentação do rúmen (BACH *et al.*, 2005; ODLE *et al.*, 1987). Existe uma relação quadrática entre consumo de matéria orgânica digestível e eficiência de síntese microbiana (CLARK; KLUSMEYER; CAMERON, 1992). Quando N é limitante no

ambiente ruminal as bactérias tendem a usar de forma ineficiente os esqueletos de carbono, reduzindo síntese microbiana e aumentando a deposição de polissacarídeos na célula, com modificação da sua composição (BACH *et al.*, 1999; OWENS; BERGEN, 1983).

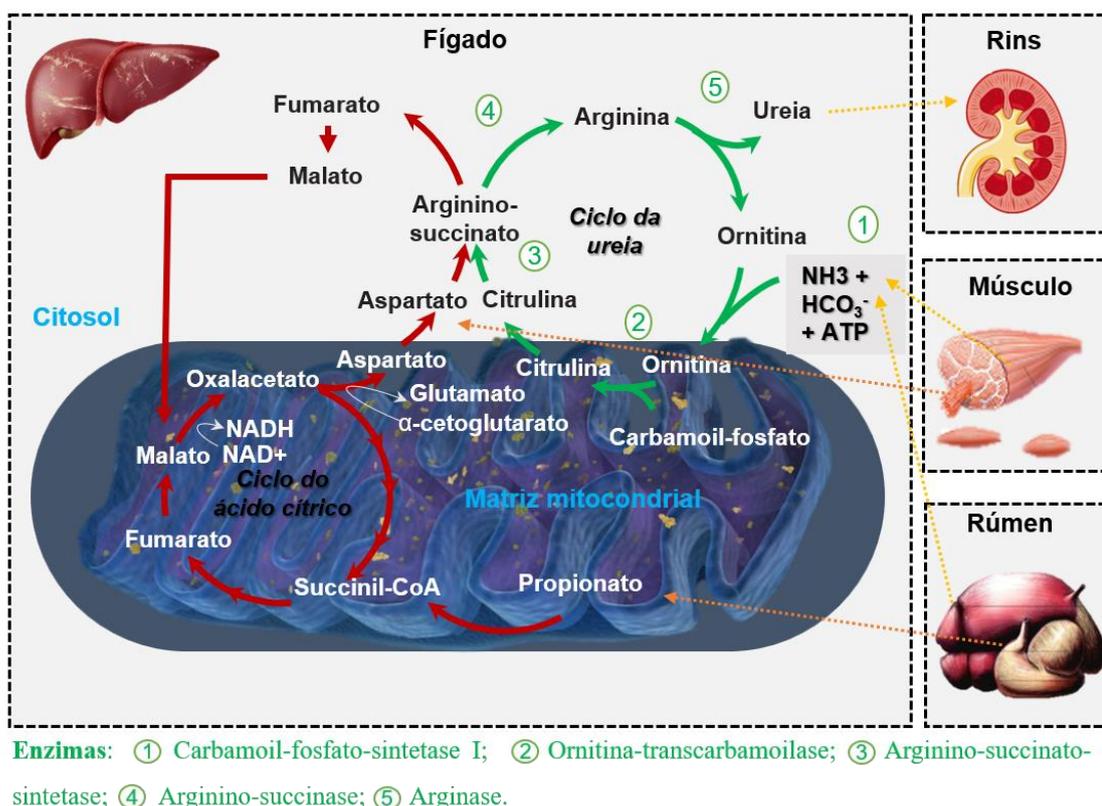
Para a síntese proteica bacteriana são necessários esqueletos de carbono e cofatores energéticos (NADH, NADPH) oriundos da fermentação de carboidratos no rúmen. Carboidrato degradado em proporção similar a liberação do N nos alimentos pode tornar mais eficiente o uso dos nutrientes pelos microrganismos do rúmen e maximizar síntese microbiana (SINCLAIR *et al.*, 1995). A sincronia pode ser obtida pela manipulação dos próprios ingredientes da dieta ou pela alteração dos padrões alimentares (CABRITA *et al.*, 2006).

## 2.5. Metabolismo hepático e ciclo da ureia

O fluxo de  $\text{NH}_3$  para o fígado de ruminantes é em grande parte oriundo da proteína da dieta que é absorvida pelo epitélio ruminal para o sangue. Uma proporção menor da  $\text{NH}_3$  provém do catabolismo de compostos nitrogenados, por exemplo a degradação de aminoácidos nos tecidos periféricos, como o músculo esquelético, por aminoácidos na gliconeogênese, pelo catabolismo de pirimidinas (timina, uracila e citosina), entre outras reações. O fígado sintetiza ureia a partir de  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  por meio de processo com quatro etapas ligadas por alguns substratos em comum ao ciclo de Krebs (NELSON; COX, 2014). Na mitocôndria dos hepatócitos  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  são convertidos em carbamoil-fosfato pela ação da carbamoil-fosfato-sintetase I [1], reação que consome de 2 ATP's. O substrato gerado inicia o ciclo da ureia doando o grupo carbamoila para a ornitina, formando citrulina por reação catalisada pela enzima ornitina-transcarbamoilase [2], sintetizada a partir de glutamato. A citrulina é então transportada para o citosol dos hepatócitos e as próximas etapas condensam o segundo grupo amino. O grupo amino do aspartato e o grupo carbonila da citrulina formam arginino-succinato por reação catalisada pela enzima arginino-succinato-sintetase [3] que também consome de 1 ATP. O aspartato é um dos substratos em comum ao ciclo de krebs a partir da clivagem do oxalacetato ou via muscular por meio de aminoácidos gliconeogênicos, como a alanina. Posteriormente o arginino-succinato é clivado pela enzima arginino-succinase [4] formando arginina e fumarato. O fumarato é convertido a malato e retorna ao ciclo de Krebs formando  $\text{NADH}^+$  e até 2,5 ATP por respiração mitocondrial. A última etapa do ciclo da ureia é catalisada pela enzima arginase [5] que cliva a arginina em ornitina e libera uma molécula de ureia, posteriormente direcionada para a corrente sanguínea. A ornitina retorna à mitocôndria para dar início a nova rodada do ciclo da ureia.

A conexão entre os ciclos energético e da ureia reduz o gasto energético líquido do ciclo da ureia para 1 ATP (Figura 3). Baseado na via de produção da ureia e de ATP podemos supor que se uma via estiver necessitando de maior quantidade de oxalacetato poderá haver escassez de substrato para a outra via, isso é importante para vacas em pós-parto. A remoção de  $\text{NH}_3$  do organismo é crucial para homeostase do animal pois é altamente tóxica. Ruminantes têm alta capacidade de lidar com alta concentração de  $\text{NH}_3$  no sangue e excretar ureia na urina (THORTON; WILSON, 1982), estima-se que a remoção hepática média de  $\text{NH}_3$  é 4% superior a entrada no sistema portal (PARKER *et al.*, 1995).

Figura 3 - Conexão entre o ciclo da ureia e o metabolismo energético de ruminantes.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014)

### 2.5.1. Relação entre depressão de consumo e $\text{NH}_3$ no sistema portal

Diversos estudos foram conduzidos para decifrar se a redução do consumo de dietas com ureia era devido ao sabor e odor da ureia ou relacionado ao metabolismo. Wilson *et al.* (1975) definiram alguns pontos importantes quanto a depressão de consumo causada pela ureia. Em um primeiro experimento vacas holandesas fistuladas no rúmen, delineado em quadrado latino 4 x 4, foram alimentadas com casca de algodão como fonte de volumoso (34%) e 1,0, 1,65, 2,3, ou 3% de ureia. Animais foram adaptados a dieta com ureia nas duas primeiras semanas e alimentados *ad libitum*. Na segunda semana as vacas foram alimentadas com 1% de

ureia e o saldo restante foi infundido no rúmen com solução aquosa a 20% três vezes ao dia. A ingestão diminuiu com aumento do nível de ureia, sem diferenças do método de fornecimento ao animal (oral ou ruminal). Em um segundo teste, delineamento semelhante ao primeiro, os autores avaliaram quatro tratamentos: a inclusão de 1% e 3% de ureia na dieta, e 1% da dieta mais infusão ruminal equivalente a 2% diretamente no rúmen como solução duas vezes ao dia ou 2% infundida ao longo do dia. O consumo de ureia foi respectivamente 194, 504, 249 e 456 g/d. As dietas com 3% de ureia deprimiram consumo independente da forma de fornecimento, no entanto a depressão foi mais drástica quando infusão foi realizada duas vezes ao dia. Os autores concluem que acima de 1% de ureia na dieta ocorre depressão do consumo e que o sabor não é o único mecanismo responsável.

Mais tarde Kertz *et al.*, (1977) observaram que o odor de amônia não parecia estar causando a rejeição inicial de rações contendo ureia, apesar dos animais apresentarem sintomas nasais, as maiores concentrações de amônia na ração não alteraram o consumo. Kertz *et al.*, (1982) observaram que as vacas não desgostavam de rações contendo 2,5% de ureia. Vacas não discriminavam rações contendo 1% de ureia, mas reduziam o consumo quando ração apresentava 2,5% de ureia. Aparentemente é definida uma toxicidade subclínica por amônia que gera um mecanismo fisiológico adaptativo que reduz o consumo para evitar recorrência de mal-estar, também denominado aversão negativa condicionada.

Conrad, Baile e Mayer (1977) infundiram o rúmen de cabras ( $n = 4$ ) com cloreto de amônio, lactato de amônio, lactato de sódio e ureia no equivalente a 1,3% na MS, e observaram encurtamento da refeição respectivamente com ureia e amônio em 20% e 30%, com redução do consumo. Em segundo experimento, baseado no anterior, eles compararam a suplementação de ureia e farelo de soja para vacas lactantes ( $n = 2$ ) com inclusão de ureia em 1,3% MS. Eles observaram mesmo CMS total (média de 11,9 kg/d) que parece ter sido compensado pelas diferenças no comportamento alimentar do animal. Houve aumento do número de refeições espontâneas para ureia em relação ao farelo de soja (23,0 vs. 17,4/d,  $P = 0,045$ ) apesar do menor tamanho de refeição (1,8 vs. 3,2 kg,  $P = 0,001$ ) e menor duração das refeições (12,4 vs. 24,3,  $P = 0,001$ ).

O mecanismo de depressão do consumo, até então o elo perdido da nutrição com ureia, é explicado pelos estudos da teoria da oxidação hepática proposto por Oba e Allen (2003ab) e revisado por Allen, Bradford e Oba (2009), no qual é postulado que o excesso de amônia no fígado acarreta indiretamente em atraso na sensação de fome. A teoria da oxidação hepática prevê que o status de energia hepática influencia o consumo de alimentos e que todos os

combustíveis oxidados no fígado podem gerar sinais de saciedade ao cérebro, via nervo vagal hepático (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009). O autor menciona que o comportamento alimentar pode ser influenciado e depende do padrão de oxidação dos combustíveis, minuto a minuto. Os principais combustíveis pertencentes ao metabolismo energético oxidados no fígado são o propionato produzido no rúmen e ácidos graxos não esterificados pela mobilização do tecido de reserva. Ambos são oxidados a gás carbônico e ATP no fígado. O excesso de ATP produzido no fígado estimula o cérebro à saciedade. Nos hepatócitos o metabolismo energético está interligado por meio de alguns combustíveis ao metabolismo de ureia, como visto no tópico anterior.

Resumidamente o ciclo de krebs gera 12 mols de ATP's e o ciclo da ureia consome 3 mols de ATP's, então seria esperado um saldo de 9 ATP's devido ao gasto energético para produzir ureia (SILVA; DIXON; COSTA, 2019; NELSON; COX, 2014; OBA; ALLEN, 2003a). Existia a hipótese de que amônia no sistema portal poderia reduzir o status energético gerado pelo excesso de precursores energéticos no fígado, principalmente propionato, e melhorar o consumo. Essa hipótese foi testada por Oba e Allen (2003a) com infusão de propionato de amônio para vacas fistuladas em meio de lactação em delineamento quadrado latino 4x4 com os seguintes tratamentos infundidos no rúmen (0,93 M para propionato e 0,67 M para sais): ácido propiônico (controle), propionato de amônio, propionato de sódio e propionato de potássio. Esse estudo foi contra a hipótese testada pois observaram que a infusão de propionato de amônio intensificou a hipofagia em relação ao sódio e potássio ( $P = 0,04$ , 11 vs. 14 e 13,9 kg/12h), similar ao controle com propionato ( $P = 0,37$ ), aumentou o intervalo entre refeições ( $P < 0,01$ , 105 vs. 62 e 74 minutos) e reduziu o número de refeições ( $P = 0,02$ , 5,6 vs. 8 e 7,2/12h) sem afetar o tempo total de mastigação ( $P < 0,11$ ). No fígado ocorre a oxidação de aminoácidos que doam o grupo amino para a síntese da ureia e a cadeia carbônica é oxidada a acetil-CoA e aumenta a produção líquida de ATP, reduzindo indiretamente o consumo.

Outro estudo sobre fatores que afetam o consumo foi conduzido por Oba e Allen (2003b) que avaliaram o efeito da hipofagia do amônio infundido com propionato e acetato e efeito da interação entre propionato e amônio no comportamento alimentar. Oito vacas holandesas fistuladas no rúmen, em meio de lactação, foram divididas em quadrado latino duplicado em arranjo fatorial 2 x 2: tipo de ácido graxo volátil (AGV): acetato vs. Propionato, e o tipo de sal: sódio vs. amônio. Vacas foram alimentadas uma vez ao dia e a infusão contínua das soluções foi realizada 2h antes da alimentação e finalizada 12h após. Tratamento com propionato e

amônio reduziram o CMS (efeito de AGV  $P = 0,001$ , para sal  $P = 0,001$  e interação  $P = 0,01$ ) e reduziu o número de refeições (efeito do AGV  $P = 0,03$ , para sal  $P = 0,01$  e interação  $P = 0,01$ ). O tempo de mastigação total, em minutos, não foi afetado pelo sal e teve efeito do AGV ( $P = 0,01$ ) sendo menor para o propionato (203 vs. 336 min) e interação significativa ( $P = 0,01$ ). O estudo mostrou que o amônio reduziu a frequência de refeições e sugere haver um efeito sobre a fome, e junto com propionato intensificou a hipofagia. Esses trabalhos indicam o forte efeito da concentração de  $\text{NH}_3$  no sistema portal gerando mudanças no comportamento alimentar dos animais e explica a possível redução de consumo gerada por NNP. Nos níveis de ureia mais baixos (até 1% da dieta) geralmente não há redução do consumo e desempenho produtivo (BOUCHER *et al.*, 2007; CABRITA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 1998). O mecanismo de conversão de  $\text{NH}_3$  em ureia excessiva pode influenciar o CMS, aumentar o *pool* da ureia sanguínea, aumentar excreção urinária ou pode ser reciclada ao trato digestivo e contribuir para aporte de N-ruminal.

## 2.6. Metabolismo de N pós-prandial e associações entre NUP, NUL e N-urinário

Uma das funções do fígado é remover amônia que entra no sistema portal drenado por vísceras (PDV). Segundo Huntington e Prior (1983) há uma correlação positiva entre concentração de N- $\text{NH}_3$  ruminal e absorção líquida de  $\text{NH}_3$  para o sangue. Essa taxa de entrada de amônia para fígado é mais decisiva na ureogênese do que a quantidade de amônia (SYMONDS *et al.*, 1981) já que o órgão possui alta capacidade de depuração para manutenção da homeostase do organismo (PARKER *et al.*, 1995).

A capacidade de depuração de amônia é altíssima para vacas em lactação. Johnson *et al.*, (1990) mensuram que o fígado das vacas lactantes é aproximadamente duas vezes maior (2x) que o de novilhos quando expresso em peso metabólico ( $\text{PV}^{0.75}$ ). Se a disponibilização de energia no rúmen não coincide com as concentrações de amônia no rúmen, situação em que não há aumento no crescimento microbiano, então maiores flutuações de amônia irão ocorrer após alimentação (HENNING; STEYN; MEISSNER, 1993) que ao serem absorvidas terão reflexos no *pool* de NUP. Ou seja, as flutuações devidas as perdas de amônia pelo rúmen para o PDV podem ser observadas posteriormente por meio do NUP. A ureia plasmática é um indicador sensível ao consumo de N (JONKER *et al.*, 1998).

A ureia sanguínea pode ser reciclada ou excretada na forma de N-ureico urinário (NUU) ou leite (NUL). A urina é a principal via de excreção de ureia. O epitélio da glândula mamária é uma via bidirecional para ureia e seu transporte ocorre passivamente para leite com equilíbrio

estimado em 1-2h após pico no sangue (GUSTAFSSON; PALMQUIST, 1993). O NUL é o principal indicador de perdas do N-dietético pois é de fácil mensuração prática, não está intimamente ligado a regulação fisiológica da homeostase e é menos afetada por variações logo após as refeições (JONKER *et al.*, 1998).

O aumento da ingestão de N promove aumento linear ( $P < 0,001$ ) no N-ureia sintetizada pelo fígado (BATISTA *et al.*, 2017; HARMEYER; MARTENS, 1980). Dietas com alta PB e alta PDR tornam os microrganismos ruminais menos dependentes de N-ureia reciclada para anabolismo proteico ruminal e aumenta ureia que retorna ao ciclo da ornitina (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). O *pool* de N no organismo é definido pela quantidade de N-ingerido em excesso à capacidade do rúmen e a taxa de excreção irreversível, ou seja, se o N entra no sistema vivo a uma taxa mais elevada do que as taxas de perdas do N, então o *pool* de N no organismo aumenta (HARMEYER; MARTENS, 1980). O maior *pool* de ureia eleva respectivamente as transferências para a glândula mamária (NUL), mas nem sempre afeta a excreção urinária de ureia total (MULLER *et al.*, 2020). Ruminantes submetidos à baixa PB da dieta podem reduzir excreção de N-ureia urinária devido a mecanismos de adaptação dos rins para preservar N, resultando em redução do NUL e do N-urinário (BARROS *et al.*, 2019; MARINI *et al.*, 2008; MARINI; VAN AMBURGH, 2003). Em dietas com PB baixa é hipotetizado que haja expressão de transportadores específicos de ureia (UT's) nos rins, que possivelmente aumentam a reabsorção e conservam o N (MARINI; VAN AMBURGH, 2003).

Por ser mensurável com facilidade em fazendas, diversos estudos têm explorado possíveis relações entre NUL e NUP, e NUL e NUU. De modo geral esses indicadores poderiam ajudar na previsão de uso mais eficiente do N-dieta, do ponto de vista fisiológico e econômico, como também da sustentabilidade da produção principalmente em sistemas de confinamento por causa da relação de UUN com perdas de amônia e óxido nitroso das excretas para o ambiente (DIJKSTRA *et al.*, 2013).

O NUL parece ser um bom estimador do NUP estimado por modelo misto com efeito de interação vaca *vs.* NUP ( $r^2 = 0,84$ , BRODERICK E CLAYTON, 1997) e menor para correlação linear ( $r^2 = 0,59$ , BRODERICK E CLAYTON, 1997), com grande parte da sua variação explicada pela PB dietética. No entanto o NUL não parece ser um bom preditor para N-urina (UN) e UUN, pois apesar de positiva há uma relação linear baixa na faixa de NUL entre 50-150 mg/L ( $r^2 = 0,23$ , SPEK *et al.*, 2012) indicando haver fatores não contabilizados na equação linear (SPEK *et al.*, 2012). Além disso há grande variação da composição de ureia na urina, de 50 a 90% N-urinário é ureia em bovinos segundo Bristow, Whitehead e Cockburn

(1992), principalmente devido ao aumento da ingestão de N (JONKER *et al.*, 1993) que aumenta conseqüentemente NUU (SPEK *et al.*, 2012).

A correlação positiva entre concentração de NUL (mg N/L) e a excreção diária de N (UN, g/dia) foi determinada em alguns trabalhos (NOUSIAINEN *et al.* 2004; BRODERICK, 2003; BANNINK; HINDLE 2003; KOHN *et al.*, 2002; KAUFFMAN; ST-PIERRE, 2001; JONKER *et al.*, 1998). Os três últimos trabalhos citados utilizam peso vivo e/ou correção para produção de leite para melhorar o ajuste das equações. No entanto, diversos outros fatores influenciam o NUL e conseqüentemente a relação NU e NUL (UN: NUL). Spek *et al.*, (2012) revisou diversos desses fatores e aqui será enfatizado os fisiológicos: variações diurnas entre NUP e NUL e reabsorção de ureia renal, e os nutricionais: proteína da dieta e Ingestão de água. Todos esses fatores são biologicamente interligados.

### **2.6.1. Metabolismo renal e variações diurnas entre NUP e NUL**

O manejo alimentar e o comportamento do consumo de alimento pelos animais refletem na quantidade de substrato disponível a ser degradado no rúmen. É detalhado por Gustafsson e Palmquist, (1976) que conforme flutuações de consumo há respectivamente variações diurnas no N-amoniaco do rúmen, NUP e NUL. Segundo Coppock; Peplowski e Lake (1976) em casos em que o concentrado é fornecido separadamente no momento da ordenha o risco de perdas de N é maior pois há consumo instantâneo de PDR, desfavorecendo o sincronismo de energia e proteína para anabolismo microbiano com aumento circunstancial de NUP pós-prandial. O fornecimento de N-solúvel na forma de dieta completa parece favorecer o sincronismo e fornece substratos de forma mais constantes ao longo do dia.

Os animais consomem a maior parte do alimento durante o dia (DE VRIES *et al.*, 2003). É reportado por Castro *et al.* (2019) que aproximadamente 72% do consumo ocorreu durante dia (07h às 19h) e 28% ocorreu a noite (19h às 07h), assim espera-se que exista diferenças do NUP ao longo do dia (GUSTAFSSON; PALMQUIST, 1976) e reflexos dessa variação na relação UN: NUL. Broderick e Clayton (1997) compararam as diferenças entre volume urinário, UUN e NUL em dois períodos do dia: manhã (04h às 16h) e noite (16h às 04h). O volume de urina foi significativamente maior durante o dia (+ 28%, 20,4 vs. 14,7 L/12h) assim como o UUN foi 21% maior durante o dia (92,5 vs. 73,4 g/d). A concentração de NUL foi 33% menor durante o dia (160 vs. 120 mg N/L) e 50% menor em quantidade durante o dia (2,41 vs. 1,6 g N/12h). As flutuações na UUN:NUL apresentaram relação de 0,77 para período diurno e 0,46 noturno, indicando variabilidade ao longo do dia. A relação UUN: NUL também muda com a

ingestão de N-dietético. No estudo de Colmenero e Broderick (2006b) podemos observar aumento significativo de UUN e NUL com aumento da PB ( $P < 0,01$ ), que reflete na relação UUN: NUL calculada em 1,42 em dietas com 16,6% PB e de 1,68 para dietas com 17,6% PB.

Aumento do NUP podem promover mudanças na excreção renal do N (HARMEYER; MARTENS, 1980) por aumento na quantidade de N que passa pelos túbulos renais. Os rins mantêm uma taxa de reabsorção glomerular constante para animais em dieta adequada (GUYTON, 1996), com aumento da concentração sanguínea de ureia há aumento relativo da reabsorção e da taxa de excreção. Em dietas com baixa proteína os ruminantes expressam os genes de transportadores de ureia, conhecidos como UT-A's e UT-B's, presentes nos rins e rúmen dos mamíferos (MARINI; VAN AMBURGH, 2003). Nos rins a UT-A estimula a reabsorção da ureia filtrada e no rúmen estimula a reciclagem do N, ajudando assim na preservação do N consumido. Nesse caso parece haver uma menor relação de UUN: NUL. Por exemplo, em estudo de Colmenero e Broderick (2006a) a relação entre UUN: NUL foi de 0,81 para dieta com 13,5% PB e aumentou para 1,33 em dietas acima de 17,9% PB. Nas dietas de 17,9% e 19,4% existiram um aumento quantitativo de UUN e NUL, mas a relação foi constante indicando haver um platô. Isso é reforçado por Spek *et al.* (2012) que ao compilarem dados de 23 estudos observaram distorção da relação UUN: NUL, que se apresentou menor para dietas com baixa PB e acima de 17% PB houve relação da excreção urinária e no leite constante.

Em metanálise avaliando o efeito da proteína dietética sobre a cinética de ureia realizada por Batista *et al.* (2017) foi observado um aumento significativo da produção de ureia hepática em dietas acima de 17% PB e um platô de ureia excretada na urina também com 17% PB ( $P < 0,05$ ). Em proteína alta os ruminantes ativam os mecanismos de excreção urinária, aumentando quantitativamente de forma linear as perdas de N, porém a uma taxa constante entre via urinária e leite.

### **2.6.2. Reabsorção de ureia renal e ingestão de água**

Além do teor de PB da dieta o *status* de hidratação do animal também influencia a fisiologia renal. A ureia é um composto osmolítico, em situações que o animal se encontra sob desidratação os rins podem ativar o mecanismo de aumento da reabsorção de água e promover aumento indireto da reabsorção de ureia (SCHMIDT-NIELSEN *et al.*, 1957). Além disso, tem sido observado aumento do NUP para animais em restrição hídrica (STEIGER-BURGOS *et al.* 2001; UTLEY; BRADLEY; BOLING, 1970; WEETH; SAWHNEY; LESPERANCE, 1967) e conseqüentemente pode se esperar aumento do NUL. Steiger-Burgos *et al.* (2001) observaram

aumento de 1,58 vezes na ureia do leite para animais com 50% de restrição hídrica (34,2 vs. 21,6 mg/dL,  $P < 0,05$ ).

Por outro lado, o aumento do consumo de água dilui o NUP (WEETH; SAWHNEY; LESPERANCE, 1967; WEETH; LESPERANCE, 1965). Mutsvangwa *et al.* (2016) observaram tendência ( $P = 0,06$ ) de maior produção urinária em vacas alimentadas com alta PB em comparação com baixa PB (23,95 vs. 21,95 kg/d). O aumento da ingestão de água aumenta o fluxo renal. Schmidt-Nielsen *et al.* (1957) observaram que um aumento do fluxo de urina aumenta a UUN e culmina em redução do *pool* de ureia no sangue. Esse é um mecanismo de mudança temporário.

Em conclusão a PB dietética aumenta a excreção de ureia na urina e pode aumentar sutilmente o volume urinário pelo aumento da ingestão de água e tem efeitos no NUP, NUL e na relação UNN: NUL, e a restrição de água parece ter efeito mais significativo sobre as três variáveis.

### 2.6.3. Proteína bruta da dieta e volume urinário

Alta ingestão N-dietético geralmente aumenta o *pool* de N-ureia plasmático e o N-ureia urinário. O aumento de PB acima 16,6% na dieta pode estar associado, segundo Holter, Byrne e Schwab (1982) em aumento do consumo de água livre que auxilia na excreção do N em excesso e pode acarretar aumento do volume de urina por dia. A relação linear entre ingestão de água e volume urinário foi alta e positiva ( $r^2 = 0,77$ , HOLTER; BYRNE; SCHWAB, 1982), possivelmente ocasionada pelo aumento do fluxo sanguíneo hepático (SPEK *et al.*, 2012). Por outro lado, em situações com restrição do consumo de água em camelos houve elevação da concentração de ureia plasmática sem modificar a excreção urinária segundo Schmidt-Nielsen *et al.* (1957). Os rins regulam a excreção de N (SPEK *et al.*, 2012).

Estudo de Thornton e Wilson (1980) tentaram definir se havia um ponto de saturação dos rins na depuração de N para animais recebendo alta proteína. Para tal infundiram níveis crescentes de N para elevar o NUP e avaliar a dinâmica renal. Com elevação do NUP aumentava-se a quantidade de ureia filtrada e excretada na urina, com relação linear UUN (g/L) e NUP (mg/dL),  $r^2 = 0,87$ , e parte é reabsorvida nos túbulos renais. Cerca de 65% da ureia filtrada foi excretada na urina. Eles concluíram que não há um ponto de saturação para excreção de ureia urinária e que a quantidade de N excretada por dia é dependente da concentração de NUP, mas a porcentagem filtrada permanece constante em dietas com alta PB.

O metabolismo de N é avaliado em alguns trabalhos com vacas leiteiras consumindo diferentes níveis de proteína e PDR da dieta. Reynal e Broderick (2005) dividiram vinte e oito vacas em lactação, oito canuladas no rúmen, em quadrado latino 4 x 4, 28 dias por período experimental, consumindo dieta completa de silagem de milho (37%), silagem de alfafa (13%) e concentrado (50%). Quatro níveis de PDR foram avaliados 13,2%, 12,3%, 11,7% e 10,6%, elevada com adição de ureia. A creatinina foi utilizada como marcador para estimar o volume de urina. Não houve diferença na produção de leite, CMS e EUN ( $P > 0,46$ ), respectivamente 25,5 kg/d, 42,3 kg/d e 30%. O volume de urina foi maior, + 4,4 L/d, para dieta com 13,2% PDR comparada a dieta 10,6% PDR, os demais tratamentos foram intermediários ( $P < 0,05$ ). O volume apresentou ainda comportamento linear de aumento para UUN (+ 77 g/d,  $P < 0,01$ ) e do UN (+7,2 pontos percentuais em relação ao ingerido). Houve redução linear do NUL com redução da PDR. As três inclusões mais baixas foram similares para derivados de purina (366 mmol/d,  $P < 0,01$ ) comparada à inclusão de 13,2% PDR que foi maior (435 mmol/d).

Colmenero e Broderick (2006a) avaliaram o aumento da proteína da dieta com inclusão de farelo de soja extraído com solvente em vacas lactantes ( $n = 40$ , sendo 10 fistuladas no rúmen). Vacas foram distribuídas em quadrado latino 5x5, período de 28 dias e foram alimentadas em dieta completa com silagem de alfafa (25%), silagem de milho (25%) e concentrado (50%). Os níveis de PB foram: 13,5%, 15,0%, 16,5%, 17,9% e 19,4%, respectivamente em PDR de 9,23%, 10,2%, 11,0%, 11,9% e 12,7%. Acima de 16,5% PB os tratamentos foram similares em alantoína urinária, produção de leite e proteína do leite ( $P > 0,05$ ). O EUN reduziu linearmente com o aumento da PB na dieta ( $P < 0,01$ ), aumentou o UN em proporção ao ingerido, assim como o UUN ( $P < 0,01$ ). O volume urinário, estimado por meio da creatinina, teve aumento de +4,4 L/d da dieta 13,5% PB comparada a 19,4% PB. Dieta com 16,5% PB maximizou desempenho produtivo e PB acima disso promoveu aumento da excreção de UN e redução da EUN.

Colmenero e Broderick (2006b) compararam duas dietas, com 16,6% vs. 17,6% com aumento do farelo de soja extraído com solvente, contraste pré-definido. Vacas lactantes holandesas ( $n = 28$ , sendo 4 canuladas no rúmen) divididas em quadrado latino 4x4, período de 28 dias. A dieta consistiu em silagem de alfafa (20%), silagem de milho (35%) e concentrado (45%). Coleta de urina foi realizada após 6h de alimentação (*spot*) e mensurada creatinina para estimar o volume. O aumento de um (+1) ponto percentual de PB, acima de 16,6% na dieta, não aumentou produção de leite, deprimiu a EUN (-2,5%,  $P < 0,01$ ), elevou o NUP (+3 mg/dL,  $P < 0,01$ ), tendeu a aumentar o volume de urina (+4,3 L/d,  $P = 0,07$ ) e aumentou o UN (+ 54

g/d ou + 4,4%,  $P < 0,01$ ) e o UUN (+ 62 g/d ou + 11,7%,  $P < 0,01$ ). Os parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes e derivados de purina não foram significativos ( $P > 0,30$ ).

Broderick e Reynal (2009) substituindo PDR do farelo de soja por PDR de ureia, em 0, 1,2, 2,4 e 3,7% de substituição, em dieta isoproteica com 16% PB, não observaram diferenças na EUN, na excreção total de N por dia (% do ingerido) e tendência fraca no volume urinário ( $P = 0,13$ ), mas houve aumento linear do UUN com aumento de inclusão de ureia na PDR, aproximadamente +14 g/d ( $P < 0,01$ ) e aumento linear da digestibilidade aparente da FDN em +4,48% ( $P < 0,01$ ). Ao elevar proteína da dieta de 11,7% para 15,4% para vacas em lactação, coleta total da urina via cateteres, Spek *et al.* (2012) observaram maior UN e UUN para animais consumindo PB mais alta ( $P < 0,01$ ). O volume urinário teve uma tendência fraca de aumento na alta PB ( $P = 0,16$ ) sendo mais influenciado pelo aumento da ingestão de cloreto de sódio ( $P < 0,001$ ). Van Vuuren e Smits (1997, apud. DIJKSTRA *et al.*, 2013) avaliando animais alimentados com alta vs. baixa PB observaram aumento do volume urinário (23 vs. 40 L/d) e de excreção de UN (308 vs. 169 g/d de N), possivelmente pelo aumento da ingestão de água.

Em síntese, o aumento da PB dietética contribui com aumento significativo na excreção de ureia urinária e no aumento sutil do volume de urina excretado, principalmente quando a fração da PB é rapidamente solúvel e/ou não sincronizada com energia para o rúmen, pois nesse caso há favorecimento da taxa de perda de N para o sangue e o aumento da excreção de N sobretudo via urina. A creatinina pode servir como indicador para estimar taxa fracional de reabsorção urinária de ureia (%), considerando que 98% desse composto é reabsorvido nos rins, entretanto uma pequena parcela desta é também eliminada via urina (AIRES, 2012), subestimando a ureia.

## 2.7. Limitação da ureia para ruminantes e ureia de liberação lenta

Uma tentativa de contornar a rápida liberação do N é revestir a ureia com materiais que mantenham a sua taxa de liberação mais constante, promover melhora na captura NNP e aumentar conversão em proteína microbiana. Além disso ureia promove menor aceitabilidade das dietas e casos de toxicidade dependendo do nível de inclusão. Existem diversos tipos de materiais de revestimentos da ureia e todos possuem a mesma finalidade básica. Os materiais podem ser hidrofóbicos ou não (INÁCIO *et al.*, 2022; IBRAHIM; BABADI; YUNUS, 2014).

O extrusado amido-ureia (EAU) consiste em um produto da gelatinização do amido junto a ureia num processo de extrusão. A peculiaridade deste produto é justamente o fato de o

revestimento ser degradado mais rapidamente no rúmen e favorecer o fornecimento de energia, reduzir o pH pela produção de AGCC e estimular síntese bacteriana (BARTLEY; DEOYE, 1981; HELMER; BARTLEY, 1971; HELMER *et al.*, 1970), porém os estudos com ureia lenta são controversos.

## 2.8. Amido-ureia extrusado

### 2.8.1. Definição, propósito e panorama histórico

O produto, denominado "*Starea*", foi desenvolvido na década de 70 por pesquisadores da "*Kansas State University*" (EUA) por meio da extrusão do milho com ureia com equivalente proteico de 34 a 45% (HELMER *et al.*, 1970; BARTLEY; DEYOE, 1981). O teor de PB em *Starea* sempre foi mantido abaixo de 84% (HARBERS; SHIEHZADEH, 1976). A proporção de cereais na formulação e ureia determinam o teor de PB equivalente no produto, por exemplo a inclusão de 5,5 kg de ureia e milho com 9% de PB culminam no produto com 24% PBequivalente (BARTLEY; DEYOE, 1972).

Devido a natureza de degradação ruminal do NNP surgem problemas como aceitabilidade, segregação, hidrosopicidade, rápida liberação do N e conseqüentemente possíveis riscos de toxicidade ou elevação de perdas pelas vias de excreção, como os rins (BARTLEY; DEOYE, 1972). Produtos que objetivam suprir ureia de liberação lenta surgiram da necessidade de melhorar a aceitabilidade e segregação dos constituintes da ração, e reduzir a higroscopicidade da ureia (BARTLEY; DEOYE, 1972; HELMER *et al.*, 1970b; STILES *et al.*, 1970). Também se argumenta que ureia extrusada com amido poderia reduzir a toxicidade da ureia para ruminantes (STILES *et al.*, 1970; BARTLEY *et al.*, 1976) e potencializar a captura do nitrogênio pelas bactérias ruminais e conseqüentemente a síntese de proteína microbiana no rúmen (HELMER *et al.*, 1970a) melhorando a eficiência do uso da ureia.

No trabalho clássico de Helmer *et al.* (1970a), ureia acrescida ao milho expandido após o cozimento foi tão eficaz em reduzir a concentração de amônia e estimular a concentração microbiana em fluído ruminal *in vitro* quanto ureia que foi extrusada junto do milho, ambas relativamente a uréia misturada a milho maduro finamente moído. Os autores avaliaram EAU com 34, 39 e 44% de PB, finamente moídos (peneira de 40 mesh) para as incubações *in vitro* por 4 h. Stiles *et al.* (1970) observaram que em garrotes consumindo grão de sorgo e 5% de ureia (25,2% de PB) o teor de amônia no rúmen foi mais alto em sorgo quebrado (Cracked) do que em sorgo moído e peletizado, expandido e depois acrescido de ureia, ou expandido com

ureia. Estes trabalhos sugerem que a expansão do amido, e não a sua complexação estrutural com a ureia, é que induz a redução da amônia ruminal.

O EAU foi idealizado como produto para ruminantes, baseado nas limitações quanto ao uso da ureia e para melhoria do seu uso, sendo desejável que a fonte de NNP e do carboidrato apresentassem taxas de degradação ruminais mais sincrônicas. O produto é obtido por meio da gelatinização de grãos de cereais moídos combinada à ureia comum por processo de cozimento hidrotérmico e aplicação de força de cisalhamento (HELMER *et al.*, 1970a). Na extrusão os constituintes formam uma mistura reagida que favorece em aumento da conversão de N-NH<sub>3</sub> em N-bacteriano em relação à ureia (BARTLEY; DEOYE, 1972). Bartley e Deyoe (1972) sugerem o uso preferencial de grãos de cereais e de ureia como ingredientes. A caracterização dos ingredientes e mais estudos que descrevem a utilização de EAU serão mencionados nos tópicos seguintes.

### 2.8.2. Características dos ingredientes para fabricação da amido-ureia extrusado

Durante a fabricação de EAU ocorre mudança na estrutura molecular do amido e morfologia dos ingredientes utilizados na mistura em decorrência da gelatinização do amido (BARTLEY; DEYOE, 1972; KOZERSKI *et al.*, 2021a) o que é capaz de reduzir a velocidade de liberação do N no produto (HELMER *et al.*, 1970a; STILES *et al.*, 1970).

#### 2.8.2.1. Amido: caracterização molecular e granular

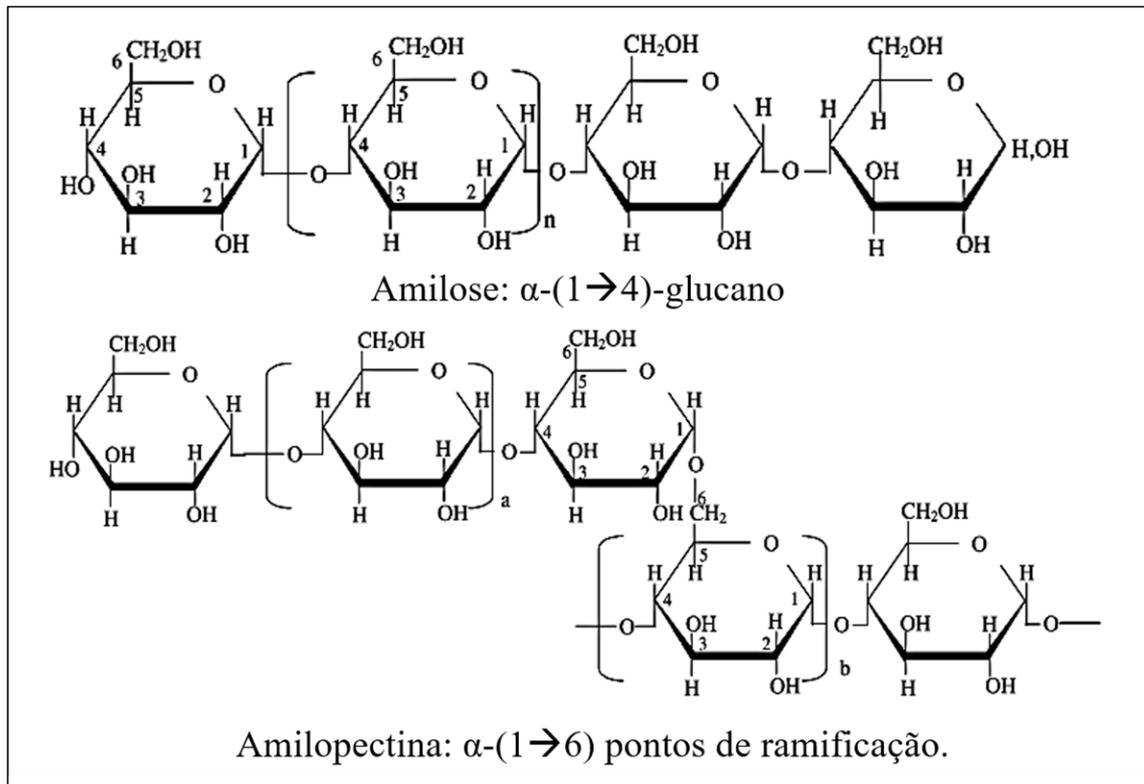
O amido é um polímero renovável, abundante e biodegradável. Esse homopolissacarídeo é organizado em estruturas semiesféricas denominadas grânulos de amido (RATNAYAKE; JACKSON, 2008) sintetizadas a partir dos amiloplastos presentes na célula vegetal. Os grânulos semicristalinos insolúveis do amido são compostos por monossacarídeos de D-glicose, que se unem por ligações alfa e formam dois tipos de cadeias poliméricas: a amilose, essencialmente não ramificada, e a amilopectina, altamente ramificada (WANG; COPELAND, 2013; TESTER; KARKALAS; QI, 2004), também denominadas respectivamente linear e ramificada. Elas representam 98-99% da composição em MS do grânulo (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Outros constituintes do amido purificado podem estar aderidos principalmente na superfície do grânulo, em % da MS do grânulo, como proteínas (< 0,6%), lipídeos (< 2,0%) e minerais (< 0,4%), estão presentes em quantidades menores e seu percentual dependente da fonte de amido (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A proteína na superfície do grânulo do amido alto peso molecular e esta associada à dureza do grão (GREENWELL; SCHOFIELD, 1986). No endosperma do grão existem proteínas associadas externamente ao grânulo do amido, denominadas prolamínas (no milho: zeínas). No endosperma farináceo do milho os grânulos são dispostos na forma de esferas dispersas, enquanto no endosperma vítreo os grânulos são helicoidais e adensados (PEREIRA, 2014) e podem ser observadas em microscopia eletrônica de forma bem definida. A ligação entre zeínas e amido são muito fortes e dificultam a entrada de água entre os grânulos.

A amilose (figura 4) possui cadeias lineares relativamente longas de glicose. Em sua origem, no processo de condensação enzimática, 99% das ligações entre as glicoses são do tipo  $\alpha$  (1-4) e apenas 1% é de ligações  $\alpha$  (1-6) (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). O grau de polimerização depende da fonte botânica, em média possui entre 394 a 4.920 unidades de glicose, com aproximadamente 9 a 20 pontos de ramificação equivalentes a 3 a 11 cadeias por molécula (BULEON *et al.*, 1998). Amilose possui alta capacidade de formar gel.

A amilopectina (figura 4) é uma molécula maior que a amilose e apresenta ramificações (4 a 6%), com ligações  $\alpha$  (1-6) a cada 20-25 monômeros de glicose (RATNAYAKE; JACKSON, 2008). O grau de polimerização é de 9.600 a 16.900 unidades de glicose (TESTER; KARKALAS; QI, 2004) e difere quanto às cadeias laterais e ramificações. A literatura propõe vários modelos para a organização estrutural da amilopectina, os mais aceitos são os padrões de *clusters* (LINEBACK, 1986), modelo demonstrado na figura 5. As cadeias da amilopectina podem ser classificadas quanto ao seu tamanho ou posição dentro do grânulo de amido em A, B ou C (HIZUKURI *et al.*, 1985; WANG; COPELAND, 2013).

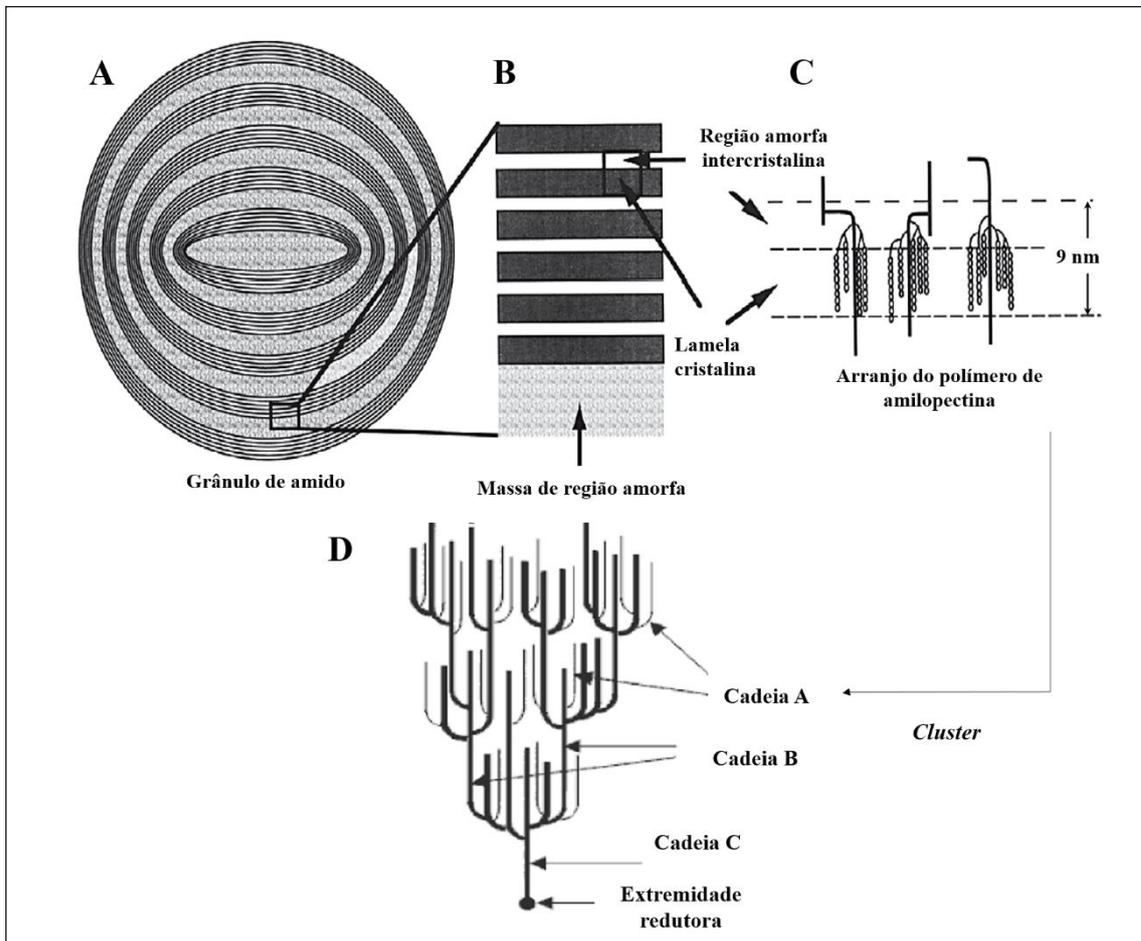
Figura 4 - Estrutura molecular da amilose e amilopectina.



Os amiloplastos constroem membranas internas que criam compartimentos de armazenagem do amido, depositado na forma de grânulos. O tamanho e o número dos grânulos de amido contido nos amiloplastos podem variar conforme espécie vegetal, como podemos observar na tabela 1 (LINEBACK, 1986). Algumas espécies vegetais depositam um grânulo maior, enquanto outras depositam vários pequenos grânulos em formato variável (oval, redondo, elíptico, lenticular ou poliédrico) e tamanho do grânulo (2 a 100 nm). Há diferenças também quanto a distribuição dos grânulos (unimodal, bimodal, trimodal) (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). A matriz proteica da fonte e a diversidade existente na organização granular afeta a temperatura de gelatinização do amido.

A arquitetura granular precisa do amido ainda não é totalmente conhecida (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Os polissacarídeos dos grânulos de amido parecem ser depositados de forma ordenada em anéis dispostos em um núcleo amorfo de amilose e amilopectina desordenada com padrão concêntrico de anéis de crescimento, alternado em regiões amorfas e cristalinas que confere a característica semicristalina do grânulo (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; PARKE; RING, 2001). A cristalinidade se deve ao entrelaçamento das cadeias externas da amilopectina na forma de dupla hélice (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; WANG; COPELAND, 2013).

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura lamelar de um grânulo de amido.



(A) Lamelas microcristalinas separadas por anéis de crescimento amorfo. (B) Visão ampliada das regiões amorfa e cristalina. (C) Estruturas helicoidais duplas formadas por cadeias adjacentes de amilopectina dão origem a lamelas cristalinas. Os pontos de ramificação constituem as regiões amorfas. (D) Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C.

A organização das cadeias do tipo A, B e C e a quantidade de amilose e amilopectina nos grânulos de amido induzem diferenças entre tipos de plantas na forma, tamanho e propriedades funcionais do amido, como na absorção de água, inchamento, comportamento de pasta, temperatura de gelatinização e susceptibilidade a ataque enzimático (LINEBACK, 1986; WANG; COPELAND, 2013).

Tabela 1 - Propriedades granulares de amidos

<b>Fonte</b>	<b>Temperatura gelatinização, °C</b>	<b>Forma do grânulo</b>	<b>Tamanho grânulo, nm</b>	<b>Amilose, %<sup>1</sup></b>
Cevada	51-60	Redondo ou Elíptico	20-25 ou 2-6	22
Triticale	55-62	Redondo	19	23-24
Trigo	58-64	Lenticular ou Redondo	20-35 ou 2-10	26 (23-27)
Centeio	57-70	Redondo ou reticular	28	27
Aveia	53-59	Poliédrico	3-10	23-24
Batata	59-68	Oval	40 (15-100)	23
Milho	62-72	Redondo ou poliédrico	15	28
Milho de alta amilopectina	63-72	Redondo	15 (5-15)	1
Sorgo	68-78	Redondo	35	25 (23-28)
Milho	67-80	Redondo, Bastão irregular	25	52

<sup>1</sup> % relativa a proporção de amilose e amilopectina; Amilose: Calculado a partir de medições de capacidade de ligação de iodo.

O amido possui características térmicas e funcionais que permitem seu uso na indústria de produtos alimentícios (LINEBACK, 1986). O milho comum possui grânulos na forma redonda ou poliédrica, com tamanho médio 15 nm, teor médio de amilose de 28% em relação à amilopectina e temperatura de gelatinização em torno de 70°C (KUAKPETOON; WANG, 2007; LINEBACK, 1986). As características de gelatinização e retrogradação do amido pois podem afetar o processo de gelatinização do amido (WANG; COPELAND, 2013; RATNAYAKE; JACKSON, 2008).

As zeínas de superfície do grão e a alta quantidade de pontes de hidrogênio dentro do grânulo, caracterizada pela estrutura semicristalina ordenada, aumentam a estabilidade intra e intermoleculares e desfavorece a absorção de água (FORSBERG; CHENG; WHITE, 1995). Os processamentos dos grãos geralmente quebram essas estruturas. A moagem promove quebra do endosperma, aumenta a área de superfície e pode facilitar a entrada de água dos processos térmicos (RATNAYAKE; JACKSON, 2008) que solubilizam o amido por rompimento das pontes de hidrogênio e a cristalinidade formando uma pasta gelatinosa (WANG; COPELAND, 2013; RATNAYAKE; JACKSON, 2008). A gelatinização é um processo que consiste na mudança na estrutura ordenada do amido para uma estrutura não ordenada, sendo irreversível

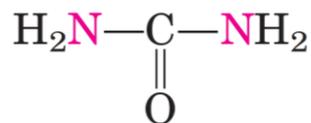
pois ocorre a nível molecular e físico e muda as propriedades estruturais (RATNAYAKE; JACKSON, 2008). A água penetra as regiões amorfas do amido causando inchamento e gera uma força disruptiva nas regiões cristalinas que perdem as duplas hélices à medida que aumenta a temperatura do sistema (LINEBACK, 1986).

A retrogradação ou recristalinização é a tendência da pasta formada, que se encontra instável, em perder energia cinética (WANG; COPELAND, 2013). Essa perda aumenta as atrações a nível molecular e favorece o restabelecimento de pontes de hidrogênio, consequentemente a perda de água e formação de uma nova estrutura à medida que a temperatura do amido extrusado é reduzida.

#### 2.8.2.2. Estrutura química da ureia

Ureia, ou diaminometanal (figura 6), é um composto orgânico do grupo das amidas, fórmula química  $[CO(NH_2)]$ , produzido em escala industrial e usado para diversas finalidades, uma delas a nutrição dos ruminantes. Fisicamente o produto é um sólido cristalino de coloração esbranquiçada na forma de pérolas. Possui ponto de fusão de  $133^{\circ}C$ . A proteína bruta da ureia pode variar de 262,5 a 287,5% (42 a 46% de N).

Figura 6 - Estrutura química da molécula de ureia.



A produção industrial de ureia se inicia pela decomposição do gás metano ( $CH_4$ ) em monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e hidrogênio (H) sob alta temperatura. O  $H^+$  liberado se liga ao nitrogênio do ar ( $N_2$ ) formando amônia ( $NH_3$ ). Em sequência é formado o carbamato de amônio ( $NH_4COONH_2$ ) pela ligação da  $NH_3$  e  $CO_2$  dentro de reator sob alta temperatura e pressão. Reação:  $CO_2 + 2 NH_3 \rightarrow CO(NH_2)_2 + H_2O$ , ocorre a  $200^{\circ}C$  e 100 atm. A mistura passa através de torres separadoras de alta e baixa pressão, a vácuo, num processo de purificação (GUIMARÃES JÚNIOR *et al.*, 2016).

#### 2.8.3. Extrusão patenteada de amido-ureia

A maioria dos trabalhos com EAU utilizaram a metodologia de processamento proposta por Helmer *et al.* (1970a) e patenteada por Bartley e Deyoe (US Patent 3.642.489 de 15 de

fevereiro de 1972. Kansas State University Research Foundation, Manhattan, EUA. United States Patent: 3642489 (uspto.gov)) assim como o processo industrial segue diretrizes próximas ao definido por estes autores. Eles relatam que diversos tipos de cereais podem ser utilizados para extrusão, como sorgo, milho, trigo, batata e cevada. Na patente recomenda-se que o teor de PB da mistura entre fonte de amido e ureia seja preferencialmente mantido entre 24 e 54%. O processo de extrusão ocorre por alta temperatura, média umidade e alta pressão da mistura. A primeira etapa, de pré-condicionamento, consiste na moagem fina do grão. Os ingredientes são misturados e extrusados conjuntamente formando a mistura reagida. A patente baliza alguns pontos relativos ao processamento visando bom manuseio, armazenamento e determinam a funcionalidade do material. A temperatura varia de 93 a 177°C, pressão na câmara de condicionamento entre 400 a 500 psi e a umidade indicada depende da proporção de ureia no produto e varia entre 15 a 30% do peso da mistura, considerando a umidade presente nos cereais. Produto com maior inclusão de NNP, mais próximas de 18,7% de ureia, pode dificultar o processo de manuseio e armazenamento do produto além de aumentar o risco rejeição do produto pelos animais pelo excesso de ureia, perdendo sua função básica. O tempo de processamento é entre 1 a 2 e meio minutos. Após extrusado o produto é seco e triturado, sendo indicado a umidade final menor que 14%.

#### 2.8.3.1. A gelatinização do amido ureia extrusado

A gelatinização do amido é citada por Bartley e Deyoe (1981) como o determinante da qualidade da EAU. É desejável que o nível de gelatinização desejável para o grânulo seja maior que 50%, preferencialmente entre 80 a 100% (BARTLEY; DEYOE, 1972). A gelatinização causa danos a estrutura morfológica natural do grânulo, reduzindo a estabilidade causada pelas pontes de hidrogênio e aumentando o acesso das enzimas digestivas às ligações glicosídicas, e aumenta eficiência de conversão do N-microbiano (tabela 2) por reduzir a liberação do N no meio ruminal. Estudando o método de processamento do grão de milho Helmer *et al.* (1970a) observaram que a mistura de milho moído mais ureia incubada não reagida por 4 horas *in vitro*, método similar a Tilley e Terry (1964), teve maior acúmulo de N (113,5 mg/100mL) e menor crescimento bacteriano (26,8 mg/dL) quando comparado com os tratamentos milho expandido mais ureia sem extrusão ou EAU, média de 83 mg/100mL de N-amônia acumulada e 45,5 mg/100mL de proteína bacteriana. Os três tratamentos continham 44% de PB na matéria natural. Resultados equivalentes foram encontrados por Barr, Bartley e Meyer (1974) em que a

mistura de milho expandido mais ureia não reagida e EAU 44% apresentaram maior proteína bacteriana (57,5 mg/100mL) em relação a mistura de milho moído mais ureia (10,7 mg/100mL).

A gelatinização também foi testada por Stiles *et al.* (1970) com amireia de sorgo, dados na tabela 2. Os autores avaliaram o efeito de quatro métodos de processamento de grãos de sorgo sobre o N-amoniaco *in vivo* (n = 4) vacas alimentadas com 3,6 kg de concentrado contendo 3% de ureia e 3,6 kg de feno de alfafa, em um delineamento em quadrado latino. O milho moído grosso + ureia promoveu maior acúmulo de NH<sub>3</sub> ruminal enquanto EAU 25% reduziu esse acúmulo. Na avaliação do N-amoniaco do dia 7 parece ter havido uma adaptação aparente e os tratamentos apresentaram valores similares (34,6 mg/100 mL), exceto para o milho moído + ureia que manteve N-NH<sub>3</sub> maior (48,1 mg/100 mL). Os autores relatam que a ração com EAU foi mais uniforme e prontamente consumida comparada as demais, isso justifica o gasto financeiro adicional com processamento de extrusão para reagir amido e ureia na EAU.

Tabela 2 - Concentração de nitrogênio amoniacal e síntese de proteína microbiana *in vitro* e *in vivo* de grãos não-processados mais ureia ou EAU nos Estados Unidos.

	N-amoniacal	Proteína bacteriana <sup>4</sup>
	mg/100mL	
Helmer <i>et al.</i> (1970a) <sup>1</sup>		
EAU 44%	81,2 <sup>b</sup>	49,7 <sup>b</sup>
Milho expandido + ureia 44%	84,8 <sup>b</sup>	41,3 <sup>b</sup>
Milho moído + ureia 44%	113,5 <sup>c</sup>	26,8 <sup>c</sup>
Barr, Bartley e Meyer (1974) <sup>2</sup>		
EAU 44% *		57 <sup>b</sup>
Milho expandido + ureia 44% *		58 <sup>b</sup>
Milho moído + ureia 44%		10,7 <sup>c</sup>
EAU de sorgo 70% *		62,1 <sup>d</sup>
Sorgo moído + ureia 70%		6,7 <sup>e</sup>
Stiles <i>et al.</i> (1970) <sup>3</sup>		
	Dia 2	
Milho moído grosso + ureia	51,8 <sup>a</sup>	-
Milho moído fino + ureia	42,8 <sup>ab</sup>	-
Milho expandido + ureia	46,8 <sup>ab</sup>	-
EAU 25%	33,6 <sup>c</sup>	-
	Dia 7	
Milho moído grosso + ureia	48,1 <sup>a</sup>	-
Milho moído fino + ureia	36,8 <sup>b</sup>	-
Milho expandido + ureia	35,3 <sup>b</sup>	-
EAU 25%	31,7 <sup>b</sup>	-

<sup>1</sup>Incubação em fluido ruminal *in vitro* (4h); <sup>2</sup>Coleta fluido ruminal *in vivo* (coleta semanal durante 8 semanas), Dia 1: 1, 2, 3, 4, 6 e 8h; Dia 2: 1, 2, 3 e 4 horas após alimentação. \*Dano ao amido acima de 80%. <sup>abcde</sup>Valores dentro de cada grupo que compartilham uma letra comum não são significativamente diferentes (<sup>1</sup> $P < 0,05$ , <sup>2,3</sup> $P < 0,01$ ). <sup>4</sup>Proteína bacteriana foi obtida da centrifugação do inóculo ruminal, coado, desnaturado com ácido tricloroacético e lavado com tampão, com posterior liofilização da amostra análise deN-total pela técnica de micro-Kjeldahl.

Problemas no processo de extrusão pode promover gelatinização incompleta do amido e impacta a qualidade da EAU, como pode ser visto em alguns estudos evidenciados na tabela 3. O grau de gelatinização ou solubilização do amido nas EAU's de sorgo 70% PB influenciaram a síntese proteica quando incubada em fluido ruminal mais tampão sem ureia por 4 h a 39°C *in vitro* (BARR; BARTLEY; MEYER, 1974). A EAU com 67,5% de dano ao grão (medido por maltose dividida pela mistura de grão) teve síntese bacteriana de 33,3 mg/100 mL, enquanto EAU 70% com dano ao amido de aproximadamente 80% obteve síntese bacteriana mais elevada, 61,6 mg/100 mL ( $P < 0,01$ ).

A gelatinização parcial ou incompleta afetou o balanço de N em cordeiros, no entanto esse efeito é maior para algumas fontes de amido como sorgo e batata. Houve aumento do N-amoniaco ruminal até as 4 horas possivelmente devido à baixa fermentabilidade do amido no rúmen e redução da retenção do N para EAU de batata com gelatinização parcial (HARBERS; SCHIEHZADEZ, 1975). A EAU de sorgo com gelatinização parcial promoveu redução da retenção do N (%) em comparação ao processamento completo nos dois estudos (SCHIEHZADEH; HARBERS, 1976; HARBERS; SCHIEHZADEZ, 1975). O efeito da gelatinização parcial não parece ter influenciado fortemente as respostas para EAU de milho e trigo (SCHIEHZADEZ; HARBERS, 1976) e pode indicar que possíveis falhas de processo são menos graves para essas fontes. Dados sugerem que a melhoria da captura do N é devido a aumento de energia disponível na EAU, reflexo da correta solubilização do carboidrato na extrusão.

Tabela 3 - Efeito do grau de gelatinização de amido ureia extrusados com 45% PB e diferentes fontes de amido (sorgo, batata, milho, trigo) sobre a digestibilidade da matéria seca (DMS), digestibilidade da proteína bruta (DPB), relação acetato e propionato ruminal e balanço de N.

GG <sup>1</sup>		DMS	DPB	A/P	N-urina	N-fecal	N-retido	N-retido
		%				g/d		%ingerido
Schiehzadeh e Harbers, (1975) <sup>3</sup>								
Sorgo	Parcial	56,7 <sup>b</sup>	58,2	2,82	9,3	8,0	2,1	10,6 <sup>c</sup>
	Completa	52,4 <sup>b</sup>	57,4	2,5	10,0	9,0	3,1	14,0 <sup>b</sup>
Batata	Parcial	35,3 <sup>c</sup>	55,8	2,9	12,4	8,4	-2,1	-11,3 <sup>d</sup>
	Completa	54,3 <sup>b</sup>	62,5	2,9	11,6	7,8	2,7	13,9 <sup>b</sup>
EP <sup>2</sup>		3,04	3,1	0,25	3,11	0,86		0,52
Harbers e Schiehzadeh, (1976) <sup>4</sup>								
Sorgo	Parcial	64,5	73,6		21,0 <sup>a</sup>	8,5 <sup>bc</sup>	2,7 <sup>b</sup>	9,2
	Completa	66,2	69,0		17,0 <sup>bc</sup>	9,9 <sup>ab</sup>	5,2 <sup>ab</sup>	17,3
Milho	Parcial	58,4	71,5		16,2 <sup>c</sup>	9,3 <sup>ab</sup>	6,7 <sup>a</sup>	23,1
	Completa	60,0	72,2		17,9 <sup>bc</sup>	8,3 <sup>bc</sup>	6,0 <sup>a</sup>	16,3
Trigo	Parcial	61,2	75,7		19,1 <sup>ab</sup>	7,4 <sup>c</sup>	5,7 <sup>a</sup>	14,5
	Completa	62,8	73,5		17,5 <sup>bc</sup>	8,6 <sup>bc</sup>	6,2 <sup>a</sup>	19,9
EP <sup>2</sup>		1,59	1,40		0,76	0,47	0,88	

<sup>1</sup>GG: grau de gelatinização equivalente a mg maltose/g amostra: Parcial (150 unidades de maltose) vs. Completa (maior que 200 unidades de maltose) <sup>2</sup>EP = erro padrão da média; <sup>3,4</sup>EAU's com 45% de PB; cordeiros alimentados com 60% feno (prairie hay); Letras diferentes dentro de um mesmo estudo diferem entre si ( $P < 0,05$ ); <sup>3</sup> n = 5 e <sup>4</sup> n = 6 cordeiros/grupo.

Kozerski *et al.*, (2021a) descreveram o fracionamento químico e solubilidade do N em água da mistura ureia mais milho sem extrusão vs. EAU 200S (tabela 4). O fracionamento de ambos foi similar. A fração 'a' ou proteína solúvel de origem não-proteica compreendendo a 89,6% da PB da mistura e 91,8% da PB na EAU. Frações "b" aparentemente são contribuições da proteína do milho. Numericamente as frações "b1" e "b2" respectivamente proteína

verdadeira de rápida e intermediária degradação da EAU foram menores que a essas frações na mistura não processada. Eles observaram diferenças na solubilização do N em água (39°C) apenas até 30 minutos.

Tabela 4 - Caracterização nutricional da mistura de milho e ureia e amido ureia extrusada ou reagida (% da matéria seca).

	Mistura	Ureia extrusada
Matéria Seca	96,1	96,1
Matéria Orgânica	99,5	99,6
Extrato Etéreo	3,3	3,2
Carboidratos Totais	27,1	27,8
Carboidratos Não-Fibrosos	19,5	21,8
FDNcp	5,2	3,3
FDA	2,2	1,8
Proteína Bruta (PB, N-total x 6,25)	204	203
Fracionamento químico <sup>1</sup> , %MS		
Fração a	182.7	186.3
Fração b1	10.7	8.3
Fração b2	5.5	3.3
Fração b3	1.4	1.5
Fração c	3.8	3.6

<sup>1</sup> CNCPS; Fonte: Adaptado de Kozerski *et al.* (2021a)

Kozerski *et al.* (2021a) avaliaram a morfologia dos materiais: ureia, milho moído, mistura milho moído mais ureia e EAU 200S por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que nos dá indícios se houve a formação do gel e ruptura dos grânulos do amido na gelatinização após processado, além de caracterizar os produtos. Neste trabalho a ureia apresentou forma esférica. O milho moído uma estrutura dispersa e se evidenciou grânulos do amido em formas arredondadas. A mistura de ureia e milho moído não apresentou forma definida, sendo possível visualizar alguns grânulos de amido arredondados. Por fim a EAU 200S apresentou estrutura complexa, definida e com aglomerados e não possuía os grânulos de amido na sua forma arredondada de origem, pois há ruptura durante processo de extrusão. Quanto mais visual da estrutura de ureia, mais fácil será o acesso da água e de degradação do produto no ambiente (IBRAHIM; BABADI; YUNUS, 2014).

Do ponto de vista microestrutural o amido possui estrutura molecular e granular complexas e forte afinidade por água que lhe confere a propriedade de gelatinizar e retrodegradar (WANG; COPELAND, 2013). Essas possibilitam a mistura do mesmo com outras substâncias para conferir características de liberação lenta e controlar a liberação de nitrogênio no solo (BEIG *et al.*, 2018) e dieta de ruminantes (HELMER *et al.*, 1970ab; SIEMION *et al.*,

2004). O processo de extrusão para obtenção da EAU impede a rápida solubilização do nitrogênio pois modifica a estrutura na gelatinização do amido e complexação da ureia (KOZERSKI *et al.*, 2021a).

Existem quebras e reestruturações moleculares causadas pela gelatinização do amido na extrusão (WANG; COPELAND, 2013; TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Os trabalhos sobre o polímero de EAU não detalham as modificações estruturais ocorridas no amido mais ureia durante fabricação do produto. Os idealizadores da EAU enfatizam que a qualidade da gelatinização afeta profundamente a funcionalidade dessa ureia de liberação lenta (BARTLEY *et al.*, 1981; STILES *et al.*, 1970) pensando principalmente na melhoria da energia disponível oriunda da degradação do amido que melhora a captura do N pela microbiota. Aqui será sugerido possíveis associações intra e intermoleculares que podem ocorrer no processo.

Como vimos antes, durante extrusão há ruptura das pontes de hidrogênio da amilose e amilopectina. Essa desestabilização molecular favorece a entrada de água e a formação de uma pasta. A ureia, potente plastificante, auxilia na entrada de água na molécula do amido e reduz a temperatura de transição vítrea durante processamento hidrotérmico (GAMARANO *et al.*, 2018). O padrão de processamento, como aquecimento, umidade e pressão, e as temperaturas usadas na extrusão da EAU (90 a 180°C) quando mantidas não sugerem que possa haver ligações de reticulação para formação de novos compostos, pois para tal seria necessária temperatura mais altas. É citado por Harbers e Schiehzadez (1975) que Bartley, em comunicação pessoal com os autores, afirma que 98% da ureia original pode ser recuperada de produtos extrusados e que estudos de espectrofotometria infravermelha não mostraram novos compostos como carbamatos ou biureto, sendo formada alguma ligação de hidrogênio ou outros estados físicos que podem ser úteis em manter a utilização eficaz da EAU. Isso foi recentemente determinado por Kozerski *et al.* (2021a) que observaram comportamento semelhante para EAU 200% ou mistura de milho moído mais ureia na curva termográfica derivada (DTG). A curva da mistura foi intermediária em relação à ureia e ao milho puro, indicando que não houve interação química entre os componentes com formação de novos compostos.

#### 2.8.3.2. **Relação amido:ureia do amido ureia extrusado**

Ao adentrar a literatura existente para EAU notamos uma ampla diversidade de inclusão da ureia na formulação, e obviamente culmina em menor inclusão do milho fino. Nesses produtos a PB variou de 34% a 200%, com aumento gradual ao longo dos anos (tabela 6). Independente da composição em PB todos eles têm em comum a gelatinização do amido de

grãos. Para diferenciação dessa diversidade de EAUs, por regra os produtos são nominados conforme o teor de PB, por exemplo: “EAU” 44%, e o termo “S” é incluído ao final para identificar a inclusão de enxofre na composição, por exemplo: EAU 44S.

Resultados mais antigos sugerem que EAU's de menor teor proteico apresentam maior crescimento microbiano e redução do N-amônia em meio ruminal *in vitro* (HELMER *et al.*, 1970a) e *in vivo* (STILES *et al.*, 1970; HELMER *et al.*, 1970b). Geralmente esses dois efeitos são explicados pela maior inclusão de milho gelatinizado de alta fermentabilidade no rúmen, que favorece o ataque enzimático ao amido e a obtenção de energia mais rapidamente pelas bactérias.

No entanto, como detalhado no tópico anterior, devemos enfatizar que o amido é o agente com propriedades funcionais na extrusão e que as alterações microestruturais permitem a complexação da ureia na estrutura do amido quando a temperatura do processo é próxima ou ultrapassa seu ponto de fusão da ureia (133°C). Ligações cruzadas e formação de novos compostos são indesejadas nutricionalmente e não parecem ocorrer no processo de fabricação da EAU, com predominância de ligações mais fracas como as pontes de hidrogênio (KOZERSKI *et al.*, 2021a; HARBERS; SCHIEHZADEH, 1975).

Nos estudos realizados e patenteados por Bartley e Deyoe (1972) a indicação de inclusão de equivalente proteico no produto é entre 24 e 60% PBeq, valor de inclusão de 5,5 a 18,7% de ureia, bem menor que os 150-200% das EAU's desenvolvidas e utilizadas no Brasil. Os autores justificam que acima desse intervalo de inclusão a massa gerada durante o processamento é muito gelatinosa e pastosa, dificultando o manuseio durante extrusão. Além disso, valores altos de NNP podem retornar os níveis de baixa palatabilidade do produto. As maiores relações amido: ureia foram avaliadas por Stiles *et al.* (1970) com EAU feita com sorgo (25% PB) para vacas Holstein fistuladas e Helmer *et al.*, (1970b) com EAU de milho (23% PB) para gado de leite, produto com inclusão de 5,4% de ureia na formulação da EAU. Esses autores citam que os trabalhos iniciais conduzidos no *kansas* sugeriam esse teor como a melhor relação para o produto por reduzir toxicidade e o N-amônia ruminal, além de melhorar o consumo.

Com o decorrer do tempo e o decorrer das pesquisas a redução da relação amido ureia foi baseada em trabalhos que não encontraram diferenças significativas no desempenho dos animais entre EAU com alta ou baixa proteína. Esse aumento da ureia era justificado pelo aumento de coproduto na alimentação dos ruminantes. Trabalhos americanos testaram EAU com até 84% sem grandes diferenças na retenção do N. Essa literatura será mencionada a seguir.

Considerando o balanço de N, Harbers e Schiehzadeh (1975) não observaram diferenças para EAU de sorgo com 44% vs. 70% PB na excreção urinária de N (11,7 g/d), retenção de N (1,15 g/d) e porcentagem de N retido em relação ao absorvido (8,8%), o que sugere que a relação amido: ureia não afetou retenção do N. Ambos foram melhores que a ureia (respectivamente: N-urina 12,1g/d, retenção de 0,56 g/d ou 4,4%). A amônia ruminal foi menor para EAU 44% até 3 horas após alimentação. Schiehzadeh e Harbers (1976) avaliando ureia e EAU's de sorgo com 44, 56, 70 e 84% de PB, observaram menor retenção de N para EAU 44% e 70% (2,70 g/d), maior retenção para EAU 84% (6,72 g/d,  $P < 0,05$ ) e ureia comum foi intermediária (5,07 g/d). As digestibilidades da MS, extrato etéreo, fibra bruta e PB foram similares ( $P > 0,20$ ). Nos dois trabalhos os autores avaliaram o efeito do grau de gelatinização em relação ao farelo de soja e também o efeito da relação amido: ureia como mencionado acima, e concluíram que o controle da gelatinização é mais importante na determinação de desempenho e retenção do N do que a relação de amido: ureia, pois houve retenção comparada ao farelo de soja para EAU's 44% com maior gelatinização, independente da fonte de grão (batata, sorgo, trigo, milho, porém EAU's de sorgo com diferentes teores de PB não foram superiores à ureia. A EAU 84% promoveu maior retenção de N nesse estudo e isso pode ter aberto possibilidades para aumento da proteína dos produtos de trabalhos posteriores.

No Brasil diversos trabalhos foram conduzidos com EAU de baixa PB em estudos de digestibilidade em gaiolas metabólicas (SALVADOR *et al.*, 2004; EZEQUIEL *et al.*, 2001a; SALMAN *et al.*, 1997). Havia o interesse de aumentar o teor proteico da EAU a fim de alcançar maior economia na suplementação proteica, possivelmente para competir com a ureia comum em equivalente proteico, chegando a EAU com até 200%.

Alguns trabalhos foram conduzidos por pesquisadores da Universidade Federal de Lavras com EAU e publicado o trabalho de Salvador *et al.* (2004) que comparou a eficiência da extrusão com 36%, 53%, 64% e 70% de ureia, aproximadamente 100%, 150%, 180% e 200% de PB, sob o consumo de MS, MO e FDN e coeficientes de digestibilidade das mesmas entidades nutricionais. Eles sugerem que utilizar EAU com menor relação amido: ureia não promove perda qualitativa da liberação lenta e as proporções testadas possuem a mesma eficiência qualitativa quanto à extrusão. A menor relação amido: ureia avaliada estava abaixo de qualquer outro estudo publicado, ou seja, não havia um controle experimental com maior relação de amido no produto. Os autores não relataram a digestibilidade aparente da PB, que apesar da contaminação endógena fecal, poderia gerar mais alguns possíveis indícios.

Bartley e Deyoe (1981) afirmam que a EAU melhora a disponibilidade de energia e retarda a liberação do N, no entanto os trabalhos são confusos em determinar se o efeito a nível ruminal é de melhora da captura do N pelas bactérias ou de fato pela liberação mais gradual do N. Se o fator mais importante for a disponibilização de energia, fator mais indireto, poderíamos inferir que a redução da relação de amido: ureia do produto impactaria negativamente nas respostas, principalmente em dietas que promovem limitação física no animal, pois proporcionaria menor energia e menor captura do N para síntese bacteriana ruminal. Isso também justificaria o propósito preferencial de produtos com relações mais altas do amido na EAU para estudos que originaram o produto.

Aumentar energia disponível para a microbiota ruminal pode reduzir acúmulo N-amoniaco e aumentar o crescimento bacteriano pela melhora da captura do N pelo rúmen (tabela 5). Os trabalhos de Helmer *et al.* (1970a) e Stiles *et al.* (1970) indicam que quantidade de energia fermentável na incubação e a gelatinização do amido influenciaram as respostas de estímulo à concentração microbiana e redução da amônia no fluido ruminal. Por outro lado, os constituintes no produto interagem durante a extrusão e seus constituintes são modificados, assim a quantidade de amido e qualidade da extrusão podem estar associados à formação do complexo de liberação lenta do N.

Tabela 5 - Utilização de nitrogênio de EAU, grão expandido + ureia e grão moído + ureia in vitro pela determinação de proteína bacteriana (precipitável em ácido tricloroacético) e nitrogênio amoniacal<sup>a</sup>.

	N-amoniacal	Proteína bacteriana <sup>1</sup>
	mg/100mL	
Sem milho moído		
EAU 34%	117,2 <sup>b</sup>	64,2 <sup>b</sup>
EAU 39%	122,5 <sup>b</sup>	66,3 <sup>b</sup>
EAU 44%	124,1 <sup>b</sup>	63,8 <sup>b</sup>
Milho expandido + Ureia 39%	126,3 <sup>b</sup>	59,6 <sup>b</sup>
Milho moído + Ureia 44%	156,0 <sup>c</sup>	41,9 <sup>c</sup>
Com diluição milho moído (16% PB)		
EAU 34%	45,8 <sup>bc</sup>	61,0 <sup>b</sup>
EAU 39%	42,0 <sup>b</sup>	67,3 <sup>c</sup>
EAU 44%	49,4 <sup>c</sup>	70,9 <sup>c</sup>
Milho expandido + Ureia 39%	49,3 <sup>c</sup>	61,5 <sup>b</sup>
Milho moído + Ureia 44%	56,4 <sup>d</sup>	47,9 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Média de cinco determinações executadas em duplicata; <sup>b,c,d</sup> Valores dentro de cada grupo que compartilham uma letra comum não são significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ). Adaptado: Helmer *et al.* 1970a. <sup>1</sup> Proteína bacteriana foi obtida da centrifugação do inóculo ruminal, coado, desnaturado com ácido tricloroacético elavado com tampão, com posterior liofilização da amostra análise deN-total pela técnica de micro-Kjeldahl.

De modo geral a literatura compara os trabalhos com EAU's, nessa infinita gama de teores proteicos, como sendo o mesmo produto, sem ponderar que podem existir diferenças entre eles. Esses mesmos trabalhos não parecem entrar em consenso para determinação do nível fixo ideal de inclusão de ureia, mas o panorama cronológico de publicações parece indicar que eles funcionam de maneira similar. No entanto, a digestibilidade aparente dos nutrientes não parece ser variável resposta que assegure que os produtos com diferentes relações de amido: ureia são similares, como proposto no trabalho publicado por Salvador *et al.* (2004), pois diz pouco sobre o metabolismo nitrogenado no rúmen e balanço do N no organismo animal. Permanece as perguntas: Existe uma relação amido: ureia ideal? Quais mecanismos explicam a liberação lenta do N na EAU? Na EAU a liberação do N é mesmo lenta ou disponibilidade de energia é maior e favorece a captura do N no meio?

Os estudos sugerem que o processamento é mais determinante na qualidade do produto do que a relação amido: ureia (SHIEHZADEH; HARBERS, 1974) pois a gelatinização melhora disponibilidade da energia vinda de degradação rápida do amido extrusado, que estimula captura do N em meio ruminal, reduz pH e mantém amônia ionizada no rúmen,  $\text{NH}_4$ ,

culminando em estímulo a síntese microbiana (BARTLEY; DEYOE, 1981; HELMER *et al.*, 1970a).

Tabela 6 - Teor de proteína bruta dos produtos de amido ureia extrusado.

<b>Referência</b>	<b>Equivalente proteico, EqPB</b>
	34,0%
Helmer <i>et al.</i> (1970a)	39,0%
	44,0%
Stiles <i>et al.</i> (1970) <sup>2</sup>	25,4%
Helmer <i>et al.</i> (1970b)	23,0%
Thompson <i>et al.</i> (1972)	45,0%
Schmidt <i>et al.</i> (1973)	50,2%
Morril e Dayton, (1974)	44,0%
Barr <i>et al.</i> (1974)	44,0%
	70,0%
Roman-Ponce <i>et al.</i> (1975)	44,0%
Jones <i>et al.</i> (1975)	72,4%
	44,0%
Shieh-zadeh e Harbers (1975)	70,0%
	44,0%
	56,0%
Harbers e Shieh-zadeh (1976)	70,0%
	84,0%
	50,0%
Reddy <i>et al.</i> (1981)	70,0%
Teller e Godeau (1985)	58,8%
Salman <i>et al.</i> (1997)	38,8%
Ezequiel <i>et al.</i> (2001ab)	38,8%
	100,0%
	150,0%
Salvador <i>et al.</i> (2004)	180,0%
	200,0%
Oliveira Júnior <i>et al.</i> (2004)	150,0%
Carmo <i>et al.</i> (2005)	150,0%
Mendes <i>et al.</i> (2010)	150,0%
Moraes <i>et al.</i> (2019)	200,0%
Kozerski <i>et al.</i> (2021ab)	200,0%

### 2.8.3.3. Amido ureia extrusado e processamento físico

Após processo de extrusão o produto é seco e pode ser comercializado nas formas integral, quebrada ou moída. O produto de EAU integral ou quebrado apresenta certo grau de segregação ao ser transportado e armazenado, e na forma moída pode ser interessante para homogeneização e mistura em suplementos. Porém, Teixeira *et al.* (1999) compararam o produto integral na forma de *Pellets* de 1cm, moído ou quebrado de EAU 45S (de amido de

milho) mas não observaram diferenças na degradabilidade efetiva da proteína bruta entre os processamentos físicos, mas a forma moída da EAU promoveu aumento da degradabilidade potencial, da taxa de degradação da MS e aumentou em 10% a solubilidade do N quando comparada a quebrada ou inteira. O grau de danificação do produto, principalmente moagem fina, pode gerar perda da capacidade de retardar a liberação do N e influenciar em maior taxa de solubilização do N no rúmen. Pires *et al.* (2004) observaram similaridade entre os tratamentos EAU 150S e ureia no CMS, ganho de peso e conversão alimentar de bovinos de corte confinados e atribuiu o resultado adverso à moagem da EAU com alto equivalente proteico.

## **2.9. Efeitos comparativos do extrusado ureia-amido, ureia e proteína vegetal em ruminantes**

### **2.9.1. Efeito das fontes proteicas na toxicidade por amônia**

A ureia ingerida é degradada no rúmen a amônia, composto tóxico para os mamíferos (NELSON; COX, 2014), porém a ureia normalmente não é tóxica. Quaisquer compostos que promovam excessos de amônia absorvidas via parede ruminal para sistema sanguíneo portal e que ultrapassem a capacidade do fígado em metabolizar em ureia, culmina em acúmulo de amônia no sistema e efeitos potenciais na redução de ingestão alimentar e toxidez. Sintomas de toxicidade foram percebidos por Owens e Bergen (1983) com amônia no sangue acima de 20 mg/L e pH ruminal próximo a 8, e acima de 40 mg/L no sangue geralmente ocorre morte do animal.

A ureia dietética consumida em grandes quantidades em pouco tempo pode ser tóxica (HELMER; BARTLEY, 1971). A rápida hidrólise ruminal da ureia a amônia, estimada entre 30 a 120 minutos (REKIB; SADHU, 1986) e a elevação do pH ruminal gerado pela alcalinidade da ureia, eleva a absorção de N-NH<sub>3</sub> para sangue (OWENS; BERGEN, 1983) juntos aumentam o risco de toxicidade, podem reduzir o consumo de alimento (ALLEN *et al.*, 2009). O problema de toxicidade é atualmente contornado usando menores inclusões de ureia na dieta para ruminantes. Patra (2015) cita alguns fatores que influenciam o uso da ureia, como: frequência de alimentação, disponibilidade de carboidratos fermentáveis na dieta, nível de ureia suplementar, suprimento de minerais (enxofre e fósforo principalmente), quantidade e solubilidade das proteínas da dieta e produtos de ureia de liberação lenta.

Vale enfatizar que o aumento de N-NH<sub>3</sub> no rúmen não significa necessariamente em perdas excessivas para sangue e toxidez, pois pode ser retida anabolicamente pela microbiota

ruminal (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). Isso é mencionado em estudo clássico de Bartley *et al.* (1976) em que observaram baixa correlação entre toxicidade e N-amônia ruminal ( $r = 0.039$ ). Por outro lado, a correlação entre pH ruminal e toxicidade foi positivamente moderada ( $r = 0.32$ ) e N-amônia no sangue é fortemente correlacionada a toxicidade ( $r = 0.70$ ).

O aumento de amônia sanguínea é seguido por elevação do NUP. O aumento do *pool* de N-ureico no organismo animal pode indicar adaptação hepática metabólica para lidar com excessos de amônia, no entanto é um parâmetro com alta variabilidade ao longo do dia (JONKER *et al.*, 1998). A ureogênese no fígado é uma tentativa de desintoxicar o organismo da amônia excessiva e prevenir a hiperamonemia periférica (NELSON; COX, 2014). O N-ureia sanguínea e toxicidade apresenta correlação baixa e negativa ( $r = -0,19$ , BARTLEY *et al.*, 1976) e NUP tem alta correlação com absorção de amônia pelo PDV ( $r = 0.84$ , LAPIERRE; LOBLEY, 2001) vinda em grande parte do rúmen.

Alta concentração de amônia ruminal associada a alto pH é um bom indicador de toxicidade. Aumento do pH ruminal aumenta o transporte de amônia através do epitélio ruminal na forma não protonada ( $\text{NH}_3$ , livre) e permeável nos tecidos por difusão simples, enquanto em pH menor há maior predominância da forma protonada ( $\text{NH}_4$ , íon amônio) menos permeável ao tecido epitelial (ABDOUN; STUMPF; MARTENS, 2006). Isso indica que aumento de carboidratos fermentáveis pode aumentar a retenção de amônia no rúmen, mantendo o pH mais baixo pelo aumento de AGCC e aumenta a síntese microbiana, como ocorre pelo amido presente na EAU (BARTLEY; DEYOE, 1981).

A toxicidade aguda por amônia é um risco a vida dos animais. Normalmente a dose de 0,5 gramas de ureia por quilo de peso corporal (g/kg PC) foram usadas por causar toxicidade: 0,4 para ovelhas (DINNING *et al.*, 1948); 0,6 em bovinos (STILES *et al.*, 1970) e 0,5 g/kg PC em bovinos (DAVIDOVICH *et al.*, 1977). Bartley *et al.* (1981) não observaram intoxicação em novilhos holandeses consumindo ureia em 0,125 e 0,25 g/kg de peso corporal, mas 0,5 g/kg de peso corporal (PC) provocou sintomas de toxidez. Nesses animais após 5 minutos a dosagem de amônia ruminal aumentou de 9,7 para 32 mg/100ml, pH ruminal de 6,47 para 7,87, amônia no sangue portal 1,02 para 8,01 mg/100ml, no sangue da jugular 0,13 para 0,36 mg/100 mL e no sangue carotídeo de 0,18 para 1,17 mg/100 mL. BARTLEY *et al.* (1976) observaram que é provável que ocorra toxicidade quando as concentrações de amônia no sangue da jugular excedem 0,8 mg/100 ml.

Os sinais de toxicidade ocorrem logo após ingestão de ureia. Stiles *et al.* (1970) observaram sinais de intoxicação com 100mg/100mL de  $\text{NH}_3$  ruminal aos 30 minutos, e

frequentemente correspondem a: tremores musculares, mal-estar, salivação excessiva, dificuldades respiratórias, incoordenação ou ataxia, micção frequente, timpanismo, tetania, prostração e morte (STILES *et al.*, 1970; PATRA, 2015). Em média, Bartley *et al.* (1976) observaram que tetania muscular apareceu após 52,8 minutos após infusão de 0,5 g/kg de PC de ureia em bovinos mantidos em jejum por 16h.

Maiores quantidades de ureia podem ser toleradas com maior inclusão de carboidratos fermentáveis na dieta (PATRA, 2015) e com adaptação dos animais a ureia (STILES *et al.*, 1970). Maior dano ao amido possui correlação negativa com concentração de  $\text{NH}_3$  ruminal ( $r = -0.21$ ), mas não se correlacionou com pH e toxicidade (BARTLEY *et al.*, 1976). A EAU se mostrou menos tóxica comparada a mistura de grãos mais ureia não processados (DAVIDOVICH *et al.*, 1977; STILES *et al.*, 1970). Bartley e Deyoe (1981) mencionam uma sugestão de Smith (1974) que diz ser mais sensato controlar toxidez com fornecimento adequado de energia disponível do que utilizar fontes mais caras em substituição a ureia.

Foi demonstrado por Stiles *et al.* (1970) que EAU é menos tóxica do que misturas de grãos e ureia não processados. Duas vacas holandesas (680 kg de PC), não adaptadas e dois bovinos adaptados (500kg de PC), foram alimentados com feno de alfafa e concentrado contendo grãos de sorgo e 20% de ureia, para atingir equivalência de 0,6 g/kg PC de ureia para tratamentos EAU ou grão moído de sorgo mais ureia não processados. Em bovinos consumindo EAU foram observados menor frequência de sinais de toxidez sob o mesmo consumo de ureia (g/kg PC). Animais não adaptados à dieta com ureia foram mais susceptíveis à  $\text{NH}_3$ , enquanto os adaptados consumiram o dobro de ureia, 10,8 g/kg PC, antes de causar toxicidade. A alta concentração, próximas a 100 mg/dL, de  $\text{NH}_3$  ruminal aos 30 minutos parecia ter maior relação com toxicidade. Os autores relatam que um novilho recebeu 616 g de ureia na forma de EAU, sem ocorrência de sintomas de toxicidade.

Na tabela 7 podemos observar que a mistura de grão de sorgo quebrado mais ureia promoveu intoxicação dos animais entre 30 e 60 minutos após consumo de ureia. Animais consumindo mistura não processada elevou para 58,3 mg/100 mL a  $\text{N-NH}_3$  ruminal e o pH (7,8) o que acelerou as perdas para o sangue, chegando a 1,05 mg/100 mL nível de toxidez. A EAU, apesar de elevar a amônia ruminal não alterou o pH e aparentemente resultou em menor concentração de amônia sanguínea (0,4 mg/100mL). Resultados similares são apresentados por Davidovich *et al.* (1977) e Bartley *et al.* (1976).

Tabela 7 - Efeito de misturas processadas por extrusão ou não processadas de grão e ureia no pH ruminal, amônia ruminal e concentração de amônia no sangue<sup>1</sup>

Produto	Tempo após mistura teste administrada (min)						
	0	30	60	90	120	180	240
	pH ruminal						
Grão quebrado + ureia	6,8	7,8	Toxicidade				
Grão extrusado + ureia <sup>2</sup>	6,8	7,2	7,4	7,4	7,3	7,1	6,9
	N-NH <sub>3</sub> ruminal (mg/100mL)						
Grão quebrado + ureia	6,7	58,9	Toxicidade				
Grão extrusado + ureia <sup>2</sup>	8,2	50,2	71,5	84,9	88,9	91,3	87,4
	N-NH <sub>3</sub> sangue (mg/100mL)						
Grão quebrado + ureia	0,12	1,05	Toxicidade				
Grão extrusado + ureia <sup>2</sup>	0,11	0,40	0,46	0,53	0,56	0,53	0,47

<sup>1</sup>Dose de 0,5 gramas de ureia por kg de peso corporal. <sup>2</sup> Produto da extrusão da ureia e do sorgo. Adaptado: dados não publicados de Davidovich *et al.* (1976) apud Bartley e Deyoe, (1981).

O aumento da absorção trans epitelial da amônia para sangue em pH acima de 7,3 é reforçada por Davidovich *et al.* (1977), que além da dinâmica similar observada de aumento para pH, teve NH<sub>3</sub> ruminal em concentrações iguais e NH<sub>3</sub> sanguínea aumentada. Os autores observaram também aumento de amônia na forma livre no rúmen para animais consumindo mistura de grão e ureia comparada a EAU, 5,82 mg/100mL de NH<sub>3</sub> ionizável aos 30 minutos para mistura não processada, com sintomas de intoxicação posteriores, enquanto EAU foi de 1,8 mg/100mL ( $P < 0,05$ ). Nesse estudo 75% (9/12 observações) de bovinos recebendo mistura não processada apresentaram intoxicação por ureia, enquanto apenas 20% apresentaram sintomas quando consumindo EAU (8/39 observações) ( $P < 0,05$ ).

A concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen foi similar para tóxico como para não tóxico, mas foi diferente para pH ruminal e NUP, o que sugere que amido fermentou mais rapidamente nas observações não tóxicas resultando em maior produção de AGCC, com redução do pH ruminal e da absorção de NH<sub>3</sub>. E pode também ser atribuída a mudança na forma física da ureia processada (BEHNKE *et al.*, 1973). O NUP aumentou linearmente e teve mesma proporção para amostras tóxicas e não tóxicas. Possivelmente NH<sub>3</sub> foi transportada através do sistema portal para fígado e não aumentou no sangue periférico pois o fígado foi capaz de converter em ureia sem exceder e provocar toxidez (BARTLEY *et al.*, 1976).

Em estudo mais recente, Moraes *et al.* (2019) observaram que para bovinos de corte confinados que receberam EAU 200% a níveis crescentes na dieta, e com valores acima dos atribuídos anteriormente na literatura por causar intoxicação por ureia: 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 g/kg PC, não observaram sintomas em bovinos recebendo até 0,8 g/kg PC de ureia e indicam a maior inclusão como segura. A dieta foi balanceada com 14% de PB contendo silagem de milho e

concentrado de milho e farelo de soja, na relação volumoso concentrado 40:60. O aumento dietético da EAU 200% ocorreu em substituição ao farelo de soja e maior inclusão milho moído na dieta. Como não houve mudanças linear ou quadrática para CMS e PB ( $P > 0.22$ ) a maior inclusão de milho no concentrado pode explicar a redução linear ( $r^2 = 0.9$ ) de 37,3 para 27,5 mg/dL de N-NH<sub>3</sub> ruminal às 2 horas após alimentação ( $P = 0,03$ ). Os autores justificam os resultados ao maior sincronismo entre energia e proteína da dieta e a possível melhor eficiência de captura de NH<sub>3</sub> pelos microrganismos e redução da concentração.

### 2.9.2. Amido ureia extrusado e “proteção de cocho”

Além da redução do risco da toxidez é bastante mencionada a vantagem de redução da higroscopicidade da ureia quando extrusada com amido (HELMER; BARTLEY, 1971). Um argumento adicional da indústria para uso da EAU em suplementos para períodos de chuva (verão) é a “proteção de cocho” gerada pela redução da solubilidade do N da ureia contida nesse produto, que impede a intoxicação dos animais ao ingerir água presente no cocho. Os estudos de solubilidade da EAU em água nos geram bons indícios do baixo potencial do produto a esse respeito.

Esse fato é rebatido por Oliveira Júnior (2002) que realizou simulação de solubilidade do N, a nível laboratorial, utilizando EAU e ureia. Amostras foram pesadas na mesma quantidade de N e água foi adicionada em diferentes frascos ao mesmo tempo em duas repetições. As amostras para N-amoniacoal foram coletadas após dissolução total do tratamento ureia em água, ocorrida em 40 minutos após adição de água, e uma amostra do frasco com EAU também foi coletada nesse momento (T0). Uma segunda amostra foi coletada 2h após (T2). Não houve diferenças entre os produtos e tiveram quase sua totalidade na forma solúvel em água nos dois horários, ambos com 90% do N-solúvel às 0 e 2h. Kozerski *et al.* (2021a) também realizaram teste de solubilidade do N em meio aquoso. Os frascos continham EAU 200% ou mistura de milho extrusado mais ureia não reagida e foram mantidos a 39°C com coletas para análise do N-amoniacoal em horários pré-estabelecidos: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Segundo os autores houve redução na velocidade de solubilização do nitrogênio em meio aquoso da amostra EAU 200% até 30 minutos, caracterizando menor solubilização do N comparado a mistura de milho e ureia não reagida. Essas diferenças são consideradas pequena para uma proteção contra acúmulo de água no cocho. Os resultados são sutis, mas parecem indicar que a solubilidade em água da EAU é próxima à ureia comum, e sugere a inexistência de uma “proteção de cocho”.

A redução da amônia em líquido ruminal, diferente do teste de solubilidade em água, parece ser devido à captura de N para síntese de proteína microbiana, oriundo do fornecimento de energia da fermentação, que auxilia em redução do risco de toxicidade. A solubilidade do N em líquido ruminal (medida em 0 e 6h, *in vitro*) para EAU 200% foram de 60,8% enquanto a ureia mais milho sem extrusão apresentou 67,8% ( $P < 0,05$ ). O N-NH<sub>3</sub> para EAU 200% foi de 20,9 mg/dL e para a mistura milho mais ureia 37,7 mg/dL ( $P < 0,05$ ) (ÍTAVO *et al.*, 2014). Ítavo *et al.* (2012) observaram menor acúmulo de N-amoniaco, com liberação praticamente constante e máxima por volta de 5 horas de incubação no líquido ruminal para EAU 200% e 180%, e aumento da produção de gases/fermentação para EAU 200% comparada a mistura de milho e ureia ( $P < 0,05$ ). Em água a ureia se solubiliza rapidamente. No rúmen aparentemente o N-solúvel é usado pelos microrganismos, reduz acúmulo do N ruminal e assegura menor risco de perdas e toxidez.

### 2.9.3. Efeito das fontes no consumo, desempenho produtivo e digestibilidade

A ureia era preconizada em dietas de baixo custo, mas até a década de 1970 seu uso na alimentação de ruminantes foi marcadamente manchado por uso inadequado, que acarretava toxicidade e redução do consumo da dieta. Em extensa revisão, Reid (1953), pontua que ruminantes se recusam a consumir ração por causa da falta de aceitabilidade da ureia e que o melaço poderia ajudar a mascarar o sabor e odor. Uma conclusão prática importante proposta por este autor é que a ureia pode ser fornecida até 3% da concentração ou até 1% da ração total para vacas leiteiras, e que a dieta deveria fornecer nutrientes digestíveis totais pois ureia não apresenta valor energético. Em 1973 uma publicação de Satter e Roffler reforçaram essa rejeição ao afirmar que vacas leiteiras com produção de leite maior que 22,7 kg/dia não poderiam consumir ureia quando a ração tivesse mais de 12% de PB. Alguns autores rebateram essa afirmação, como Bartley *et al.* (1976) e Edwards e Bartley (1979) mas as pesquisas foram vistas com certa ressalva pois esse grupo estava envolvido com o desenvolvimento de produto composto por ureia, a *Starea*.

Uma das finalidades da EAU era contornar a redução de consumo provocada pela ureia. Stiles *et al.* (1970) não observaram aversão ao consumo do concentrado contendo EAU de sorgo 25% como ocorria na ureia comum, sugerindo a vantagem de alta aceitabilidade nas dietas. Esse fato foi reforçado em estudo *in vivo* com EAU 23% publicado por Helmer *et al.* (1970b), em que vacas leiteiras consumindo dieta com 16% de PB, 1% ureia, com feno de

brome-alfafa fixo em 1kg/100kg de PC e concentrado de contendo grãos de sorgo, milho e o farelo de soja foi totalmente substituído por ureia ou EAU nos tratamentos com NNP. O tratamento EAU 23% apresentou consumo total similar ao farelo de soja (18,5 vs. 20,1 kg/d,  $P > 0.05$ ), assim como produção de leite (17,6 vs. 18,3 1 kg/d,  $P > 0.05$ ) e variação de peso vivo (22,5 vs. 20,41 kg/d,  $P > 0.05$ ), ambos foram superiores à ureia, respectivamente 13,2 kg/d, 14,4 1 kg/d e -22,5 kg ( $P < 0,05$ ). A porcentagem de gordura do leite aumentou com ureia em +0,6% ( $P < 0,05$ ), ocasionada pela redução do consumo de concentrado para ureia, mas não se refletiu na produção diária (0,58 kg/d) e a produção de leite foi menor para esse grupo. Concentração e produção de proteína do leite foi superior para farelo de soja e EAU 23% (média 3,45% e 0,61 kg/d) comparado a ureia (3,2% e 0,45 kg/d). Concordando com Satter e Roffler (1973), Polan *et al.* (1976) publicaram um estudo demonstrando que aumentar PB da dieta com ureia reduzia a produção de leite e estava atrelada com diminuição do consumo.

Edwards e Bartley (1979) testaram se a proteína microbiana pode ser sintetizada a partir de ureia adicionada a rações que continham acima de 13% de proteína de fonte vegetal verdadeira (farelo de soja) e verificaram o potencial da EAU ser utilizada em rações acima de 13% de PB por vacas em lactação. O teste *in vitro* ocorreu durante 6 horas com rações contendo 13 a 30% de PB, aumentos oriundos da inclusão crescente de EAU. Todas as rações continham feno de brome, grão de sorgo e farelo de soja ou EAU. A EAU promoveu aumento constante da proteína microbiana sintetizada ( $P < 0,05$ ) e elevou o N-NH<sub>3</sub> ( $P < 0,05$ ). Em dois outros estudos com vacas holandesas em lactação (n = 50, produção de leite média de 22 kg/d), delineamento em quadrado latino, os autores testaram duas rações que continha 13% de PB proveniente do farelo de soja ou 16,5% de PB com 3,5% da PB vinda de EAU. Concentrado de grãos foi alimentado em 15,88 kg/vaca/d e o feno de alfafa e pradaria foi alimentado *ad libitum*. Nesses ensaios a vacas que receberam alta proteína tiveram produção de leite e proteína do leite mais elevados ( $P < 0,05$ ) evidenciado nos dois testes realizados. As vacas utilizaram de forma eficaz a EAU na dieta acima dos 13% vinda de farelo de soja, contrapontando a recomendação de Satter e Roffler (1973).

Nenhum desses estudos avaliaram o comportamento alimentar das vacas durante o dia, por isso não é determinado se o consumo é mantido por meio de modificações no jeito de consumir o alimento com NNP. Não há na literatura um nível parcial determinado de inclusão exclusivamente para produtos de liberação lenta, como a EAU, assim, é lógico que nutricionistas utilizem a mesma inclusão da ureia pois se trata de um produto com alta participação desse ingrediente. Moraes *et al.* (2019) observaram que para bovinos de corte

confinados que receberam EAU 200% a níveis crescentes na dieta, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 g/kg de PC, não observaram modificações no CMS (média de 8,8 kg/d), ou nos parâmetros de comportamento alimentar ( $P > 0.12$ ) medido como taxa de alimentação, tempo de ruminação, tempo de mastigação e número de bolo ruminais.

#### 2.9.3.1. Vacas leiteiras e amido ureia extrusado

Estudos sugerem que EAU gera respostas em consumo e desempenho similares ao farelo de soja e respostas melhores ou intermediárias em relação a ureia comum. Como já mencionado Helmer, Bartley e Deyoe (1970b) observaram redução do CMS do concentrado de grãos, perda de peso corporal e menor produção de leite para vacas consumindo ureia em substituição total ao farelo de soja ou EAU 23% no concentrado. Jones *et al.* (1975) avaliaram o efeito da fonte suplementar de N em dietas isoprotéicas com 15,9% vs. controle com 14,5% PB com apenas farelo de soja. Oito vacas holandesas foram alimentadas com dieta total contendo silagem de brome-alfafa, melação, cevada, milho moído e variaram o suplemento proteico com farelo de soja, EAU 72% ou ureia (inclusão de 1,85% no concentrado). Maior concentração de proteína na dieta influenciou em maior CMS em relação a baixa proteína ( $P < 0,05$ ), mas houve efeito da fonte suplementar. O CMS foi superior para o farelo de soja (17,2 kg/d) e intermediário na EAU (16,5 kg/d) comparado a ureia (15,7 kg/d,  $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças para digestibilidade aparente da MS, PB e FDA ( $P > 0.05$ ). A produção de leite e a eficiência alimentar foram estatisticamente iguais para os tratamentos, respectivamente 24,8 kg/d e 1,10. A proteína do leite foi superior para os tratamentos com 15,9% PB independente da fonte suplementar de N, de + 0,14 pontos percentuais para maior PB na dieta ( $P < 0,05$ ). O coeficiente de variação para gordura do leite foi de 25,6% e os autores não observaram diferença estatística para essa variável, média de 3,2% e erro padrão de 0,14. O efeito do suplemento foi menos drástico no trabalho de Jones *et al.* (1975) possivelmente pelo fornecimento na dieta total e inclusão de carboidratos do melação no concentrado, mais rapidamente degradável.

O menor consumo de proteína foi observado por Roman-Ponce *et al.* (1975) para vacas-leiteiras ( $n = 36$ ) consumindo ureia em substituição parcial ao farelo de soja e EAU 44%, 15,1% vs. 16,6% PB no alimento ingerido ( $P < 0,01$ ) quando TMR foi fornecida duas vezes ao dia. A fonte forrageira foi bagaço de cana peletizado e concentrado com milho moído, cevada e farelo de soja. A ureia e EAU 44% foi incluída em substituição parcial ao farelo de soja. No tratamento com ureia o menor consumo refletiu em menor produção de leite (13,9 vs. 14,9 kg/d,  $P < 0,01$ ),

menor rendimento de proteína no leite (0,44 vs. 0,48 kg/d,  $P < 0,01$ ) e menor peso corporal das vacas (466 vs. 477 kg,  $P < 0,05$ ). A gordura percentual foi superior para ureia em relação aos demais tratamentos, mas não refletiu em maior rendimento de gordura, similar ao evidenciado por Helmer, Bartley e Deyoe (1970b), aparentemente um efeito da redução do CMS.

Para vacas leiteiras substituição parcial da fonte de proteína verdadeira por NNP tem se mostrado mais efetiva em manter a produção de leite, devido à grande necessidade de proteína metabolizável da vaca (RANDEL *et al.*, 1975) e da exigência microrganismos do rúmen por fontes verdadeiras de proteína, em aminoácidos e peptídeos, que potencializam e estimulam o crescimento microbiano (RUSSEL, 1992).

A substituição parcial da EAU na dieta tem demonstrado consumo e desempenho leiteiro equivalentes ao farelo de soja. Randel *et al.* (1975) compararam o desempenho de vacas holandesas com substituição parcial ou completa do farelo de soja por ureia ou EAU 51,8% em dois níveis de PB da dieta: 10,1% vs. 13,4%. Os autores utilizam 4 quadrados latinos 3 x 3, e para cada nível de PB os dados foram avaliados estatisticamente dentro do quadrado, sendo um quadrado para ureia, ureia mais farelo de soja e farelo de soja e outro quadrado para EAU, EAU mais farelo de soja e farelo de soja, em dois níveis de PB. As dietas continham milho moído, que foi aumentado nas dietas com NNP, melação de cana, polpa cítrica e bagaço de cana peletizado. A inclusão da ureia foi de 1,95% e da EAU 5,1% da MS da dieta. Incrementar PB com farelo de soja promoveu aumento do CMS e da produção de leite ( $P < 0,05$ ) independente da fonte nitrogenada e da porcentagem de inclusão, sem afetar peso das vacas. Mas houve um aumento (+ 0,64 pontos percentuais) da concentração da gordura no leite para animais recebendo ureia em substituição completa ao farelo de soja, sem diferenças quanto a inclusão parcial (média de 2,42%). Na alta PB na dieta com EAU, independentemente do tipo de inclusão, apresentou tendência de aumentar a porcentagem de proteína em relação ao grupo alimentado exclusivamente com farelo de soja (2,92% vs. 2,81%,  $P < 0,10$ ). Nas dietas com baixa PB a produção de leite reduziu com a substituição completa de NNP (ureia e EAU) mas o consumo não foi afetado ( $P > 0,10$ ).

Em dietas na mistura total, Carmo *et al.* (2005) avaliaram o efeito de substituição parcial do farelo de soja por ureia ou EAU 150 % em dois experimentos com vacas leiteiras em final de lactação utilizando delineamento em blocos casualizados. No primeiro estudo vacas foram alimentadas uma vez ao dia com TMR, composta por silagem de capim, raspa de mandioca e polpa cítrica peletizada, e dietas com NNP culminaram em aumento dos dois últimos ingredientes. Dietas continham 17% de PB na primeira fase experimental, mas foi ajustada para exigência das vacas em final de lactação (15% de PB), segunda fase experimental. A inclusão

de ureia era de 2% e EAU 150% em 3,5% da MS. Os tratamentos não apresentaram diferenças para produção de leite (19,1 kg/d,  $P = 0,26$ ) e de leite corrigido para 3,5% de gordura ( $P = 0,15$ ). O peso vivo das vacas não variou ( $P = 0,81$ ). O consumo médio não foi mensurado individualmente nesse estudo, a média do lote foi respectivamente de 14,8, 16 e 15 kg/d para farelo de soja, EAU 150S e ureia. A concentração gordura foi maior para ureia (3,80% vs. 3,45%,  $P = 0,05$ ) e rendimento de gordura foi maior para ureia, menor para farelo de soja e EAU 150S intermediário (respectivamente 0,71, 0,62 e 0,67 kg/d,  $P = 0,05$ ). Divergindo dos outros trabalhos já publicados com EAU não houve diferenças para concentração ( $P = 0,26$ ) e rendimento de proteína no leite ( $P = 0,70$ ). Aparentemente todos os suplementos de N, fornecidos de forma isoprotéica, mantiveram quantidade de proteína metabolizável chegando ao intestino. Outra hipótese é um possível aumento de ureia no leite, contabilizada na PB do leite (CASPER *et al.*, 1990).

Em um segundo estudo (CARMO *et al.*, 2005), com vacas em final de lactação ( $n = 5$ ) recebendo os mesmos ingredientes do primeiro estudo, exceto para a fonte forrageira que neste foi silagem de milho. E as dietas continham 18% PB. Não houve diferenças no CMS (13 kg/d,  $P = 0,88$ ), no consumo de PB (2,34 kg/d,  $P = 0,93$ ) assim como na digestibilidade aparente da MS (69,7%,  $P = 0,52$ ) e da PB (74,6%,  $P = 0,52$ ).

O efeito da substituição do farelo de soja por níveis crescentes de EAU 150S foi avaliado por Vilela *et al.* (2007) e para EAU 200% por Kozerski *et al.* (2021b) em ambos utilizar EAU se mostrou viável para vacas em lactação. Vilela *et al.* (2007) alimentaram vacas leiteiras  $\frac{3}{4}$  holandês x zebu com suplemento contendo apenas farelo de soja (0%) ou substituindo com EAU 150S em 0, 33, 66 e 100%. Foi usado o delineamento em quadrado latino 4x4 com 15 dias por período e coleta nos últimos 6 dias. Cana de açúcar era oferecido *ad libitum* e as dietas eram isoprotéicas. O CMS foi constante (média 15,2 kg/d) e a concentração de gordura e sólidos foram similares ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos. A derivada da regressão quadrática estima que níveis acima de 35% EAU no concentrado reduziram a produção de leite, acima de 30% reduziu consumo de PB e acima de 36,7% reduziram consumo de FDN ( $P < 0,05$ ). Houve queda linear na proteína do leite ( $P < 0,05$ ) e acréscimo linear do nitrogênio ureico do leite ( $P < 0,05$ ) à medida que elevou nível de EAU 150S em substituição ao farelo no concentrado.

Kozerski *et al.* (2021b) observaram que vacas Jersey consumindo pasto de tifton e silagem de milho suplementadas com concentrado em substituição de 0, 12,5, 25, 37,5 e 50% do farelo de soja por EAU 200% no concentrado tiveram redução linear do CMS ( $P = 0,003$ ), mas aumento do consumo de tifton ( $P = 0,001$ ), tendência de melhora da digestibilidade aparente da matéria seca (DMS,  $P = 0,08$ ) e melhora na digestibilidade da matéria orgânica

(DMO,  $P = 0,02$ ), sem diferenças observadas na produção e composição do leite ( $P > 0,05$ ). No entanto observaram uma tendência de aumento quadrático para produção de leite corrigido para gordura ( $P = 0,103$ ) não discutida, aumentos significativos do NUP ( $P = 0,046$ ) e NUL. Os autores sugerem o uso prático de substituição do farelo em até 50% da PB do concentrado.

Geralmente dietas formuladas com baixo nível de energia e balanço de proteína degradável no rúmen muito positivo podem gerar redução da produção de leite e concentração de proteína do leite (JONKER *et al.*, 1999) ou a deficiência proteína degradável no rúmen, que limita crescimento microbiano e consequentemente proteína metabolizável para a vaca. A redução de consumo causada pela ureia pode promover diminuição do consumo energético, além disso a ureia é um ingrediente naturalmente pobre em contribuir com energia (KERTZ, 2010).

Proteger ureia com amido de trigo não melhorou as respostas nos animais em relação à ureia. Teller e Godeau (1984) testaram o uso da ureia em relação ao farelo de soja (dieta com maior inclusão de melaço e amido) e silagem de milho, e apesar de não observadas diferenças na digestibilidade ( $P > 0,05$ ), para a ureia houve redução ( $P < 0,05$ ) da produção de leite que refletiu em menor rendimento de gordura e de proteína do leite devido ao redução na energia metabolizável consumida (+ 6,7 mega joule por dia, MJ/d para farelo de soja vs. + 5,5% para ureia,  $P < 0,05$ ). Em outro estudo comparando ureia e EAU de trigo com 58% PB não foram observadas diferenças em nenhuma das variáveis acima exceto um aumento no rendimento de gordura no leite para EAU (+ 13,1 g/d, TELLER; GODEAU, 1986).

Em cabras leiteiras Mendes *et al.* (2010) não observaram vantagem no uso da EAU 150S em relação a ureia. Trinta e três cabras leiteiras foram organizadas em blocos casualizados e alimentadas silagem de milho (40% da dieta) e concentrado em TMR durante oito semanas. O concentrado continha caroço de algodão, farelo de soja e milho moído, este último apresentou maior inclusão nos tratamentos com NNP. A inclusão de ureia (1,5% MS da dieta) e da EAU 150S foi em substituição parcial do farelo de soja. A produção de leite tendeu (2,76 kg/d,  $P = 0,08$ ) a ser maior com farelo de soja em relação às fontes de NNP (2,5 kg/d) e para leite corrigido para 3,5% de gordura (2,97 vs. 2,75 kg/d,  $P = 0,10$ )., além disso houve tendência de queda do rendimento de lactose do leite (344 vs. 315,8 g/d,  $P = 0,07$ ). Não houve diferenças estatísticas para os demais componentes do leite na concentração ( $P = 0,33$ ) e rendimento ( $P > 0,20$ ), eficiência alimentar (média de 1,26,  $P = 0,46$ ), variação de peso vivo ( $P = 0,45$ ) e para CMS, consumo de PB e de FDN ( $P > 0,56$ ). Nesse estudo a fonte suplementar não afetou proteína e gordura do leite indicando que não houve grandes variações no padrão de fermentação ruminal.

Fornecimento de alimentos na TMR facilita a incorporação do NNP e minimiza os efeitos de seletividade mesmo para ruminantes altamente seletivos. Além disso, o aumento na concentração da gordura do leite de animais recebendo ureia pode estar associado ao maior pH ruminal e condições de bactérias celulolíticas no rúmen.

Dois trabalhos avaliaram o aumento da PB da dieta com proteína verdadeira sobre o desempenho de vacas lactantes. Ambas as dietas tiveram silagem de alfafa e de milho como fonte forrageira e o aumento da PB ocorreu com aumento do farelo de soja extraído com solvente. Colmenero e Broderick (2006a) não observaram diferenças para CMS e produção de leite ( $P > 0.25$ ) de vacas consumindo dietas com 13,5, 15, 16,5, 17,9 e 19,4% PB. Houve diferenças na concentração gordura do leite ( $P = 0,02$  para dieta) e comportamento linear de aumento (+ 0,30%,  $P < 0,01$ ). A produção de gordura tendeu a ser maior para proteína alta ( $P = 0,06$  para dieta) com aumento linear (+100 g/d,  $P < 0,01$ ). A mudança na gordura do leite foi associada ao aumento linear positivo da produção de acetato ruminal ( $P = 0,03$ ) e da relação acetato: propionato ( $P < 0,01$ ). A digestibilidade da MS e da FDN foi significativa para dieta e para efeito quadrático ( $P < 0,01$ ), o melhor nível foi de 16,5% PB na dieta. Colmenero e Broderick (2006b) compararam duas dietas, 16,6% vs. 17,6% PB, aumento com farelo de soja, e observaram tendência de aumento no CMS (25,6 vs. 26,4 kg/d,  $P = 0,09$ ) e redução do EUN ( $P < 0,01$ ), mas não observaram diferenças na digestibilidade aparente dos nutrientes ( $P > 0,31$ ) e nos parâmetros ruminais (acetato, propionato e butirato em mM,  $P = 0,28$ ), exceto um aumento da  $\text{NH}_3$  ruminal com aumento da PB ( $P = 0,04$ ).

Do ponto de vista prático da nutrição proteica, Oldham e Smith (1982) pontuam que: 1) existem requisitos mínimos de proteína para manter produção de leite corrigida para energia; 2) Vacas com acesso livre à comida geralmente elevam seu consumo com aumento da PB da dieta; 3) Níveis de PB acima de 20% podem prejudicar a produção de leite por redução do CMS; 4) A resposta em ingestão com elevação da PB são mais reduzidos em silagens com mais de 67% digestibilidade; 5) A digestibilidade da MS da dieta aumenta juntamente com elevação da PB em rações próximas a 18% PB; 6) A fonte de proteína é menos crítica em reduzir digestibilidade da dieta rica em cereais e silagem de qualidade; e por fim 7) o efeito de PB podem estar confundidos com o efeito de energia. Substratos consumidos são degradados no rúmen e apresentam padrões específicos.

#### 2.9.4. Efeito das fontes proteicas nos parâmetros ruminais

##### 2.9.4.1. Relação pH e amônia ruminal

Dietas com alto teor de carboidratos fermentáveis estimulam maior produção de AGCC e queda do pH do rúmen. No rúmen o abaixamento do pH, na presença de ácidos graxos insaturados pode tender para rota de biodegradação ruminal formando fatores inibidores (ácidos graxos de cadeia *trans*) que desestimulam a síntese de gordura no leite. Essa é uma possível explicação do maior teor de gordura no leite de vacas em alguns estudos recebendo dieta com ureia poderia ser o estímulo de aumento do pH ruminal que reflete no crescimento microbiano (GAYNOR *et al.*, 1994), porém isso também depende de outros fatores de degradação ruminal da dieta. Segundo Carmo *et al.* (2005) tanto ureia quanto farelo de soja mantiveram o pH médio (respectivamente 6,0 e 5,81) mais alto que EAU 150S (5,81,  $P = 0,03$ ) em dietas com silagem de milho, sem efeito significativo para produção de AGCC. Além disso apenas o grupo ureia manteve  $\text{pH} > 6,0$  nas primeiras quatro horas (4h) após alimentação. Em um primeiro estudo com vacas leiteiras consumindo silagem de capim como forrageira houve aumento da gordura do leite para animais recebendo ureia. Roman-Ponce *et al.* (1975) também para vacas leiteiras observaram maior pH para ureia duas horas (6,8) após alimentação comparado a farelo de soja e EAU 44% (média 6,3,  $P < 0,05$ ) mas neste houve redução do consumo de proteína e de ácidos AGCC para ureia às 2h após alimentação.

Para bovinos de corte não foram observadas diferenças no pH de rúmen para farelo de soja, ureia, EAU's: Stiles *et al.* (1970) com EAU de sorgo 25%; Thompson *et al.* (1972) com EAU de sorgo 44%; Shiehzadeh e Harbers, (1975) com EAU de sorgo 44% e 70% e Oliveira Júnior *et al.* (2004b) com EAU 150%S. Moraes *et al.* (2019) compararam pH ruminal de novilhos de corte confinados consumindo 50, 60, 70, 80 g/kg de PC de EAU 200%, não havia tratamento controle de ureia ou farelo de soja neste estudo, mas houve elevação linear do pH ruminal às 8 horas após alimentação, 5,8 para 6,4 do menor para maior nível ( $P = 0,02$ ), juntamente com uma tendência de elevação linear da  $\text{NH}_3$  ruminal, em + 5,8 mg/dL para maior nível de EAU ( $P = 0,12$ ). Às duas horas (2h) após alimentação houve redução linear da  $\text{NH}_3$  ruminal ( $P = 0,03$ ) com aumento da EAU 200%. Não houve diferenças para AGCC total ( $P > 0,33$ ). O pH do rúmen, assim como a concentração de  $\text{NH}_3$  ruminal parece ser um fator importante pois pode explicar o transporte absorvivo mais tardios de amônia para o sistema portal sanguíneo (perdas), que serão determinantes do acúmulo de NUP. Houve aumento crescente da ureia plasmática, em + 5,5 mg/dL ( $P = 0,039$  linear), média de coletas às 0, 1, 2 e 4h após alimentação nesse estudo. Todos os estudos aqui citados tiveram coleta via cânula ruminal.

#### 2.9.4.2. Efeito das fontes proteicas no padrão fermentativo, N-amônia ruminal e síntese de proteína microbiana

Inicialmente trabalhos com EAU em fluído ruminal *in vitro* foram escolhidos para determinar o potencial de aumentar síntese de proteína microbiana em relação a misturas não processadas de milho e ureia (BARR; BARTLEY; MEYER, 1974; HELMER *et al.*, 1970a) ou pelo aumento de proteína da dieta com EAU (EDWARDS; BARTLEY, 1979) pois podia-se controlar efeitos que havia em animais vivos como a reciclagem e a taxa de passagem (HELMER *et al.*, 1970a). Respostas *in vitro* eram mais sutis quando incluído milho moído nos tubos de incubação e promovia redução do acúmulo de amônia. Em ruminantes o N-amoniacal ruminal, NUP, NUL são as variáveis mencionadas na maioria dos trabalhos *in vivo*.

O N-amoniacal ruminal geralmente é obtido com animais fistulados no rúmen, que vem associado a menor número unidades experimentais, sendo importante avaliá-los com certa cautela. Na tabela 9 estão apresentados parâmetros ruminais para análise de liberação do N das fontes suplementares proteicas no rúmen. O acúmulo de N-ruminal é o resultado do somatório do N-ingerido e reciclado menos perdas por transporte via epitélio para o sangue (dependente do pH), da taxa de passagem do trato gastrointestinal e da captura do N pelos microrganismos ruminais (LAPIERRE; LOBLEY, 2001; RUSSEL *et al.*, 1992).

É importante mencionar que a N- NH<sub>3</sub> no rúmen parece ter sido similar entre ureia e EAU em quase todos os estudos da (tabela 9), independente da relação amido: ureia e do carboidrato de origem, e ambos maiores que o farelo de soja. No trabalho de Thompson *et al.* (1972), em dietas com casca de arroz e milho para dois novilhos de corte, eles observaram que ureia e EAU 45% tiveram pico de N-NH<sub>3</sub> similares após alimentação ( $P > 0.05$ ), mas ureia manteve concentração superior e declínio apenas 3h após o pico enquanto o novilho consumindo EAU teve queda acentuada de amônia após pico. O farelo de soja apresentou menor N-amônia ruminal até 6 horas após alimentação, EAU foi intermediária e maior para ureia, que se manteve alta em todos os tempos de coleta até as 10h após alimentação. A inclusão foi de 1,5% de ureia na dieta mais milho moído. Os novilhos ficaram 6h em jejum antes do fornecimento do alimento, para ureia a maior concentração de NH<sub>3</sub> promoveu alguns sintomas leves de intoxicação aos 20 minutos após início da alimentação, na primeira coleta concentração foi de 75 mg/N-NH<sub>3</sub>/dL. Algo similar foi relatado por Stiles *et al.* (1970) com ureia aos 30 minutos, mas não com EAU que elevou a concentração de NH<sub>3</sub> no rúmen, mas não do pH ruminal, conseqüentemente menos efeitos de redução do consumo e sem sintomas de toxidez.

Curva de acúmulo da NH<sub>3</sub> ruminal foi similar para farelo de soja em comparação com ureia em estudo de Teller e Godeau (1984) para vacas em lactação consumindo silagem de

milho e grãos mais suplemento de N. O pico para farelo de soja foi 120 mg/L às 2h após alimentados. No entanto, em estudo posterior de Teller e Godeau (1986) com ureia e EAU 60% de trigo apresentaram comportamento de concentrações de amônia similares ( $P > 0.05$ ), com pico 250 mg/L à 1h após alimentados, e difere dos resultados de Thompson *et al.* (1972).

Roman-Ponce *et al.* (1975) para vacas em lactação alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar, fornecida em 90% do consumo *ad libitum*, não observaram diferenças na concentração de amônia para ureia e EAU 44% às 1 e 2h após alimentação (1h: 31,6 mg/dL de N-NH<sub>3</sub> e 2h: 21,95 mg/dL às 2h), ambas superiores ao farelo de soja (1h: 21,3 mg/dL,  $P < 0,05$ , e 2h: 12,8 mg/dL,  $P < 0,01$ ). Às 2h o pH do rúmen das vacas consumindo ureia foi superior (+ 0,5) em relação a EAU e farelo de soja. Os autores observaram aumento da proporção de acetato e redução do propionato que refletiu em redução da produção total de AGCC ( $P < 0.05$ ) e maior relação acetato: propionato para ureia ( $P < 0,01$ ). Nesse caso a eficiência de fermentação e digestibilidade ruminal pode ter sido afetada negativamente pela ureia, reforçada pela queda acentuada do leite (-1,3 kg/d) e menor peso vivo das vacas (-10,3 kg).

O padrão de comportamento do N- NH<sub>3</sub> no rúmen ao longo do dia foi estudado por Schmidt *et al.* (1973) e Carmo *et al.* (2005). No estudo de Schmidt *et al.* (1973) o farelo de soja induziu a menor N-NH<sub>3</sub> ao longo do dia. A ureia e EAU tiveram comportamentos similares no tempo até o pico ( $\pm 2h$ ) mas diferenças significativas após 3h, e após esse tempo houve queda acentuada de N-NH<sub>3</sub> ruminal para ureia, possivelmente perdida para sistema portal, enquanto EAU decaiu, mas se manteve persistente a um nível mais alto que a ureia (3 a 8h30min) podendo ser um indicador de menor liberação de N no rúmen por esse produto. Carmo *et al.* (2005) observaram pico maior e mais persistente para A150S, das 3 até aproximadamente 9h após alimentação, enquanto ureia parece ter sido mais constante ao longo do tempo, com pico menor as 2h e um maior às 9h após alimentação. Em média a concentração de amônia no dia foi similar para ureia e EAU 150S ( $P > 0.05$ ) e maiores que o farelo de soja. Variações de NH<sub>3</sub> ruminal estão associadas com a ingestão e seleção das dietas ao longo do dia, não mensuradas nesse estudo. Oliveira Junior *et al.* (2004a) observaram concentração média de NH<sub>3</sub> ruminal menor para farelo de soja em dieta com alto concentrado e PDR deficiente, intermediária para EAU 150S e maior para ureia, ambos com PDR suprida para novilhos, respectivamente 14,7 vs. 17,2 e 21,1 mg/dL ( $P < 0,10$ ), a curva de NH<sub>3</sub> ruminal refletiu bem os valores médios e pode ser vista na tabela 8.

Tabela 8 - Comportamento diurno do Nitrogênio amoniacal no rúmen (N-NH<sub>3</sub>) de novilhos suplementados com diferentes fontes de proteína.

hora	Farelo de soja	Ureia	EAU 150S
0	15,0 <sup>a</sup>	15,8 <sup>b</sup>	11,3 <sup>b</sup>
2	17,9 <sup>Ba</sup>	28,6 <sup>Aa</sup>	23,4 <sup>ABa</sup>
4	12,9 <sup>Ba</sup>	22,6 <sup>Aab</sup>	20,1 <sup>ABab</sup>
6	11,8 <sup>ABa</sup>	22,1 <sup>Aab</sup>	17,3 <sup>ABab</sup>
8	13,9 <sup>ABa</sup>	21,0 <sup>Aab</sup>	12,3 <sup>Bb</sup>
10	16,6 <sup>a</sup>	16,8 <sup>b</sup>	18,7 <sup>ab</sup>
Média	14,7 <sup>A</sup>	21,1 <sup>B</sup>	17,2 <sup>AB</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas colunas referem-se às médias que diferem entre si pelo teste *Tukey* ( $P < 0,05$ ); <sup>AB</sup> Letras maiúsculas diferentes nas linhas referem-se às médias que diferem entre si pelo teste *Tukey* ( $P < 0,10$ ). Adaptado de Oliveira Junior *et al.* (2004a)

Shiehzadeh e Harbers (1974) alimentaram cordeiros com dieta de alta forragem (60% MS da dieta com feno de pradaria) e grãos sorgo mais suplementos de N. Ureia foi fornecida com incremento de grão moído. Cordeiros recebendo EAU de sorgo extrusada (EAU 44% e EAU 70%) apresentaram menor concentração de N-amoniaco após 1h de alimentação, às 2h EAU 44% apresentou o menor teor ( $P < 0,05$ ) e as três fontes se assemelharam as 4h pós alimentação. As diferenças na concentração de AGV ( $\mu\text{mol/L}$ ) foram sutis nesse estudo, EAU 70 teve menor acetato ruminal que EU 44% ( $P < 0,05$ ), mas foi similar a ureia mais grão moído. Isso indica que energia fermentável prontamente disponível nos suplementos não causou diferenças na fermentação ruminal.

Os diversos estudos com EAU de diversos tipos indicam que o acúmulo de NH<sub>3</sub> é afetado pela fonte de N, mas AGCC não parece ser fortemente influenciado em diversos trabalhos citados na tabela 9, em que houve pequenas diferenças ou nenhuma para padrão fermentativo. Dois trabalhos da década de 2000, com EAU's de alta equivalência proteica, foram publicados por Carmo *et al.* (2005) e Oliveira Júnior *et al.* (2004a) com diferenças de padrão fermentativo. Ambos incluíram ureia em 2% e 2,46% da dieta (inclusão relativamente alta, >1%). Nesses estudos os autores observaram efeito ( $P < 0,05$ ) divergentes para porcentagem de acetato. Carmo *et al.* (2005) com vacas leiteiras consumindo dieta com silagem de milho e raspa de mandioca (maior inclusão para os NNP's) observaram redução proporcional do acetato, aumento do propionato e redução na relação acetato: propionato de ambos os produtos com ureia em relação ao farelo de soja. Oliveira Júnior *et al.* (2004b) em estudo com novilhos consumindo bagaço de cana (20,5% MS dieta) e polpa cítrica, observaram aumento do acetato para tratamento com ureia e A150S, mas neste a PDR estava abaixo da exigência do rúmen no tratamento farelo de soja. Em ambos foram associados à possível melhora da

digestibilidade. No geral os resultados parecem estar associados ao ingrediente incluído pela substituição do farelo, à forragem e a formulação das dietas.

A ureia é fonte de N-  $\text{NH}_3$  para o rúmen, enquanto proteína verdadeira contribui com aminoácidos que podem ser quebrados para biossíntese de proteína microbiana (peptídeos, aminoácidos e  $\text{NH}_3$ ). No caso de fontes de proteína verdadeira com alta degradação ruminal, como o farelo de soja, há maior fornecimento de aminoácidos ramificados, esses são metabolizados pelos microrganismos na síntese de sua própria proteína microbiana e a cadeia carbônica gera energia no ciclo fermentativo, aumentando a síntese de AGCCR. Colmenero e Broderick (2006a) aumentando proteína da dieta com farelo de soja (13,5% para 19,4% PB) observaram aumento linear do isobutirato, isovalerato e tendência de aumento do valerato ruminais, sem diferenças no CMS e produção de leite. Mas não observaram nenhuma diferença em estudo posterior similar dieta 16,6% vs. 17,6% PB. Oliveira Júnior *et al.* (2004b) observaram menor quantidade de AGCC's de cadeia ramificada (isovalerato e isobutirato,  $P < 0,05$ ) para animais recebendo ureia e A150S, mas foram maiores para farelo de soja. Stiles *et al.* (1970) observaram maior isobutirato e isovalerato em vacas consumindo EAU 25% ( $P < 0,05$ ) em comparação com uma mistura não processada de grãos mais ureia não processada.

De doze trabalhos *in vivo* para ruminantes alimentados com EAU, citados nesse tópico e organizados na tabela 9, apenas quatro relataram síntese e fluxo microbiano (TELLER; GODEAU, 1986; 1985; 1984; STILES *et al.*, 1970) ou identificaram da fração microbiana (EZEQUIEL *et al.*, 2002). Stiles *et al.* (1970) observaram aumento do N-bacteriano e N-protozoário ruminais para novilhos consumindo EAU 25% mais feno de alfafa comparado a uma mistura equivalente de ureia e milho não processados mais feno de alfafa. Além disso, o EAU não parece influenciar em aumento do fluxo microbiano duodenal *in vivo* comparada a ureia, ou seja, não aumenta o aporte de aminoácidos de origem microbiana intestinal para absorção (TELLER; GODEAU, 1986; 1985; 1984).

Duas vacas secas fistuladas no duodeno e consumindo silagem de milho (6 kg MS) foram suplementadas com 35, 55, 100 ou 145 g de ureia e quantidades de N similares de farelo de soja por Teller e Godeau (1984) e em outro experimento consumiram 35, 55, 100 ou 145 g de ureia comparada a 25, 25, 60 ou 70 g de EAU 60% (trigo) por Teller e Godeau (1986) e coletadas amostras duodenais por 72h. O aumento do N-ingerido, independente da fonte (ureia, EAU ou farelo de soja), não apresentou efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) para digesta total, pH duodenal da digesta e MS duodenal. As três fontes tiveram baixa concentração de N-amônia duodenal, aparentemente similares. O N-total duodenal regredido em relação a inclusão de N-dietético pode ser compreendido em dois estágios: um de aumento (até um pico) e um de

constância, até 85 g/d farelo de soja e ureia foram similares aumentando o N-duodenal, o ponto máximo o farelo de soja foi 92 g/d, a partir desse nível não houve aumento do fluxo duodenal de N. Para EAU 60% o N-total no duodeno apresentou linhas sobrepostas a ureia, e sugere que a associação entre carboidratos de maior fermentabilidade da EAU não induziu a melhora do fluxo de N para intestino. Esse fato também é descrito por Teller e Godeau (1986) em que o N-dietético fornecido acima de 85 g/d, tiveram resultados em fluxo de N similares independentemente da fonte de N ( $r^2 = 0.97$ ), acima disso as fontes expressaram seu comportamento diferencial, em que na média o N-duodenal foi maior para farelo de soja ( $P < 0,05$ ) e similares para ureia e EAU, assim como maior N-bacteriano para farelo de soja em relação a ureia, e tendência para EAU de ser intermediária.

Um estudo descritivo de uma técnica para identificação de microrganismos foi publicado por Ezequiel *et al.* (2002b) com novilhos jovens canulados consumindo silagem de milho e EAU 38%. Os autores mensuraram bactérias aderidas a partículas sólidas (BSA), bactérias associadas à parte líquida (BLA), protozoário associados à parte sólida (PSA) e associaram com pH ruminal nos horários 1h, 2h30min e 11h30min após alimentação. Com o tempo houve aumento de BSA que refletiu em aumento total de microrganismos após alimentação.

O manejo alimentar influencia na eficiência de uso da ureia. Aumentar a frequência e/ou incorporar a ureia na forragem melhoram a aceitabilidade e reduz efeitos tóxicos do ingrediente em comparação ao fornecimento uma ou duas vezes ao dia (HOLTER; BYRNE; SCHWAB, 1982; COPPOCK; PEPLOWSKI; LAKE, 1976). Coppock, Peplowski e Lake (1976) compararam a variação diurna de N-amônia ruminal em vacas alimentadas com ureia ou EAU 64%, duas vezes ao dia no concentrado, simulando alimentação no momento da ordenha, ou misturada na ração completa com silagem de milho. Foram avaliadas vacas fistuladas no rúmen ( $n = 6$ ) em delineamento 3 x 3 e amostras do líquido foram coletadas a cada 30 minutos nas primeiras 2h após alimentação e posteriormente em intervalos de 2h durante 24h. O concentrado continha 2% ureia e o mesmo equivalente proteico para EAU 64%. A TMR manteve a N-amônia ruminal mais constante durante o dia e apresentou menor oscilação do pH ( $P < 0,05$ ) devido a possíveis mudanças na taxa de alimentação, mais divididas ao longo do dia e tornando os substratos ao rúmen mais estáveis. A EAU 64%, sendo um produto de liberação lenta, fornecê-la pontualmente duas vezes ao dia não forneceu nenhuma vantagem em relação à ureia na TMR, ambas picaram juntas após alimentação, mas foi melhor que ureia no concentrado na mesma condição de manejo.

No geral, ureia ou ureia de liberação lenta não tem promovido mudança na quantidade de AGCC produzida e na amônia ruminal média, possivelmente porque não afeta diretamente a eficiência da fermentação ruminal. No entanto os trabalhos mostram uma mudança no comportamento de liberação inicial da EAU em relação à ureia comum e muda o horário em que essa amônia é disponibilizada ao rúmen. Essa mudança da liberação do N pode modificar a proporção de algumas bactérias ruminais e alterar de alguma forma a produção individual dos AGCC's e da relação acetato: propionato (A: P), mesmo que a produção total não seja afetada (CHERDTONG *et al.*, 2010). Por exemplo, redução da relação A:P, em um momento do dia, pode promover alguma mudança no teor de gordura do leite e vice-versa, caso haja aumento de A: P, ocasionada pela melhora da disponibilidade N para as bactérias celulolíticas. Além disso possíveis mudanças no butirato podem estar associadas a interconversão entre as vias de produção do acetato e butirato no rúmen.

Tabela 9 - Valores de N-amônia e AGV's ruminais para farelo de soja, ureia e EAU em diferentes relações amido ureia.

Referência	Fonte do N	Detalhes da coleta <sup>1</sup>	N-NH <sub>3</sub> mg/dL	AGV Total mEq/L	C2%	C3%	C4%	C2/C3	Outras observações
Stiles <i>et al.</i> (1970) <sup>y</sup>	Farelo de soja	1, 2, 3, 4, 6 e			-				F: feno de alfafa (6 kg/d: 21% PB); concentrado de grãos (6 kg/d 28% PB) incluiu milho moído para ureia.
	Ureia (~2%)	8h aa (cânula ruminal)	32,9	96	75	15c	6,2d	5,0	
	EAU25% (sorgo)		27,6	108	76	13d	8,2c	5,8	
Thompson <i>et al.</i> (1972) <sup>y</sup>	Farelo de soja	EXP1: 6h após jejum (AGV) EXP2: 15h jejum + acesso a ração por 1h. Coleta as 3h aa (Amônia)	19 <sup>b</sup>		44,0	35,2	13,7	1,25	Dieta EXP 1 e 2 (=): 75% milho descascado moído e 10% casca de arroz. Ureia teve plus de milho moído (+9% MS dieta). Ganho de peso vivo e conversão alimentar (=) EXP2: animais que consumiram ureia tiveram sintomas toxidez (refletiu em amônia alta no rúmen até 8h aa)
	Ureia (1,5%)		55 <sup>a</sup>	-	45,5	31,2	15,1	1,46	
	EAU45%		46 <sup>a</sup>		43,5	32,0	16,5	1,36	
Schmidt <i>et al.</i> (1973) <sup>y</sup>	Farelo de soja	2,5h aa	3,0			-			Dieta restrita 90% CMS. Espiga de milho moída (2.5%MS dieta) e milho quebrado (90.5%). Média 11% PB. Farelo de soja: ganhou peso vivo (+)
	Ureia (0.9%)	(cânula ruminal)	37,5			-			
	EAU50%		20,0			-			
Shiezadeh e Harbers (1974) <sup>y'</sup>	Farelo de soja	EXP1: 1, 2, 4 e				-			F: (alta forragem) feno de pradaria (60% MS da dieta) e grãos sorgo (22,8%MS dieta). Ganho médio diário (=) e conversão alimentar (=)
	Ureia	6h aa (cânula ruminal)	10,95		47 <sup>c</sup>	17	8	2,76	
	EAU44%(sorgo)		12,65	-	49 <sup>d</sup>	18	11	2,72	
	EAU70% (sorgo)	AGV: $\mu$ mol/L	12,30		43 <sup>c</sup>	18	10	2,53	

Continua...

Shiezadeh e Harbers (1974) <sup>y</sup>	Farelo de soja	EXP2: 2h aa	22,0		61a	21	15a	2,9	F: (alta forragem) feno de pradaria (60% MS da dieta) e grãos sorgo (22,8%MS dieta). Ganho médio diário (=) e conversão alimentar (=) OBS: usado os dados de alta gelatinização da EAU
	Ureia	(cânula ruminal)	-			-			
	EAU44% (sorgo)	1, 2, 4 e 6h para AGV: $\mu\text{mol/L}$	29,0	-	50b	20	11c	2,5	
	EAU44% (batata)		30,0		63a	22	19b	2,86	
Roman-Ponce <i>et al.</i> (1975) <sup>x</sup>	Farelo de soja	2h aa manhã	12,8 <sup>b</sup>	87,9 <sup>a</sup>	60,7 <sup>d</sup>	26,1 <sup>d</sup>	13,2	2,4 <sup>c</sup>	Dieta: 12,5% PB, F: Bagaço de cana; variou milho moído. Ureia: CMS (-), PL (-) e G% (+)
	Ureia (1,7%)	(cânula ruminal)	21,3 <sup>a</sup>	74,8 <sup>b</sup>	64,7 <sup>c</sup>	20,9 <sup>c</sup>	14,4	3,1 <sup>d</sup>	
	A44		22,6 <sup>a</sup>	99,9 <sup>a</sup>	60,8 <sup>d</sup>	24,7 <sup>d</sup>	14,4	2,6 <sup>c</sup>	
Randel <i>et al.</i> (1975) <sup>x</sup>	Farelo de soja	2-3h aa do	9,9 <sup>b</sup>	105	63	16	23	3,9	Dieta: 12,2% PB, F: Bagaço de cana peletizado; variou milho moído. CMS (=), PL (=) e G% e P% (=)
	Ureia (0,95%)	meio-dia	33,2 <sup>a</sup>	106	62	21	17	3,0	
	A52	(sucção esofágica)	30,8 <sup>a</sup>	101	58	18	24	3,2	
Lemenager <i>et al.</i> (1978) <sup>x</sup>	Farelo de soja		6,3 <sup>ab</sup>	35,1	72,5 <sup>ab</sup>	20,1 <sup>bc</sup>	7,4 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	Vacas de corte. F: Pasto de baixa qualidade (grama de inverno). Farelo de soja contribuiu com 30% da dieta. Houve substituição de 50% do farelo de soja por EAU. Fatorial fonte de N e monensina (Mon = 0 ou 200g/vaca/d)
	Farelo de soja+ Mon	~4h ( $\pm 30$ min)	8,1 <sup>bc</sup>	49,6	70,0 <sup>bc</sup>	23,9 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>ab</sup>	2,9 <sup>2b</sup>	
	Ureia	aa (Sucção esofágica)				-			
	EAU44%		11,2 <sup>a</sup>	46,1	72,2 <sup>a</sup>	18,5 <sup>c</sup>	6,3 <sup>ab</sup>	3,9 <sup>0a</sup>	
	EAU44% + Mon		8,0 <sup>ab</sup>	43,8	66,2 <sup>c</sup>	28,4 <sup>a</sup>	5,4 <sup>b</sup>	2,3 <sup>3b</sup>	
Teller e Godeau (1984) <sup>x</sup>	Farelo de soja		10,5			-			F: Silagem de milho. Ureia (0,138 Kg/d) e farelo de soja (0,950 kg/d)
	Ureia	1h aa (cânula ruminal)	24,9			-			
	EAU					-			
Teller e Godeau (1986) <sup>x</sup>	Farelo de soja					-			F: Silagem de milho. Ureia (0,150 kg/d) e A58 (0,77 g/d)
	Ureia	1h aa (cânula ruminal)	25,0			-			
	A60 (trigo)		24,5			-			

Continua...

Carmo <i>et al.</i> (2005) <sup>x</sup>	Farelo de soja	Média coletas representativa do dia. AGV = mM	7,60 <sup>b</sup>	172,8	60,5 <sup>a</sup>	22,63 <sup>b</sup>	13,05	2,67 <sup>a</sup>	Dieta F: silagem de milho (45% MS dieta). EAU foi incluída em substituição ao farelo de soja e aumentando raspa de mandioca (+8,6% para NNP).
	Ureia (2%)		10,88 <sup>a</sup>	155,7	58,71 <sup>b</sup>	24,33 <sup>a</sup>	13,35	2,44 <sup>b</sup>	
	A150S (milho)		10,70 <sup>a</sup>	151,9	59,83 <sup>ab</sup>	24,26 <sup>a</sup>	12,89	2,50 <sup>b</sup>	
Oliveira Junior <i>et al.</i> (2004) <sup>y</sup>	Farelo de soja	N-NH <sub>3</sub> : média (0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10h) AGV: Média coletas representativa do dia (mM)	14,7 <sup>b</sup>	111,2	66,9 <sup>a</sup>	17,3	12,0	4,0	Dieta F: bagaço de cana (20% MS dieta). EAU foi incluída em substituição total ao farelo de soja e aumentando polpa cítrica (+8% para NNP). Dieta PDR negativa para farelo de soja = CMS e ganho médio diário (-). NNP: AGV cadeia ramificada e isobutirato (-).
	Ureia (2,46%)		21,1 <sup>a</sup>	115,0	70,5 <sup>b</sup>	17,7	10,3	4,0	
	EAU150S (milho)		17,2 <sup>ab</sup>	105,7	70,6 <sup>b</sup>	16,6	11,2	4,3	
Moraes <i>et al.</i> (2019) <sup>y</sup>	Farelo de soja	2h após alimentação (cânula ruminal). AGV mmol/L	-	-	-	-	-	-	Dieta F: silagem de milho (40% MS dieta). EAU foi incluída em substituição ao farelo de soja e aumentando milho moído. EAU de milho. *Efeito linear ( $P < 0,01$ ) para N-NH <sub>3</sub>
	Ureia		-	-	-	-	-	-	
	EAU200S (19,5%)		37,3*	107,7	68,4	19,6	16,3	4,20	
	EAU200S (23,4%)		35,1*	94,8	60,6	17,6	13,7	3,44	
EAU200S (27,3%)	28,2*	96,4	66,0	17,6	10,2	3,75			
EAU200S (31,2%)	27,5*	88,7	57,1	17,1	11,8	3,33			

Letras diferentes dentro do mesmo estudo diferem estatisticamente entre si a <sup>abc</sup>  $P < 0,01$  e <sup>cde</sup>  $P < 0,05$ . Ruminantes: <sup>y</sup> Novilhos de corte <sup>x</sup> Vacas leiteiras <sup>y</sup> Cordeiros. <sup>1</sup>Os horários referem-se a coletas após alimentação.

### 2.9.5. Efeito das fontes proteicas nos parâmetros sanguíneos e N-ureico no leite

Após consumo de alimento há um pico de liberação de  $\text{NH}_3$  no rúmen e posteriormente um pico de NUP. Usando essas variáveis resposta Schmidt *et al.* (1973) coletaram amostras de rúmen e de sangue nos mesmos horários (às 0h, 1h30min, 2h, 2h30min, 3, 3h30min, 5h30min, 8h30min e 12h após alimentação em busca de associações e diferenças no comportamento de liberação da EAU 50%, ureia e farelo de soja. Esse estudo teve consumo restrito em 90% em relação ao *ad libitum*. A  $\text{NH}_3$  ruminal teve pico 1h após alimentação e pico de NUP às 2h 30min. Eles observaram que ureia e EAU 50% tiveram comportamento similar até as 1h30min com elevação da amônia ruminal, mas ureia apresentou pico superior à EAU 50% (2h: ~240 vs. 200 mg/mL) e após houve pico de NUP sanguíneo, mas com perdas mais expressivas de N-  $\text{NH}_3$  ruminal no tratamento ureia, que às 2h30min: ureia teve 380 vs. 315 mg/ml em EAU50% ( $P < 0,05$ ). A queda foi menos acentuada de N- $\text{NH}_3$  ruminal às 3h para EAU 50% (3h: ureia 50 vs. EAU 50%, 90 mg/ml) que se manteve mais alta e constante até 8h após alimentação e apresentou menor NUP, o que sugere mais tempo disponível para captura do N e síntese de proteína microbiana no rúmen, e NUP menos expressivo. A EAU 50% e ureia foram estatisticamente iguais para NUP às 0h e às 12h de coleta ( $P > 0,05$ ). O tratamento farelo de soja foi inferior para NUP em todos os horários coletados.

No estudo de Oliveira Junior (2002) podemos explorar indícios da curva de NUP. Nesse trabalho foi observado que o farelo de soja teve maior NUP, reflexo da deficiência em PDR que ocasionou menor CMS e piorou o uso da proteína dietética, mesmo essa sendo considerada de boa qualidade. A ureia e EAU 150% foram similares até as 10h após alimentação, assim como o CMS e desempenho produtivo, indicando que PDR suprida com NNP (ureia ou EAU 150%) demonstrou similaridade na curva de NUP, mas a fonte de liberação lenta parece ter sido mais constante até 6h após alimentação dos bovinos. Em média não houve diferença para as fontes de N (19 mg/dL,  $P > 0,05$ ) (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004a). Shieh-zadeh e Harbers (1974) também não observaram diferenças no NUP para borregos consumindo EAU 44%, EAU 70% e ureia, a média de coletas realizadas às 1, 2, 4 e 6h após alimentação foi de 11,97 mg/dL ( $P > 0,05$ ).

No primeiro estudo de Carmo (2002) publicado em Carmo *et al.* (2005), delineado em blocos casualizados, houve a necessidade de ajustar a dieta para as vacas em final de lactação dividindo o mesmo experimento em duas fases distintas. A fase 1 consistiu nas

quatro primeiras semanas, dieta com PB 17% e FDN 28% MS, e fase 2 compreendendo as quatro últimas semanas com dieta 15% PB e 33% de FDN, ambas com mesma inclusão de ureia (2% MS) e EAU 150S (3,58% MS) substituindo metade do farelo de soja e complementando com silagem de capim como fonte forrageira. Na primeira fase, a autora não observou diferenças entre as fontes de N para nenhum dos horários de coleta ( $P > 0.05$ ). Na segunda fase, com redução da PB (- 2%) e aumento da inclusão forrageira na dieta (+ 7%) acarretou significância às 0h e 2h após alimentação das vacas: EAU apresentou maior NUP até as 2h, após esse tempo ureia se igualou a EAU 150S e farelo de soja foi inferior em todos os horários. A média da EAU 150S foi superior para NUP na fase 2 (20,88 mg/dL,  $P < 0,05$ ) em relação à farelo de soja e ureia (média 14,4 mg/dL) em dietas com alta PB.

No segundo experimento, dietas com 18% PB e 23% FDN, Carmo, (2002) publicado em Carmo *et al.* (2005), observaram que EAU 150S foi superior às 2h para NUP, intermediário para farelo de soja e menor concentração para ureia ( $P < 0,05$ ), gerando curva mais alta e pico expressivo para EAU 150S quando as vacas foram alimentadas com silagem de milho, polpa cítrica, sebo e farelo de soja em substituição parcial do NNP (em 50%) e preenchendo a dieta com maior quantidade de raspa de mandioca, isso sugere que as fontes liberam de forma diferente no rúmen. Em média as fontes de N tiveram NUP similares nesse estudo ( $P > 0.05$ , 14,2 para farelo de soja, 14,8 para EAU 150S e 11,9 mg/dL para ureia).

Um estudo de Mendes *et al.* (2010) com cabras leiteiras consumindo dieta 16,7% PB em substituição parcial do farelo de soja por ureia ou EAU 150S, observaram NUP similar entre os dois NNP's às 3h após alimentação ( $P < 0,03$ ) e ambos foram superiores ao farelo de soja na quarta semana experimental. Na oitava semana houve tendência de maior NUP para ureia e EAU 150S ( $P < 0,07$ ). Isso pode sugerir que EAU não teve taxa de liberação lenta no rúmen ou que esse efeito foi mascarado por outros fatores desconhecidos. Apenas um horário de coleta de NUP pode nos dar indícios da dinâmica inicial de liberação no rúmen, porém não traduz o mecanismo total de efeito do ingrediente no organismo animal. As cabras consumiram silagem de milho em 40% de inclusão na TMR. Ezequiel *et al.* (2001) sugere que usar forrageira de qualidade, como a silagem de milho, poderia mascarar os efeitos da EAU.

Jones *et al.*, (1975) substituíram todo o farelo de soja por ureia (1,85% MS dieta) ou EAU 72% para vacas leiteiras, dieta 15,5% PB, e observaram maior NUP para farelo

de soja vs. ureia e EAU 72% aos 30-40 minutos após alimentação (15,9 vs. média 13,65 mg/dL,  $P < 0,05$ ), ureia e EAU 52% foram similares. O que justifica esse achado é o maior CMS para farelo de soja (17,2 kg/d), menor para ureia (15,7 kg/d) e intermediário para QUE (16,5 kg/d,  $P < 0,05$ ).

Experimentos de Moraes *et al.* (2019) com bovinos de corte e Kozerski *et al.* (2021b) com vacas em lactação em substituição parcial crescente de farelo de soja por EAU 200% no concentrado e dietas isonitrogenadas, observaram aumento linear do NUP após alimentação com  $r^2 = 0,83$  e  $r^2 = 0,89$  respectivamente para Moraes *et al.* (2019) e Kozerski *et al.* (2021b). Kozerski *et al.* (2021b) observaram aumento linear significativo do NUL ( $P = 0,046$ , 12,0 para 15,96 mg/dL) e aumento no NUP ( $P = 0,001$ , 14,62 para 21,55 mg/dL).

A glicose plasmática não apresentou efeito relativo à fonte suplementar de N em nenhum dos experimentos ( $P > 0,05$ ) e o corpo mantém de maneira constante a homeostase desse metabólito (KOZERSKI *et al.*, 2021b; MORAES *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2010; CARMO *et al.*, 2005; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004). Também não houve diferenças para os indicadores de saúde do fígado: enzima alanina aminotransferase (ALT), enzima aspartato aminotransferase (AST) e proteína total, ou no indicador renal: creatinina plasmática (KOZERSKI *et al.*, 2021b; MORAES *et al.*, 2019) assim como não houve diferenças entre as fontes suplementares de N para os triglicerídeos (KOZERSKI *et al.*, 2021b; MORAES *et al.*, 2019) e ácidos graxos não esterificados (MENDES *et al.*, 2010).

### 2.9.6. Efeito das fontes proteicas no Balanço de nitrogênio

Os trabalhos avaliando EAU são inconsistentes e inconclusivos sobre os efeitos do produto no balanço de N comparado a ureia e proteína verdadeira, além disso os estudos publicados com EAU que relatam dados de balanço do N para vacas em lactação são escassos.

Em relação ao N-fecal (% do N-ingerido) nenhuma diferença significativa tem sido observada entre as fontes de N (MORAES *et al.*, 2019; TELLER; GODEAU, 1984; HARBERS; SHIEHZADEH, 1975; SHIEHZADEH; HARBERS, 1974; SALMAN *et al.*, 1997; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004).

O N-leite é um indicador de eficiência do uso do N-dieta (EUN, %), mas esse parâmetro deve ser analisado com cautela pois o valor total representa o N nas formas de proteína verdadeira do leite, compreendendo caseínas e proteínas do soro, mas também da ureia e fontes não proteicas, além disso dietas com alta PB podem reduzir a relação de proteína verdadeira pelo aumento ureia do leite (BAKER; FERGUSON; CHALUPA, 1995). Teller e Godeau (1984), para vacas lactantes consumindo silagem de milho, observaram N-leite total superior para farelo de soja em comparação com ureia (29,7% vs. 27,4%,  $P < 0,05$ ) e em experimento posterior Teller Godeau (1986) ureia e EAU 60% (trigo) foram similares (média 30,2% de EUN).

Por outro lado, a EUN parece estar mais associada ao teor de PB e PDR da dieta do que da fonte de N propriamente dita, apesar desses fatores terem alguma relação entre si. Brito e Broderick (2007), com vacas em lactação variaram fontes de N na dieta (isoproteicas, 16% PB) com ureia (1,9% MS), farelo de soja, farelo de algodão ou farelo de canola. Os autores observaram piora do EUN com ureia (24,9% vs. 30,4% para farelo de soja,  $P < 0,01$ ) e intermediário para farelo de canola e de algodão (média em 29,4%), no entanto a dieta com ureia teve PDR estimada pelo NRC em +2% em relação às fontes verdadeiras. Broderick e Reynal (2009), para vacas com produção de leite acima de 36 L/d, não observaram diferenças na EUN (média de 32,5%) quando a PDR do farelo de soja foi substituída por ureia nas proporções de 1,2%, 2,4% e 3,7% da MS em dieta com 16% PB. Boucher *et al.* (2007) observaram que ao suprir PDR com ureia em 0,0, 0,3, 0,6 e 0,9% MS, com aumento respectivo de PB da dieta em 14,9%, 15,7, 16,7 e 17,3%, observaram redução linear da EUN ( $P < 0,05$ , 32% para 25%).

Em relação a retenção do N para vacas em lactação, Jones *et al.* (1975) não encontraram diferenças entre farelo de soja, ureia e EAU 72% ( $P > 0,05$ ), assim como Teller e Godeau (1984) entre farelo de soja e ureia, e nem para ureia e EAU 60% por

Teller e Godeau (1986). A retenção do N entre as fontes suplementares é reportada em borregos (HARBERS; SHIEHZADEH, 1975; SHIEHZADEH; HARBERS, 1974; SALMAN *et al.*, 1997) e para bovino de corte (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2004a). Em um primeiro experimento com borregos de corte ( $n = 25$ ) alimentados com alta inclusão de feno de pradaria, Shiehzadeh e Harbers, (1974) não observaram diferenças na retenção de N entre farelo de soja e QUE's 44% de sorgo e batata, em média 14,18% do ingerido ( $P > 0.05$ ), em segundo experimento borregos consumindo EAU de sorgo 44% e 70% retiveram mais N do que ureia ( $P < 0,05$ ) de 1,19% e 1,06 % do ingerido vs. 2,5% para ureia.

Harbers e Shiehzadeh, (1975) observaram diferença ( $P < 0,05$ ) na retenção em gramas para EAU 44% de sorgo e milho com alta gelatinização (6,1 g/d) em relação ao farelo de soja (4,14 g/d), respectivamente 14,4% para farelo de soja, 17,2% para EAU de milho e 19,9% para EAU de trigo. A retenção do N foi similar entre EAU 44% de sorgo e farelo de soja (5,23 vs. 4,14 g/d,  $P > 0.05$ ). Em experimento posterior, comparando ureia com produtos em diferentes relações amido:ureia (44, 56, 70, 84% PB), os autores observaram maior retenção de N para borregos ( $n = 20$ ) consumindo EAU 84 de sorgo em relação à ureia 6,72 g/d (14,7%) vs. 5,07 g/d (23,8%) ocasionada por redução N-urinário nesse tratamento. Salman *et al.* (1997) não observaram diferenças na retenção do N com farelo de algodão, ureia e EAU 150S. Oliveira Junior *et al.* (2004a) observaram maior retenção de N para bovinos quando ureia supriu a PDR da dieta em relação à EAU 150S (52% vs. 33,7%,  $P < 0,05$ ) em dieta com bagaço de cana e alto concentrado. A EAU 150S suprimindo PDR da dieta e farelo de soja deficiente em PDR foram similares na retenção do N.

O N não convertido em produto, retido no leite ou músculo, é metabolizado nos rins e excretado via urina. O N-urinário é composto principalmente por ureia (muito variável), mas também compreende a outros compostos que possuem N em sua constituição como creatinina, ácido úrico, ácido hipúrico e alantoína (MULLER *et al.*, 2020). Os rins geralmente têm alta taxa de depuração da ureia, mas reabsorvem em média 50% do filtrado (EATON; POOLER, 2016; AIRES, 2012) assim nem tudo que é filtrado pelo glomérulo é eliminado na urina. O N-urinário é a principal fonte de excreção dos excessos de N e por isso o mais importante a ser avaliado no balanço de N juntamente com o N-retido. Os aumentos de PB da dieta, quando não convertidos em produto, promovem aumentados significativos na excreção de N-urinário (MULLER *et al.*, 2020; COLMENERO; BRODERICK, 2006ab).

Para N-urinário Shiehzadeh e Harbers, (1974) encontraram mesma excreção de 48% de N na urina para borregos consumindo farelo de soja, 45,3% com EAU 44% de sorgo e 52,4% com EAU 44% de batata ( $P > 0,05$ ). Estudo posterior com diferentes relações amido: ureia mostraram que QUE'ss de sorgo 44% e 70% tiveram menor excreção de N do que ureia (51,3% vs. 54%,  $P < 0,05$ ). Salman *et al.* (1997) encontraram excreção de 30,2% para EAU 38%, 28,02% para ureia e 18,2% para farelo de algodão em borregos alimentados com silagem de milho e concentrado. Oliveira Junior *et al.* (2004a) encontraram aumento do N-urinário para EAU 150S em gramas (73,1 g/d,  $P < 0,05$ ) em bovinos alimentados com bagaço de cana e concentrado, com similaridade entre ureia e farelo de soja deficiente em PDR (52,5 g/d). Os autores não demonstraram estatística do N-urina em porcentagem do ingerido, mas foram respectivamente 46,4% para EAU 150S, 30,7% para ureia e 40,9% para farelo de soja.

Suprimento de PDR, tipo de forragem, nível de inclusão do N, consumo de alimento são fatores que podem afetar o balanço de N. Teller e Godeau (1984) em estudo para vacas lactantes consumindo silagem de milho, observaram N-urina superior para ureia em relação ao farelo de soja (30,6% vs. 28,0%,  $P < 0,05$ ) e em estudo posterior ureia e EAU 60% de trigo foram similares (média 25,7%). Moraes *et al.* (2019) não observaram efeito linear ou quadrático no balanço de N (N-ingerido, fezes, urina, absorvido e retido,  $P > 0,18$ ) para bovinos confinados consumindo 50, 60, 70 e 80 g/100 kg PC com EAU 200%.

## 2.10. Desempenho de bovinos com ureia encapsulada com cera

A ureia encapsulada com cera vegetal é um dos produtos de liberação lenta (SRU) no mercado e bastante estudado nos últimos anos. Existe uma infinidade de publicações com ureia encapsulada, mas as diferenças no manejo alimentar entre os estudos dificultam as conclusões sobre os efeitos do produto. Isso parece ocorrer também nas publicações sobre o sincronismo entre energia e proteína da dieta (CABRITA *et al.*, 2006).

Santos *et al.* (2011) estudaram o efeito da substituição do farelo de soja por ureia ou ureia encapsulada com cera (SRU, Alltech Inc., EUA) para vacas holandesas em meio da lactação ( $n = 18$ ). O delineamento usado foi o quadrado latino 3 x 3, com 21 dias por período. A dieta continha 15,5% PB com inclusão de 0,6% MS de ureia e 0,8% MS de SRU mais polpa cítrica. Eles observaram redução de 0,8 kg/d no CMS para vacas consumindo NNP, mas não encontraram diferença na produção de leite (31,5 kg/d,  $P = 0,98$ ), com tendência da ureia ( $P = 0,07$ ) e da ureia encapsulada ( $P = 0,09$ ) de melhorar

a eficiência alimentar em relação ao farelo de soja quando avaliados os contrastes. Em relação ao comportamento alimentar, ureia aumentou o número de refeições matutinas ( $P < 0,01$ ) assim como a ureia encapsulada ( $P = 0,05$ ). Ureia apresentou tendência de redução do tempo de consumo em minutos ( $P = 0,08$ ) em relação ao farelo de soja. O tempo médio das refeições não diferiu entre os tratamentos.

Para vacas em lactação consumindo dieta total Galo *et al.* (2003) avaliaram o impacto da SRU no balanço de N e desempenho produtivo. A SRU (Alltech Inc., EUA) foi incluída em 0,77% MS da dieta com 16% ou 18% PB e comparadas com dieta 18% PB com inclusão de farelo de canola. Silagem de milho, feno de alfafa e de leguminosas foram as forrageiras incluídas em 50% das dietas. Nas dietas PB variou com inclusão de farelo de trigo e todos os tratamentos tinham inclusão de ureia. O CMS e alantoína urinária foram similares entre os tratamentos, mas dieta com PB mais alta influenciou em aumento da produção de leite ( $P < 0,05$ ) e redução da EUN (-2,3%). A alta PB dietética com inclusão de SRU aumentou o volume urinário (+2,2 L/d,  $P < 0,05$ ) e a excreção urinária de N-total (+51 g/d). A excreção UN foi similar entre dieta 16% PB mais SRU comparada com dieta 18%PB com proteína verdadeira, mas aumentou N-fecal excretado para 18% PB em +28 g/d. O NUL foi superior quando SRU foi incluída em dieta com 18% PB comparada as demais dietas (23,1 vs. 19,8 mg/dL,  $P < 0,05$ ). A SRU não promoveu redução das excreções de N.

Taylor-Edwards *et al.* (2009a) avaliaram o comportamento de liberação da  $\text{NH}_3$ , AGCC ruminais, degradação *in situ* e a possível adaptação da microflora microbiana do rúmen para bovinos alimentados com ureia lenta. A dieta consistiu em silagem de milho (90% MS) e concentrado com milho moído fornecidos por um período de 35 dias. Amostras do rúmen foram uma média de seis coletas até 10h após alimentação. A inclusão de ureia ou SRU foi de 1,8% MS. A taxa de degradação *in situ* foi de 6,58%/hora para ureia e 5,73%/h para SRU, similares ( $P = 0,48$ ). Houve tendência de aumento da atividade das ureases no fluido ruminal às 4h para SRU (148 vs. 89 mmol/(min.mL)<sup>2</sup>,  $P = 0,06$ ) devido à proteção com o revestimento do produto. Não houve diferenças nos parâmetros ruminais com exceção do N-amoniaco do rúmen menor para SRU (8,9 vs. 14,1 mM,  $P = 0,02$ ). Nesse estudo os autores provam que a liberação do produto é mais lenta que ureia no rúmen, no entanto em experimento posterior com ureia vs. SRU para bovinos (n = 180) não encontraram diferenças no ganho de peso vivo, CMS e eficiência alimentar quando incluso na dieta entre 0,8% e 1,6% MS da dieta, indicando que SRU tem liberação lenta do N, mas não melhorou desempenho dos animais. Taylor-Edwards *et al.* (2009b)

avaliaram o fluxo de nutrientes no PDV, em que SRU manteve N-amoniaco do rúmen constante e menor que ureia nas primeiras 6h após alimentação (tratamento *vs.* tempo  $P < 0,001$ ). A ureia promoveu aumento da liberação de N no PDV, mas  $\text{NH}_3$  se manteve constante para SRU em todo o período avaliado, e a ureia aumentou significativamente a absorção de amônia no PDV aos 30 minutos após alimentação ( $P = 0,02$  para interação tratamento *vs.* tempo). Em relação ao balanço de N, SRU aumentou o N-fecal (+4 g/d,  $P = 0,04$ ). A ureia de liberação lenta modifica a entrada de  $\text{NH}_3$  no PDV e tem potencial influenciador do metabolismo de N.

Em relação a composição de gordura do leite Silveira *et al.* (2012) para vacas lactantes a nível de fazenda observaram uma queda no teor de gordura do leite para animais recebendo ureia encapsulada com cera ( $P = 0,04$ ) quando incluíram grãos de milho junto a SRU em substituição ao farelo de soja, observaram ainda similaridade entre o NUL. No entanto não observaram esse efeito na gordura quando compararam substituição de farelo de soja por SRU mais inclusão de silagem de milho, mas nesse segundo experimento houve aumento do NUL. Os autores sugerem que incluir carboidrato de alta fermentação ruminal, como milho moído, melhorou o sincronismo ruminal de energia e N pois os resultados foram coerentes com aumento do amido na dieta. Inostroza *et al.* (2010) observaram tendência ( $P = 0,07$ ) de redução do teor de gordura no leite para ureia encapsulada com cera (3,69 *vs.* 3,72%) e o autor não explica o efeito, mas devemos considerar que a dieta com SRU continha +1% de milho de alta umidade no concentrado. O efeito não foi significativo para rendimento de gordura por dia. O estudo de Santos *et al.* (2011) em substituição do farelo de soja por ureia encapsulada mais polpa cítrica na dieta não observaram efeitos na gordura do leite. Efeitos na gordura podem ser reflexos de mudanças na proporção dos AGCC's ruminais.

Duas metanálises recentes utilizando modelos lineares misto e regressão linear, unem diversas pesquisas sobre essa SRU no desempenho para bovinos de corte (SALAMI *et al.*, 2020) e bovinos de leite (SALAMI *et al.*, 2021). Em resumo para novilhos a SRU não afetou CMS (9,5 kg/d) mas melhorou o ganho de peso vivo (+92 g/d) e eficiência alimentar (+1,2%). Para vacas leiteiras a SRU reduziu o CMS (-500g/d,  $P < 0,05$ ) e a ingestão de N (-20g/d,  $P < 0,05$ ) sem afetar o desempenho lácteo, e refletiu em aumento da eficiência alimentar (EA: +3%) e da EUN (+4%). Nesse compilado de dados aumentar PB da dieta reduziu EUN possivelmente por maior consumo do N.

Há a estimativa de redução da pegada de carbono (CFP) da dieta com a inclusão das SRU's por substituição do farelo de soja e pela inclusão de subprodutos na dieta quando incluída SRU. Para novilhos de corte houve redução de -111,5 kg CO<sub>2</sub> equivalente por produção de proteína bovina por cabeça (-2,2%, SALAMI *et al.*, 2020). Para vacas leiteiras houve redução calculada de - 54 g CO<sub>2</sub> equivalente por kg de leite produzido (-14,5%, SALAMI *et al.*, 2021). Qualquer melhora na eficiência alimentar pode reduzir a CFP estimada das dietas.

Em resumo os trabalhos de desempenho com animais vivos consumindo ureia encapsulada com cera observaram a melhoria da eficiência de alimentar por redução do CMS sem afetar a produção de leite e parece reduzir a pegada de carbono relacionados à ração por unidade de produto (SALAMI *et al.*, 2021; SALAMI *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2011). A fonte de carboidrato introduzida na dieta junto a SRU em substituição à fonte de proteína verdadeira também influencia no aproveitamento do N e na CFP.

#### 2.11. Produtos de ureia de liberação lenta *in vitro* para ruminantes

Vimos em tópicos iniciais dessa revisão que existe uma infinidade de fatores contribuem para concentração de NH<sub>3</sub> no rúmen e para síntese microbiana, que tornam mais difícil controlar os experimentos com liberação de N no organismo animal vivo. Essa é a razão pela qual Helmer *et al.* (1970a) optou pela técnica *in vitro* para elaborar o primeiro estudo publicado de AEU com avaliação da liberação do N. Nesse estudo eles relatam que a inclusão de milho como fonte de energia reduziu o acúmulo de N-amoniaco pois estimulou a síntese bacteriana. A maioria dos estudos de processamento do produto, da liberação do N *in vivo* e *in vitro* e desempenho com EAU foram extensivamente citados nos primeiros tópicos dessa revisão e esse espaço será destinado a trabalhos do acúmulo de N *in vitro* com outras ureias revestidas.

Existem diversos revestimentos para ureia que prometem modular a disponibilidade de N no rúmen e favorecer o sincronismo do N e energia, e aparentemente eles funcionam como uma barreira física que reduz atividade das ureases. O tipo de revestimento pode influenciar na solubilização do N. Os principais polímeros são: carboidratos (celulose, amido), ceras, sais minerais e polímeros artificiais (CHERDTONG *et al.*, 2010; TAYLER-EDWARDS *et al.*, 2009; BARTLEY *et al.*, 1981; HELMER; BARTLEY, 1970). Estudos com ureia encapsulada com cera *in vitro* em fluido ruminal tem demonstrado uma liberação do N intermediária em relação ao farelo

de soja e menor que a ureia comum (GONÇALVES *et al.*, 2015; PINOS-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; MARICHAL *et al.*, 2009; GALO *et al.*, 2003). Em estudos para reduzir a liberação do N com fertilizantes de plantas são realizados com incubação em água *in vitro* para análise da permeabilidade, e alguns estudos de ureia lenta para ruminantes também usam essa metodologia para análise da solubilidade, pois tanto o solo quanto o rúmen são meios aquosos. Para alimentos de ruminantes essa técnica em água não parece adequada pois no rúmen a síntese microbiana é importante substrato metabólico para o animal, mas a técnica nos gera parâmetros sobre a curva de acúmulo do N.

Nas experimentações *in vitro* de liberação do N geralmente são encontradas diferenças significativas entre fontes proteicas. Estudos de Cass e Richardson (1994) avaliaram a liberação do N de ureia, farelo de algodão e dois produtos de liberação lenta revestidas com cálcio em solução ruminal incubada, tubos tiveram ajuste de amido de milho até atingir 14% PB, por 24h (coleta às 0, 2, 4, 6 e 8h). Farelo de algodão apresentou as menores concentrações de amônia em todo o tempo e ureia o maior até 8h, as ureias revestidas com cálcio foram intermediárias à ureia e ao farelo de algodão ( $P < 0,05$ ).

Galo *et al.* (2003) avaliaram a solubilidade em meio aquoso (39°C) da ureia e de amostras de dois lotes diferentes de ureias encapsuladas com cera. Amostras foram coletadas durante uma hora, com intervalos de dez minutos, para análise do N. Eles observaram que ambas as ureias encapsuladas tiveram liberação mais gradual do N até 50 minutos de incubação, mas aos 60 min eram tão amplas quanto a ureia comum (83% e 77% em relação à ureia). A ureia se manteve alta e constante em todos os horários analisados, confirmando a solubilidade exacerbada e alta higroscopicidade. Marichal *et al.* (2009) encontraram resultados semelhantes estudando acúmulo do N em fluido ruminal *in vitro*. Neste a ureia comum teve rápida liberação do N, farelo de girassol, farelo de soja, farelo desidratado de cervejaria e farelo de glúten de milho tiveram menor acúmulo do N e ureia encapsulada com cera foi intermediária. Para ureia e ureia encapsulada metade do N apareceu na forma de N-NH<sub>3</sub> entre 2h e 6h após incubação, às 5h de incubação ureia encapsulada obteve o equivalente a 63% da extensão de solubilização da ureia. Pinoz-Rodrigues *et al.* (2010) em incubação com fluido ruminal *in vitro* observaram 100% da liberação do N da ureia aos dez minutos, enquanto ureia encapsulada com cera e farelo de soja foram menores e similares nesse horário. Após uma hora de incubação ureia encapsulada foi maior que o farelo de soja, mas demorou 12 horas

até atingir 90% de liberação do N. Ureia encapsulada liberou N mais lentamente que ureia, porém foi superior ao farelo de soja.

Xin *et al.* (2010) observaram menor solubilização do N *in vitro* para ureia revestida com poliuretano comparada a ureia comum ( $P < 0,05$ ). A ureia revestida foi similar ao farelo de soja isolado. Estudo anterior em fermentador de fluxo contínuo, em dietas isonitrogenadas, os autores observaram menor eficiência de conversão microbiana para ureia comum (expressa em gramas de N microbiano por kg de matéria orgânica verdadeiramente digerida) e similares para farelo de soja isolado e ureia-poliuretano. Vacas holandesas alimentadas com ureia-poliuretano em substituição parcial da proteína verdadeira apresentaram desempenho da lactação similar ao farelo de soja e superior à ureia comum.

Diversos revestimentos são usados para proteção da ureia. Ibrahim Babadi e Yunus (2014) executaram alguns estudos sobre diferentes revestimentos de fertilizantes de ureia de liberação lenta. Eles recobriram a ureia com três materiais: cimento, zeólita e enxofre e observaram na morfologia dos produtos diversos espaços de acesso e partículas irregulares com cristais pontiagudos de ureia que facilitavam a solubilização do N. Em estudo posterior os autores peneiraram os materiais e recobriram o produto com cera material hidrofóbico, o que permitiu reduzir ainda mais a solubilização do N.

Seguindo o pensamento similar a Ibrahim, Babadi e Yunus (2014), Inácio *et al.* (2022) formularam dois produtos de ureia lenta para ruminantes com dois tipos de amido: fécula de mandioca (F16) e melação de cana-de-açúcar (F17) e as recobriram com cera de carnaúba. Os produtos foram comparados com dois produtos comerciais: ureia encapsulada com cera e EAU 200%. Nesse caso os autores tentaram aliar dois pontos importantes da nutrição: 1) aumentar a proteção física do produto com material hidrofóbico; e 2) melhorar a captura do N no rúmen por meio da sincronização de energia para os microrganismos. O comportamento de liberação do N até 6h foi superior para EAU 200% por possuir revestimento degradável e hidrofílico, apresentando assim maior solubilização do N e maior liberação média do N por minuto. A ureia encapsulada com cera apresentou a menor solubilização do N. Os produtos F16 e F17 tiveram solubilização aproximadas e intermediária aos produtos comerciais e o recobrimento com a cera de carnaúba foi capaz de melhorar a liberação do N de produtos revestidos com amido. A ureia com fécula de mandioca apresentou a maior produção de gases em 24 h indicando maior síntese microbiana e maior estímulo à fermentação e produção de AGCC. Taylor-

Edwards *et al.* (2009a) observaram maior atividade das ureases ruminais para ureia encapsulada com cera às 4h após alimentação comparada a ureia comum, possivelmente pela menor disponibilização de  $\text{NH}_3$  ruminal. Isso reforça a hipótese de maior proteção quando um produto hidrofóbico é usado como revestimento.

### 3. REFERÊNCIAS

- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; MARTENS, H. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 1-2, p. 43-59, 2006.
- AHVENJÄRVI, Seppo et al. Ruminant metabolism of grass silage soluble nitrogen fractions. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 1, p. 279-294, 2018.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of animal science**, v. 87, n. 10, p. 3317-3334, 2009.
- AMIREIA 200S. Amireia pajoara. Disponível em: [www.amireia.com.br/amireia-200s](http://www.amireia.com.br/amireia-200s) . Acesso em: 15 maio 2022 às 12h13min
- ARGYLE, J. L.; BALDWIN, R. L. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 8, p. 2017-2027, 1989.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of animal science**, v. 89, n. 4, p. 1092-1107, 2011.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of dairy science**, v. 88, p. E9-E21, 2005.
- BAKER, LDI; FERGUSON, J. D.; CHALUPA, W. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 11, p. 2424-2434, 1995.
- BANNINK, A.; HINDLE, V. A. Prediction of N intake and N excretion by dairy cows from milk data. **Report**, v. 3, p. 0008567, 2003.
- BARR, G. W.; BARTLEY, E. E.; MEYER, R. M. Feed Processing. VIII. Estimating Microbial Protein in Rumen Fluid with Presipitating Agents or in Incubated Mixtures of Uncooked Grain Plus Urea or Starea with Differential Centrifugation. **Journal of dairy science**, v. 58, n. 9, p. 1308-1313, 1974.
- BARROS, T. et al. Milk urea nitrogen as a predictor of urinary nitrogen and urea nitrogen excretions of late-lactation dairy cows fed nitrogen-limiting diets. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 2, p. 1601-1607, 2019.
- BARTLEY, E. E. et al. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatment methods. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 835-841, 1976.

- BARTLEY, E. E. et al. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. **Journal of animal science**, v. 53, n. 2, p. 494-498, 1981.
- BARTLEY, E. E.; DEYOE, C. W. Reducing the rate of ammonia release by the use of alternative non-protein nitrogen sources. **Recent developments in ruminant nutrition/editors, W. Haresign, DJA Cole**, 1981.
- BARTLEY, E. E.; DEYOE, C. W. **Feed product containing nonprotein nitrogen compounds and method for producing same**. U.S. Patent n. 3,642,489, 15 fev. 1972.
- BATISTA, E. D. et al. The effect of CP concentration in the diet on urea kinetics and microbial usage of recycled urea in cattle: a meta-analysis. **Animal**, v. 11, n. 8, p. 1303-1311, 2017.
- BEIG, B. et al. Coating materials for slow release of nitrogen from urea fertilizer: A review. **Journal of Plant Nutrition**, v. 43, n. 10, p. 1510-1533, 2020.
- BOUCHER, S. E. et al. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 12, p. 5619-5633, 2007.
- BRISTOW, A. W.; WHITEHEAD, D. C.; COCKBURN, J. E. Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep and goats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, n. 3, p. 387-394, 1992.
- BRITO, A. F.; BRODERICK, G. A. Effects of different protein supplements on milk production and nutrient utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1816-1827, 2007.
- BRITO, A. F.; BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effects of different protein supplements on omasal nutrient flow and microbial protein synthesis in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 4, p. 1828-1841, 2007.
- BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 4, p. 1370-1381, 2003.
- BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of dairy science**, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.
- BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, 2009.
- BULEON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International journal of biological macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- BUNTING, L. D. et al. Effect of dietary protein level on nitrogen metabolism in lambs: Studies using <sup>15</sup>N-nitrogen. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 3, p. 855-867, 1987.
- CABRITA, A. R. J. et al. Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows—a review. **Animal Research**, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2006.

- CABRITA, A. R. J. et al. Nitrogen supplementation of corn silages. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4008-4019, 2003.
- CALSAMIGLIA, S. et al. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1184-1196, 2010.
- CARMO, C. de A. et al. Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia para vacas em final de lactação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 277-286, 2005.
- CARMO, C. de A. et al. **Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia para vacas em final de lactação**. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 74p., 2001.
- CASS, J. L.; RICHARDSON, C. R. In vitro ammonia release from urea/calcium compounds as compared to urea and cottonseed meal. **Texas Tech. Univ. Agr. Sci. Natl. Res. Tech. Rpt**, 1994.
- CASTRO, L. P. et al. Lactation performance of dairy cows fed rehydrated and ensiled corn grain differing in particle size and proportion in the diet. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 11, p. 9857-9869, 2019.
- CHENG, J.; WALLACE, J. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux.
- CHERDTHONG, A. et al. Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: a review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 8, p. 2232-2241, 2010.
- CHOWDARY, K. P. R. et al. Preparation and evaluation of cross-linked starch urea-a new polymer for controlled release of aceclofenac. **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 4265-4270, 2010.
- 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.
- 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.
- COLMENERO, J. J. O.; BRODERICK, G. A. Effect of amount and ruminal degradability of soybean meal protein on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1635-1643, 2006b.
- COLMENERO, J. J. O.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1704-1712, 2006a.
- CONRAD, H. R.; BAILE, C. A.; MAYER, J. Changing meal patterns and suppression of feed intake with increasing amounts of dietary nonprotein nitrogen in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 11, p. 1725-1733, 1977.

COPPOCK, C. E.; PEPLAWSKI, M. A.; LAKE, G. B. Effect of urea form and method of feeding on rumen ammonia concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 6, p. 1152-1156, 1976.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, Grace. Distribution and changes in urease (EC 3.5. 1.5) activity in Rumen Simulation Technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, v. 47, n. 2, p. 331-348, 1982.

DAVIDOVICH, A. et al. Ammonia toxicity in cattle. III. Absorption of ammonia gas from the rumen and passage of urea and ammonia from the rumen to the duodenum. **Journal of Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 551-558, 1977.

DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 12, p. 4079-4082, 2003.

DIJKSTRA, J. et al. Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 292-302, 2013.

DINNING, J. S. et al. Effect of orally administered urea on the ammonia and urea concentration in the blood of cattle and sheep, with observations on blood ammonia levels associated with symptoms of alkalosis. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 153, n. 1, p. 41-46, 1948.

DONALD, A. M. Understanding starch structure and functionality. **Starch in food: Structure, function and applications**, University of Cambridge, UK. p. 156, 2004.

EATON, D.; POOLER, J. **Fisiologia renal de Vander**. Artmed Editora, 8<sup>a</sup> ed., 2015. (Fisiologia renal de Vander [recurso eletrônico] /Douglas C. Eaton, John P. Pooler; [tradução: Patrícia Lydie Voeux; revisão técnica: Elvino Barros]. - 8. ed. - Porto Alegre: AMGH, 2016. ISBN 978-85-8055-414-4.

EDWARDS, J. S.; BARTLEY, E. E. Soybean meal or starea for microbial protein synthesis or milk production with rations above thirteen percent natural protein. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 5, p. 732-739, 1979.

EZEQUIEL, J. M. B. et al. Digestibilidade aparente da energia e da fibra de dietas para ovinos contendo uréia, amiréia ou farelo de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 231-235, 2001.

EZEQUIEL, J. M. B. et al. Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquido-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 707-715, 2002.

FIRKINS, J. L.; YU, Zhongtang. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. **Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**, p. 19-54, 2006.

FORSBERG, C. I. W.; CHENG, K. J.; WHITE, B. A. **Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine**. In: *Gastrointestinal microbiology*. Springer, Boston, MA, 1997. p. 319-379.

GALO, E. et al. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2154-2162, 2003.

- GAMARANO, D. S. et al. Crystal structure transformations in extruded starch plasticized with glycerol and urea. **Polymer Bulletin**, v. 77, n. 9, p. 4971-4992, 2020.
- GAYNOR, P. J. et al. Milk fat yield and composition during abomasal infusion of cis or trans octadecenoates in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 1, p. 157-165, 1994.
- GERBER, P. J. *et al.* Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. **animal**, v. 7, n. s2, p. 220-234, 2013.
- GOLOMBESKI, G. L. et al. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 11, p. 4395-4403, 2006.
- GONÇALVES, Ana Paula et al. Slow-release urea in supplement fed to beef steers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 22-30, 2015.
- GROSSI, S. et al. Effect of slow-release urea administration on production performance, health status, diet digestibility, and environmental sustainability in lactating dairy cows. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2405, 2021.
- GUIMARÃES JÚNIOR, R. et al. Informações gerais: o que é uréia. **Embrapa Gado de Leite-Artigo em periódico indexado**, 2016.
- GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST, D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 2, p. 475-484, 1993.
- HARBERS, L. H.; SHIEHZADEH, S. A. Comparative Use by Lambs of Nitrogen from Soybean, Urea and Extruded Grain-Urea Products. **Transactions of the Kansas Academy of Science (1903)**, p. 75-83, 1975.
- HARBERS, L. H.; SHIEHZADEH, S. A. Comparative Use by Lambs of Nitrogen from Soybean, Urea and Extruded Grain-Urea Products. **Transactions of the Kansas Academy of Science (1903)**, p. 75-83, 1975.
- HARMANN, D. V.; HARPER, J. M. Modeling a forming foods extruder. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, p. 1099-1104, 1974.
- HARMEYER, J.; MARTENS, H. Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 10, p. 1707-1728, 1980.
- HARPER, J. M.; RHODES, T. P.; WANNINGER, L. A. Viscosity model for cooked cereal doughs. In: **Symposium Series**. p. 40-43, 1971.
- HELMER, L. G. et al. Feed processing. V. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (Starea) on nitrogen utilization in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 3, p. 330-335, 1970a.
- HELMER, L. G.; BARTLEY, E. E. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 1, p. 25-51, 1970a.
- HELMER, L. G.; BARTLEY, E. E.; DEYOE, C. W. Feed processing. VI. Comparison of starea, urea, and soybean meal as protein sources for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 7, p. 883-887, 1970b.

HENNING, P. H.; STEYN, D. G.; MEISSNER, H. H. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 9, p. 2516-2528, 1993.

HIZUKURI, S. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. **Carbohydrate research**, v. 141, n. 2, p. 295-306, 1985.

HOLDER, V. B. et al. The effects of degradable nitrogen level and slow release urea on nitrogen balance and urea kinetics in Holstein steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, p. 57-65, 2015.

HOLTER, J. B.; BYRNE, J. A.; SCHWAB, C. G. Crude protein for high milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 7, p. 1175-1188, 1982.

HUBER, J. T. et al. Varying levels of urea for dairy cows fed corn silage as the only forage. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 8, p. 1241-1247, 1967.

HUHTANEN, P.; HRISTOV, A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 7, p. 3222-3232, 2009.

HUNGATE, R. E.; SMITH, W.; CLARKE, R. T. J. Suitability of butyl rubber stoppers for closing anaerobic roll culture tubes. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 2, p. 908-909, 1966.

HUNTINGTON, G. B.; PRIOR, R. L. Digestion and absorption of nutrients by beef heifers fed a high concentrate diet. **The Journal of nutrition**, v. 113, n. 11, p. 2280-2288, 1983.

IBRAHIM, K. R. M.; BABADI, F. E. YUNUS, R. Comparative performance of different urea coating materials for slow release. **Particuology**, v. 17, p. 165-172, 2014.

INÁCIO, A. G. et al. A new feed additive composed of urea and soluble carbohydrate coated with wax for controlled release in ruminal fluid. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.

INOSTROZA, J. F. et al. Effect of diets containing a controlled-release urea product on milk yield, milk composition, and milk component yields in commercial Wisconsin dairy herds and economic implications. **The Professional Animal Scientist**, v. 26, n. 2, p. 175-180, 2010.

ÍTAVO, L. C. V. et al. **Concentração de Nitrogênio amoniacal no líquido ruminal e produção de gás in vitro de produtos nitrogenados não proteicos extrusados e farelados.** Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, A produção animal no mundo em transformação, 3p. 2012.

ÍTAVO, L. C. V. et al. Consumo, desempenho e parâmetros econômicos de novilhos Nelore e F1 Brangus x Nelore terminados em pastagens, suplementados com mistura mineral e sal nitrogenado com ureia ou Amireia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 419-427, 2008.

ÍTAVO, L. C. V. et al. **Solubilidade e concentração de nitrogênio amoniacal de produtos nitrogenados em líquido ruminal.** XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA: A Zootecnia Fazendo o Brasil Crescer, 3p. 2014.

JIN, D. et al. Differences in ureolytic bacterial composition between the rumen digesta and rumen wall based on ureC gene classification. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 385, 2017.

JOHNSON, D. E.; JOHNSON, K. A.; BALDWIN, R. L. Changes in liver and gastrointestinal tract energy demands in response to physiological workload in ruminants. **The Journal of nutrition**, v. 120, n. 6, p. 649-655, 1990.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 10, p. 2681-2692, 1998.

KAUFFMAN, A. J.; ST-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 10, p. 2284-2294, 2001.

KERTZ, A. F. et al. Influence of ambient ammonia odor on acceptance of a nonurea ration by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 5, p. 788-790, 1977.

KERTZ, A. F. Urea feeding to dairy cattle: A historical perspective and review. **The Professional Animal Scientist**, v. 26, n. 3, p. 257-272, 2010.

KHALIL, M. I. et al. Some studies on starch carbamate. **Starch-Stärke**, v. 46, n. 8, p. 312-316, 1994.

KOHN, R. A.; KALSCHUR, K. F.; RUSSEK-COHEN, E. Evaluation of models to estimate urinary nitrogen and expected milk urea nitrogen. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 1, p. 227-233, 2002.

KOZERSKI, N. D. et al. Calorimetry, physicochemical characteristics and nitrogen release from extruded urea. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2021a.

KOZERSKI, Noemila Debora et al. Extruded urea-corn product can partially replace true protein sources in the diet for lactating Jersey cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 282, p. 115129, 2021b.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência-Editora UFSM, 3ª Ed., 216p., 2019.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E223-E236, 2001.

LEE, C. et al. Effect of dietary protein concentration on ammonia and greenhouse gas emitting potential of dairy manure. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 1930-1941, 2012.

LINEBACK, D.R. Current concepts of starch structure and its impact on properties. **Journal of the Japanese Society of Starch Science**, v. 33, n. 1, p. 80-88, 1986.

LOOSLI, J. K. et al. Synthesis of amino acids in the rumen. **Science**, v. 110, n. 2849, p. 144-145, 1949.

LUDDEN, P. A. et al. Influence of the novel urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ruminant nitrogen metabolism: II. Ruminal nitrogen metabolism, diet digestibility, and nitrogen balance in lambs. **Journal of animal science**, v. 78, n. 1, p. 188-198, 2000.

- MARICHAL, M. de J. et al. Comparación de las cinéticas de liberación de N-NH<sub>3</sub> in vitro y de la degradación ruminal del N de la urea protegida, urea y subproductos agroindustriales. **Agrociencia (Uruguay)**, v. 13, n. 2, p. 52-59, 2009.
- MARINI, J. C. et al. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. **Journal of animal science**, v. 82, n. 4, p. 1157-1164, 2004.
- MARINI, J. C. et al. Urea transporters and urea recycling in ruminants. **Ruminant physiology**, p. 155-171, 2006.
- MARINI, J. C.; VAN AMBURGH, M. E. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. **Journal of animal science**, v. 81, n. 2, p. 545-552, 2003.
- MEERS, J. L.; TEMPEST, D. W.; BROWN, C. M. 'Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. **Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 187-194, 1970.
- MENDES, C. Q. et al. Substituição parcial do farelo de soja por ureia ou amireia na alimentação de cabras em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1818-1824, 2010.
- MENZEL, Carolin et al. Wheat starch carbamate: Production, molecular characterization, and film forming properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 172, p. 365-373, 2017.
- MORAES, G. J. et al. Extruded urea could reduce true protein source in beef cattle diets. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 103, n. 5, p. 1283-1294, 2019.
- MORRILL, J. L.; DAYTON, A. D. Soybean meal versus starea at two concentrations for young calves. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 4, p. 427-429, 1974.
- MUCK, R. E. Urease activity in bovine feces. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 11, p. 2157-2163, 1982.
- MUHRER, M. E.; HARRIS, D. W.; BLOOMFIE, RA. A reacted NPN-carbohydrate complex from urea. In: **Journal of Animal Science**. 1111 NORTH DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874: AMER SOC ANIMAL SCIENCE, p. 1770, 1968.
- MÜLLER, C. B. M. et al. Differences between Holstein dairy cows in renal clearance rate of urea affect milk urea concentration and the relationship between milk urea and urinary nitrogen excretion. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 143198, 2021.
- MUTSVANGWA, T. et al. Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6298-6310, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of dairy cattle: 2001**. National Academies Press, 2001.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. 2021. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition**. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>.

- NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª Edição.** Porto Alegre: Artmed Editora, 696-709 p., 2014.
- NOLAN, J. V.; LENG, R. A. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 177-194, 1972.
- NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K. J.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 2, p. 386-398, 2004.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 4, p. 1398-1404, 2003b.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Hypophagic effects of ammonium are greater when infused with propionate compared with acetate in lactating dairy cows. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1100-1104, 2003a.
- ODLE, J.; SCHAEFER, D. M. Influence of rumen ammonia concentration on the rumen degradation rates of barley and maize. **British journal of nutrition**, v. 57, n. 1, p. 127-138, 1987.
- OLDHAM, J. D.; SMITH, T. Protein–energy interrelationships for growing and for lactating cattle. In: **Protein contribution of feedstuffs for ruminants**. Butterworth-Heinemann, p. 103-130, 1982.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. C. de et al. Digestibilidade de nutrientes em dietas de bovinos contendo uréia ou amiréia em substituição ao farelo de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 173-178, 2004a.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. C. de. **Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia em dietas de bovinos de corte: I. digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminais e sanguíneos; II. Desempenho e III. Avaliação de indicadores de digestibilidade.** 198p., Tese de doutorado, Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002
- OLIVEIRA JUNIOR, R. C. et al. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 738-748, 2004b.
- OWENS, F. N.; BERGEN, W. G. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. **Journal of animal science**, v. 57, n. suppl\_2, p. 498-518, 1983.
- PARKER, D. S. et al. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, n. 2, p. 549-563, 1995.
- PARKER, R. ; RING, S. G. Aspects of the physical chemistry of starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.
- PATRA, A. K. Urea/ammonia metabolism in the rumen and toxicity in ruminants. In: **Rumen microbiology: From evolution to revolution.** Springer, New Delhi, 2015. p. 329-341.

- PATRA, A. K.; ASCHENBACH, J. R.. Ureases in the gastrointestinal tracts of ruminant and monogastric animals and their implication in urea-N/ammonia metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 39-50, 2018.
- PEARSON, R. M.; SMITH, J. A. B. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. **Biochemical Journal**, v. 37, n. 1, p. 148, 1943.
- PEREIRA, M. N. Dureza do grão de milho: um tópico brasileiro. **Simpósio Internacional em Formulação de Dietas para Gado Leiteiro**, v. 3, p. 2-11, 2014.
- PINOS-RODRÍGUEZ, J. M. et al. Effect of a polymer-coated urea based diet on the performance of lactating dairy cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 37, n. 2, p. 201-205, 2010.
- PIRES, A. V. et al. Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia na dieta de bovinos de corte confinados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 937-942, 2004.
- PIRES, Alexandre Vaz et al. Fontes nitrogenadas em rações contendo bagaço de cana-de-açúcar hidrolizado no desempenho de bovinos confinados em terminação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 163-168, 2008.
- POLAN, C. E.; MILLER, C. N.; MCGILLIARD, M. L. Variable dietary protein and urea for intake and production in Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 59, n. 11, p. 1910-1914, 1976.
- POWELL, J. M. *et al.* Feed–milk–manure nitrogen relationships in global dairy production systems. **Livestock Science**, v. 152, n. 2-3, p. 261-272, 2013.
- QUINTÃO, Fábio Arantes et al. Desempenho de borregas Santa Inês alimentadas com duas fontes de nitrogênio não-protéico em dietas formuladas estimulando a síntese de proteína microbiana ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 279-284, 2009.
- RANDEL, P. F. et al. Complete rations for dairy cattle. IV. Comparison of supplemental nitrogen sources by metabolizable protein concept. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 8, p. 1109-1116, 1975.
- RATNAYAKE, W. S.; JACKSON, D. S. Starch gelatinization. **Advances in food and nutrition research**, v. 55, p. 221-268, 2008.
- REDDY, P. K.; RAO, S. B.; PRASAD, D. A. Development and evaluation of extruded deoiled salseed meal urea products (Salurea-50 and Salurea-70) by in vivo methods. **Indian Journal of Animal Sciences**, 1981.
- REID, J. T. Urea as a protein replacement for ruminants: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 36, n. 9, p. 955-996, 1953.
- REKIB, A. et al. Effect of feeding higher doses of urea on the rumen metabolism in goat. **Indian Veterinary Journal**, v. 45, p. 735-739, 1968.
- REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, 2005.
- ROFFLER, R. E.; SATTER, L. D. Influence of ration composition on ruminal ammonia concentration. In: **Journal of Dairy Science**. 1111 N DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874: AMER DAIRY SCIENCE ASSOC, p. 663-663, 1973.

- ROMAN-PONCE, H. et al. Complete rations for dairy cattle. V. Interaction of sugarcane bagasse quantity and form with soybean meal, urea, and Starea. **Journal of dairy science**, v. 58, n. 9, p. 1320-1327, 1975.
- RUSSEL, J.B. **Rumen Microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca NY, 2002.
- RUSSELL, James B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of animal science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.
- SALAMI, Saheed A. et al. A meta-analysis of the effects of slow-release urea supplementation on the performance of beef cattle. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 657, 2020.
- SALAMI, Saheed A. et al. Meta-analysis and sustainability of feeding slow-release urea in dairy production. **Plos one**, v. 16, n. 2, p. e0246922, 2021.
- SALMAN, A. K. D. et al. Estudo do balanço nitrogenado e da digestibilidade da matéria seca e proteína de rações, para ovinos, suplementadas com amiréia, uréia ou farelo de algodão. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia-Journal of the Brazilian Society of Animal Science**, p. 179-185, 1997.
- SALVADOR, F. M. et al. Utilização de amiréias (produto da extrusão amido+ uréia) com diferentes proporções de uréia: 1. consumo e digestibilidade aparente da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 199-205, 2004.
- SANTOS, F. A. P. et al. Milk yield and composition of lactating cows fed steam-flaked sorghum and graded concentrations of ruminally degradable protein. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 215-220, 1998.
- SANTOS, J. F. et al. Resposta de vacas leiteiras à substituição parcial de farelo de soja por ureia encapsulada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 423-432, 2011.
- SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 8, p. 1219-1237, 1975.
- 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.
- SCHMIDT, S. P. et al. Comparison of soybean meal, formaldehyde treated soybean meal, urea and starea for steers. **Journal of animal science**, v. 37, n. 5, p. 1233-1237, 1973.
- SCHMIDT-NIELSEN, Bodil et al. Urea excretion in the camel. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 188, n. 3, p. 477-484, 1957.
- SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10094-10112, 2017.
- SEIXAS, José Renato Caleiro et al. Desempenho de bovinos confinados alimentados com dietas à base de farelo de algodão, uréia ou amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 2, p. 432-438, 1999.

SHIEHZADEH, S. A.; HARBERS, L. H. Soybean meal, urea and extruded starch-urea products compared as protein supplements in high-roughage lamb rations. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 206-212, 1974.

SHIEHZADEH, S. A.; HARBERS, L.H. Soybean meal, urea and extruded starch-urea products compared as protein supplements in high-roughage lamb rations. **Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 206-212, 1974.

SIEMION, P. et al. Solid state reactions of potato starch with urea and biuret. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 4, p. 247-255, 2004.

SILVA, L. F. P.; DIXON, R. M.; COSTA, D. F. A. Nitrogen recycling and feed efficiency of cattle fed protein-restricted diets. **Animal Production Science**, v. 59, n. 11, p. 2093-2107, 2019.

SILVEIRA, V. A. et al. Substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta em rebanhos leiteiros comerciais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 383-395, 2012.

SINCLAIR, L. A. et al. The partial replacement of soyabean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows. **Animal**, v. 6, n. 6, p. 920-927, 2012.

SMITH, C. J.; HESPELL, R. B.; BRYANT, M. P. Regulation of urease and ammonia assimilatory enzymes in *Selenomonas ruminantium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 89-96, 1981.

SMITH, C.J.; BRYANT, Marvin P. Introduction to metabolic activities of intestinal bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 149-157, 1979.

SPEARS, J. W.; SMITH, C. J.; HATFIELD, E. E. Rumen bacterial urease requirement for nickel. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 7, p. 1073-1076, 1977.

SPEARS, J. W.; SMITH, C. J.; HATFIELD, E. E. Rumen bacterial urease requirement for nickel. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 7, p. 1073-1076, 1977.

SPEK, J. W. et al. A review of factors influencing milk urea concentration and its relationship with urinary urea excretion in lactating dairy cattle. **The Journal of Agricultural Science**, v. 151, n. 3, p. 407-423, 2013.

STAPLES, Charles R. et al. Protein intake and reproductive performance of dairy cows: a review, a suggested mechanism, and blood and milk urea measurements. In: **Proc. 4th Annu. Florida Ruminant Nutr. Symp., Univ. Florida, Gainesville**. 1993. p. 37-51.

STARNEs, Scott R. et al. Influence of monensin and lasalocid on mineral metabolism and ruminal urease activity in steers. **The Journal of nutrition**, v. 114, n. 3, p. 518-525, 1984.

STEIGER-BURGOS, M. et al. Effect of water restriction on feeding and metabolism in dairy cows. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 2, p. R418-R427, 2001.

STILES, D. A. et al. Feed processing. VII. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (starea) on rumen metabolism in cattle and on urea toxicity. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 10, p. 1436-1447, 1970.

- SYMONDS, H. W.; MATHER, Denise L.; COLLIS, K. A. The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. **British Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 481-486, 1981.
- TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of dairy science**, v. 75, n. 1, p. 345-357, 1992.
- TAYLOR-EDWARDS, C. C. et al. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 200-208, 2009a.
- TAYLOR-EDWARDS, C. C. et al. Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 209-221, 2009b.
- TEIXEIRA, J. C. et al. Cinética da digestão ruminal da amiréia 45-S em vacas da raça holandesa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 3, p. 719-723, 1999.
- TELLER, E.; GODEAU, J. M. The Substitution of Soybean meal for Urea: The effect on the Ammonia Content of the Rumen Fluid, the N Flow in the Duodenum, the Nitrogen and Energy Balances and the Milk Production. **Archives of Animal Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 286-294, 1984.
- TELLER, E.; GODEAU, J.-M. Some attempts to improve the nutritive value of urea for dairy cows. **Archives of Animal Nutrition**, v. 36, n. 6, p. 541-550, 1986.
- TELLER, E.; GODEAU, J.-M. The effect of nitrogen supplements to maize silage on the amount and composition of the nitrogen fraction entering the intestine of cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 13, n. 1-2, p. 25-37, 1985.
- TEMPEST, D. W.; MEERS, J. L.; BROWN, C. M. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. **Biochemical Journal**, v. 117, n. 2, p. 405, 1970.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of cereal science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- THOMPSON, L. H. et al. Starea, urea and sulfur in beef cattle rations. **Journal of animal science**, v. 35, n. 2, p. 474-480, 1972.
- THORNTON, R. F.; WILSON, B. W. Factors affecting the urinary excretion of urea nitrogen in cattle. III.\* High plasma urea nitrogen concentrations. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 23, n. 4, p. 727-734, 1972.
- UTLEY, P. R.; BRADLEY, N. W.; BOLING, J. A. Effect of water restriction on nitrogen metabolism in bovine fed two levels of nitrogen. **The Journal of Nutrition**, v. 100, n. 5, p. 551-556, 1970.
- VILELA, F. G. et al. Efeito da substituição do farelo de soja pela Amireia 150S no consumo, produção e composição do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1512-1518, 2007.
- VIRTANEN, A. I. Milk Production of Cows on Protein-Free Feed: Studies of the use of urea and ammonium salts as the sole nitrogen source open new important perspectives. **Science**, v. 153, n. 3744, p. 1603-1614, 1966.

WALPOLE, M. E. et al. Serosal-to-mucosal urea flux across the isolated ruminal epithelium is mediated via urea transporter-B and aquaporins when Holstein calves are abruptly changed to a moderately fermentable diet. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 1204-1213, 2015.

WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. **Food & function**, v. 4, n. 11, p. 1564-1580, 2013.

WEETH, H. J.; LESPERANCE, A. L. Renal function of cattle under various water and salt loads. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 2, p. 441-447, 1965.

WEETH, H. J.; SAWHNEY, D. S.; LESPERANCE, A. L. Changes in body fluids, excreta and kidney function of cattle deprived of water. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 2, p. 418-423, 1967.

WHITE, H. M. The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. **Animals**, v. 5, n. 3, p. 793-802, 2015.

WHITELAW, F. G.; MILNE, J. S.; WRIGHT, Shelley A. Urease (EC 3.5. 1.5) inhibition in the sheep rumen and its effect on urea and nitrogen metabolism. **British journal of nutrition**, v. 66, n. 2, p. 209-225, 1991.

WILSON, G. et al. Evaluation of factors responsible for reduced voluntary intake of urea diets for ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 1431-1437, 1975.

XIN, H. S. et al. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 4, p. 491-500, 2010.

ZHOU, J. W. et al. Apparent digestibility, rumen fermentation, digestive enzymes and urinary purine derivatives in yaks and Qaidam cattle offered forage-concentrate diets differing in nitrogen concentration. **Livestock Science**, v. 208, p. 14-21, 2018.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO:**  
**EFFECT OF CRUDE PROTEIN SOURCE ON *IN VITRO* RUMINAL  
AMMONIA ACCUMULATION AND NITROGEN PARTITION IN DAIRY  
COWS**

1           **EFFECT OF CRUDE PROTEIN SOURCE ON *IN VITRO* RUMINAL**  
2           **AMMONIA ACCUMULATION AND NITROGEN PARTITION IN DAIRY**  
3           **COWS**

4  
5           **HIGHLIGHTS**

- 6     ▪ *In vitro* ammonia-N was highest for urea, intermediate for wax-coated and extruded  
7       starch-urea, and lowest for soybean meal  
8     ▪ Particle size and N to starch ratio of extruded starch-urea did not affect ammonia-N  
9       *in vitro*  
10    ▪ Excessive N from soybean meal, urea, or extruded starch-urea reduced the efficiency  
11      of N utilization for lactation  
12    ▪ Urine-N excretion was highest for urea, intermediate for extruded starch-urea, and  
13      lowest for soybean meal.

14  
15           **ABSTRACT**

16 Two experiments evaluated the effect of crude protein (CP) sources on N-NH<sub>3</sub>  
17 accumulation in rumen fluid *in vitro* and on lactation performance, dry matter (DM)  
18 intake (DMI), digestibility, eating and rumination behaviors, urea-N in milk and plasma,  
19 and N partition of lactating cows fed diets with excessive N supply. We evaluated the  
20 effect of product composition and particle size on nitrogen (N) release. Particle size  
21 fractions of ESU200 with variation in CP to starch ratio caused similar N-NH<sub>3</sub>  
22 accumulation *in vitro*. The N-NH<sub>3</sub> accumulation *in vitro* was highest for urea, lowest for  
23 soybean meal (SBM) and intermediate for wax-coated urea (WCU) and extruded starch-  
24 urea with 138% and 210% CP (ESU200). Sixteen Holstein cows (159 ± 117 days in milk)  
25 were individually fed a sequence of 4 treatments in 4×4 Latin squares, with 21-d periods,  
26 and 14 d of adaptation. Treatments were: Control (CTL, 16.4% CP in DM) and 3 diets  
27 with 18.1% CP in DM with added N from SBM, urea, or ESU200. Plasma urea-N (PUN)  
28 was measured at 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, and 21 h post-feeding. N partition into milk, urine,  
29 and feces and diet digestibility were measured by total collection of urine and feces.  
30 Rumen microbial yield was estimated by allantoin in urine. Treatment means were  
31 compared by tukey test. Significance was declared at  $P \leq 0.05$ . Treatments had no effect  
32 on DMI (24.5 kg/d), milk yield (33.1 kg/d), rumen microbial yield, and diet digestibility  
33 ( $P > 0.28$ ). Diet SBM increased milk protein yield relative compared to CTL and ESU200  
34 reduced milk fat yield relative to SBM and Urea. High protein diets increased the

35 proportion of daily intake at night and had no effect on eating and rumination behaviors.  
36 The milk urea-N (MUN) and PUN were lowest on CTL (15.6 and 17.1 mg/dL), highest  
37 on ESU200 (21.3 and 22.5 mg/dL), and intermediate on SBM (19.3 and 21.6 mg/dL) and  
38 urea (19.4 and 21.2 mg/dL). The pattern of PUN variation over time differed by treatment  
39 ( $P < 0.01$  for the interaction between treatment and sampling time). Cows fed high CP  
40 had lower N efficiency for lactation (22.9 vs. 25.2% of N intake) and excreted more urea-  
41 N in urine (162 vs. 121 g/d) than CTL. Urine-N was higher on urea (317 g/d and 43.5%  
42 of N intake) than on CTL (246 g/d and 37.3% of N intake) and SBM (274 g/d and 36.9%  
43 of N intake), and intermediate and with no difference from the other 3 diets on ESU200  
44 (300 g/d and 41.0% of N intake), reflecting the ranking of feeds based on N-NH<sub>3</sub>  
45 accumulation in vitro. Excessive dietary CP supply reduced the efficiency of N utilization  
46 for lactation and increased urine-N, independently of CP source.

47

48 **Key words:** extruded starch-urea, milk urea-N, nitrogen partition, plasma urea-N, slow-  
49 release urea, urine nitrogen.

50

51

## INTRODUCTION

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Protein supplementation is the highest nutritional cost of lactating cow diets and can affect the efficiency of N utilization for lactation (Castillo et al., 2000) and the negative environmental impact of the dairy sector (Dijkstra et al., 2013). Although current nutritional models can be used to fine-tune metabolizable amino acid supply in order to optimize dietary N concentration, diet cost, and the efficiency of N utilization, are not uncommon lactating cow diets with excessive crude protein (CP) concentration (Prestegard-Wilson et al., 2021). Under such scenario, non-protein N (NPN) sources, such as urea (Hailemariam et al., 2021), may be a viable alternative for meeting the N requirement of rumen bacteria (Virtanen, 1966) at a lower cost than conventional high CP concentrates, such as soybean meal (SBM). However, urea-N is fully hydrolyzed to N-NH<sub>3</sub> by ruminal ureases at a rate that can exceed the capacity of incorporation of dietary N into microbial protein (Taylor-Edwards et al., 2009). Excess ammonia accumulated in the rumen can flow to the blood and after metabolization to urea by the liver can be lost in milk, feces, and urine (Lapierre and Lobley, 2001).

66

67

Slow release NPN sources have been developed to reduce the rate of urea hydrolysis in the rumen, and also to avoid the low palatability and hygroscopicity of urea

68 (Helmer et al., 1970a). Wax-coated urea has been an extensively evaluated slow release  
69 NPN source for dairy cows (Salami et al., 2021). Extruded starch-urea (ESU) has been  
70 developed with the attempt of slowing down the rate of urea hydrolysis in the rumen and  
71 simultaneously supply rapidly degradable starch for rumen microbial growth (Helmer et  
72 al., 1970b). The CP to starch ratio, particle size, and the grain source of gelatinized starch  
73 in ESU products can vary (Bartley and Deyoe, 1972). In the experiment of Helmer et al.  
74 (1970b), with finely ground ESU ranging from 34 to 44% CP, the addition of urea to  
75 corn after cooking was as effective as corn extruded with urea in reducing N-NH<sub>3</sub> and in  
76 increasing microbial concentrations in 4 h ruminal *in vitro* incubations. The non-  
77 difference between extruded along with urea or extruded corn without urea in this study  
78 suggests that starch gelatinization may explain the mode of action in ESU products with  
79 a low CP/starch ratio, regardless of a possible link between starch and urea. Stiles et al.  
80 (1970) also observed that relative to cracked sorghum added of 5% urea, the addition of  
81 the same amount of urea to extruded sorghum or to pelleted sorghum was as effective as  
82 sorghum extruded with urea in reducing ruminal N-NH<sub>3</sub> concentration in steers. The  
83 efficacy of the binding between urea and gelatinized starch in ESU with high CP content  
84 still needs to be elucidated. The partial replacement of soybean meal with ESU (150%  
85 CP) had no effect on lactation performance and increased plasma urea-N (PUN) of dairy  
86 cows, increased N-NH<sub>3</sub> in rumen fluid (Carmo et al., 2006), and increased urinary N-loss  
87 in beef steers (Oliveira Junior et al., 2004).

88 Therefore, two experiments evaluated the effect of CP sources on N-NH<sub>3</sub>  
89 accumulation in rumen fluid *in vitro* and on lactation performance, dry matter intake  
90 (DMI), diet digestibility, eating and rumination behaviors, urea-N in milk and plasma,  
91 and dietary N partition into urine, feces, and milk of lactating dairy cows. The experiment  
92 *in vitro* evaluated: A) iso-nitrogenous amounts of SBM, urea, wax coated urea (WCU),  
93 and ESU with 120% CP (ESU120) and 200% CP (ESU200). B) iso-nitrogenous amounts  
94 of particle size fractions of ESU200 with intrinsic variation in the concentrations of CP  
95 and starch. The experiment *in vivo* evaluated the partial replacement of SBM with Urea  
96 or ESU200 in diets with excessive N supply. Diets were formulated to be excessive in  
97 rumen degradable protein balance in order to evaluate the effect of the pattern of N release  
98 from CP sources independently of the incorporation of N from feed sources into microbial  
99 protein and also to represent a scenario of excessive CP supplementation relative to a  
100 control diet theoretically close to cow requirement.

## MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (CEUA/UFLA: 031/2019).

### ***Extruded starch-urea***

Two ESU products were industrially prepared to contain 200% (ESU200) or 120% (ESU120) crude protein (CP) on an as-fed basis, at different CP to corn starch ratios. The gelatinization of the blend of corn starch and urea was done with an extruder-cooker in the presence of moisture, heat, and pressure was based on recommendations of Helmer et al. (1970) (Amireia Pajoara, Brazil). The same batch of ESU200 was evaluated *in vitro* and *in vivo*, and ESU120 was evaluated only *in vitro*.

The particle size distribution and the CP and starch concentrations of each feed fraction are in Table 1. Forty subsamples from the same batch of ESU200 and 12 subsamples of ESU120 were dry sieved for 10 min with a Bertel shaker (Bertel Industria Metalúrgica Ltda., Caieiras, Brazil) with sieves of square diagonal apertures of 3,500, 2,000, 1,180, 600, 300, 150  $\mu\text{m}$  and pan. The proportion of particles retained on each sieve was recorded. The geometrical mean particle size ( $\mu\text{m}$ , GMPS) and surface area ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) were calculated as in Baker and Herrman (2002) using the mean retention on each screen. Composite samples were formed per feed and per fraction retained on each screen (N = 40 for ESU200 and N = 12 for ESU120). The DM concentration was determined by drying at 100°C for 4 h. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus (AOAC International, 2006; method 990.03). Starch plus free glucose was analyzed with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase and colorimetry for glucose as described in Fernandes et al. (2022), adapted from Hall (2015).

### ***In vitro ruminal ammonia accumulation***

The *in vitro* ruminal accumulation of ammonia-N ( $\text{N-NH}_3$ ) over time was used to evaluate N release from CP sources. Treatments were: ESU200, ESU120, Urea, soybean meal (SBM), and wax-coated urea (WCU. Optigen II, Alltech). The analyzed CP concentration of feeds were (% of dry matter, DM): 210% ESU200, 138% ESU120, 260% urea, 47.5% SBM, and 249% WCU. The *in vitro* ammonia-N accumulation of each feed particle of ESU200 was also evaluated.

131 The same amount of N from unground samples of each feed ( $40.45 \pm 0.65$  mg of  
132 N) was added to 100 mL glass tubes. Four tubes were incubated per feed, and 3 tubes per  
133 particle size fraction of ESU200. Finely ground dry ground corn ( $0.182 \pm 0.0023$  g DM)  
134 with 7.0% CP in DM was the energy source in all incubations ( $2.04 \pm 0.029$  mg N). Each  
135 tube contained 50 mL of rumen-buffer solution and treatments were simultaneously  
136 incubated. Rumen fluid was obtained from a steer fed a 16% CP concentrate twice per  
137 day (4 kg/d, as-fed basis) and tropical pasture (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu). The  
138 rumen fluid was filtered through four layers of cheese cloth and stored in a pre-heated  
139 thermos jug during transporting to the laboratory. The McDougall's artificial saliva  
140 without urea was prepared the day before and was kept at 39°C. The rumen fluid was  
141 mixed with the artificial saliva (4/1, volume/volume) and CO<sub>2</sub> was bubbled until pH  
142 reached 6.9, according to the first step of the *in vitro* procedure of Tilley and Terry (1963).  
143 Feeds were soaked with 1 mL distilled water at 39°C, before the start of incubations with  
144 50 mL of rumen-buffer solution. After CO<sub>2</sub> injection for 15 seconds, tubes were sealed  
145 with rubber stoppers and aluminum seals. To allow sampling of each tube over time, a  
146 three-way stopcock attached to a needle was inserted and samples were aspirated with a  
147 syringe. Tubes were incubated in a room with controlled temperature at 39°C and were  
148 sampled at 30, 90, 150, and 270 min of incubation. Samples were immediately frozen (-  
149 20°C) and analyzed for ammonia-N (mg/dL) by a colorimetric assay catalyzed by  
150 indophenol (Chaney and Marbach, 1962).

## 151 *In vivo experiments*

### 152 *Cows and treatments*

153 Sixteen Holstein cows ( $159 \pm 117$  days in milk, 4 primiparous) were individually  
154 fed in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high-pressure sprinklers.  
155 Cows formed 4 groups by parity (1 vs. >1) and milk yield. Within a group (square),  
156 cows were randomly allocated to a sequence of 4 treatments in Latin squares with 21-d  
157 periods, 14 d of adaptation to treatments, and balanced for carryover effects (Williams,  
158 1949). Treatments were: A control diet (CTL) based on soybean meal with 16.4% CP and  
159 + 23 g/d of rumen degradable protein (RDP) balance based on NRC (2001) prediction  
160 (Table 2) other diets with additional N to achieve 18.0% CP in DM either from SBM,  
161 urea, or ESU200. The high protein diets were formulated to be excessive in RDP balance  
162 in order to evaluate the effect of the pattern of N release independently of the  
163 incorporation of the N from feed sources into microbial protein. The CP sources replaced

164 citrus pulp in the basal diet and other ingredients were kept constant. The composition of  
165 feed ingredients and the particle size distributon of urea and ESU200 used in the  
166 experiment are in Tables 3 and 4.

167 A total mixed ration (TMR) was mixed 1 x/d in a 1.2 m<sup>3</sup> vertical stationary mixer  
168 (Unimix 1200. Casale, Brazil) and cows were fed at 0700 h in amounts to achieve 7 to  
169 10% of offered as daily refusal. The DM concentration of silages was evaluated weekly  
170 (Koster Crop Tester, EUA) and diets were adjusted accordingly. During the 3<sup>rd</sup> week of  
171 each period, samples of feeds and refusals per cow were collected daily, frozen, and  
172 composite samples were formed for laboratory analysis. Samples were dried for 72 h at  
173 55°C in a forced air oven. The DM concentration was determined by drying samples at  
174 100°C for 24 h. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus  
175 (AOAC International, 2006; method 990.03) and ash by incineration at 550°C for 8 h.  
176 The composition of the offered TMR was calculated based on the composition of each  
177 feed (Tables 2 and 3). The particle size distribution of urea and ESU in reported in Table  
178 4. The composition of the consumed diet in nutrients was the nutrient intake of all cows  
179 on a treatment (offered minus orts) divided by the DMI during the entire experiment. The  
180 proportion of CP coming from the CP sources was calculated based on the proportion of  
181 feeds in the offered TMR DM.

### 182 *Performance and intake*

183 Milk yield was recorded daily throughout the experiment and the mean yield of d  
184 15 to 21 of each period was used to compare treatments. Cows were milked 3 times per  
185 day at 0500, 1300, and 2000h in an adjacent herringbone parlor. On d 17 to 21, milk  
186 samples were obtained in proportion to the amount produced in each milking. Samples  
187 were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol under refrigeration.  
188 The concentrations in milk of total solids, protein, fat, lactose, casein, and urea-N (MUN)  
189 were analyzed by mid-infrared analysis (Nexgen FTS/FCM. Bentley Instruments Inc.,  
190 Chaska, USA) in a commercial laboratory (Laboratory of the Paraná State Holstein  
191 Breeders Association, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated  
192 (NRC, 2001):  $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of}$   
193  $\text{milk}$ . The secretion of energy corrected milk (ECM, kg/d) was calculated as: Milk energy  
194  $\text{secretion}/0.70$  (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6%  
195 lactose). Feed efficiencies were calculated as milk yield/DMI and ECM/DMI. The body  
196 weight (BW) immediately after morning milking was measured on d 20 and 21 of each

197 period, and body condition score (BCS. 1 to 5, thin to fat) was the mean of 4 independent  
198 evaluators on d 21.

### 199 *Chewing*

200 On d 15 to 17, proportions of the daily intake in the morning (0700–1300 h),  
201 afternoon (1300–1900 h), and night (1900–0700 h) were determined by measuring feed  
202 availability per cow at 0700 h and orts at 1200 h, 1900 h, and 0700 h. Particle size sorting  
203 behavior was evaluated by the proportion of particles above the 19-mm mesh diameter  
204 screen and above and below the 8-mm mesh screen of the Penn State Particle Separator  
205 (Lammers et al., 1996) at 0700h for the offered TMR and at 0700 h, 1200 h, 1900 h, and  
206 0500 h for refusals. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was:  
207 % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR consumed. The observed intake of particles was:  
208 % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR offered - % orts retained on screen  $\times$  kg of orts.  
209 The selection index (Leonardi and Armentano, 2003) was:  $100 \times (\text{observed}$   
210  $\text{intake/predicted intake})$ . Sorting values below 100% represent selective refusal, above  
211 100% represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection. A mean  
212 value was generated per cow per period.

213 During d 15, eating and rumination behaviors were monitored by visual  
214 observation of the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for 24 h.  
215 The buccal activities evaluated were eating, drinking, rumination, and idleness. Eating  
216 and rumination per unit of DMI were calculated using the intake on the day of evaluation  
217 of chewing activity. Individual feeding observations were combined and separated into  
218 meals using a meal criterion (i.e., the minimum duration of time between meals)  
219 calculated for each cow. Meal criteria were calculated for each cow using methods  
220 described by DeVries et al. (2003); in summary, a software package (MIX 3.1.3;  
221 MacDonald and Green, 1988) was used to fit normal distributions to the frequency of  
222  $\log_{10}$ -transformed intervals of time between recorded eating observations. If the interval  
223 of time between two recorded observations of eating exceeded the determined meal  
224 criterion, this was classified as a different meal. The number of different meals in a day  
225 was termed meal frequency (meals/d). Total meal time (min/d) was the total eating time  
226 (eating observations/d  $\times$  5 min), plus all the the non-feeding intervals shorter than the  
227 length of the meal criterion of each cow. Meal duration (min/meal) was calculated as the  
228 total daily meal time divided by the meal frequency. Finally, meal size was the ratio  
229 between daily DMI (kg/d) and meals/d. The duration of the first daily meal was measured

230 with a stopwatch. Five evaluators observed the behavior of all cows, individually, after  
231 offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

### 232 *Plasma urea*

233 On d 18, plasma urea-N (PUN) was measured on samples obtained from the  
234 coccygeal vessels at 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, and 21 h after morning feeding. After collection  
235 in vacutainer tubes with EDTA, blood was centrifuged at  $2,000 \times g$  at room temperature,  
236 and the plasma was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Urea was quantified with a commercial enzymatic  
237 kit (Urea 500, Doles Reagentes para Laboratórios, Brazil). The area under the curve for  
238 PUN was calculated for each cow by assuming a linear change over time in PUN  
239 concentration between 2 consecutive samplings (7 intervals on a 21 h period). The  
240 duration per d of  $\text{PUN} \geq 21 \text{ mg/dL}$  (min/21 h) was calculated.

### 241 *Digestibility and rumen microbial yield*

242 The total-tract apparent digestibilities of DM, OM, and CP were determined by  
243 manual collection of feces on d 19 to 21. Feces and urine were collected in buckets; for  
244 every 2 cows, 1 researcher stood behind them for 8 h and collected any fecal and urine  
245 excretion into the bucket. The second and third sampling periods were each delayed by 8  
246 h, thus representing a 24-h collection. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were  
247 immediately frozen throughout the collection period, and a composite sample was formed  
248 per cow. Composite fecal samples were dried for 72 h at  $55^{\circ}\text{C}$  in a forced air oven.  
249 Concentrations of DM, CP and ash were determined as previously described. The  
250 digestible OM intake (DOMI) was calculated ( $\text{OM intake} \times \text{OM digestibility}$ ).

251 The urinary output was collected in buckets as cows urinated, simultaneously to  
252 fecal sampling, to estimate the relative ruminal microbial yield based on allantoin  
253 excretion (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (50 mL) was placed in 1 L glass  
254 containers under refrigeration and urine was added to it during the collection period.  
255 Composite urine samples were diluted 1:5 with 4% sulfuric acid solution and frozen at  
256  $-20^{\circ}\text{C}$ . Allantoin was analyzed according to Chen and Gomes (1992). The efficiency of  
257 microbial growth was estimated as allantoin/DOMI (mmol/kg).

### 258 *N partition*

259 Nitrogen intake was partitioned into N in milk, feces and urine. The concentration  
260 of N in milk was the milk CP/6.38 (Ipharraguerre and Clark, 2005). The N in feces and

261 urine were analyzed by micro Kjeldahl (AOAC International, 2006; method 990.03  
262 AOAC International, 2006; method 990.03). Urea-N (UUn, mg/dL) and creatinine (UCr,  
263 mg/dL) in urine and creatinine in a composite of plasma samples obtained over time (PCr,  
264 mg/dL) were analyzed with commercial kits (Urea 500 and Creatinina, Doles Reagentes  
265 para Laboratórios, Brazil). The glomerular filtration rate (GFR, mL/min) and the urea-N  
266 fractional excretion rate (kER, %/min) were calculated as in Lefebvre et al. (2008).  $GFR = (UCr \times V)/PCr$ , where V = urine volume (L/d).  $kER = (UUn \times V)/(PUN \times GFR) \times 100$ .  
267 = (UCr × V)/PCr, where V = urine volume (L/d).  $kER = (UUn \times V)/(PUN \times GFR) \times 100$ .  
268 The fractional rate of renal urea reabsorption (kRE, %/min) was  $100 - kER$ .

### 269 *Statistical analysis*

270 Data were analyzed with PROC MIXED of SAS (SAS University Edition, USA).  
271 The effect of CP sources on the ruminal *in vitro* accumulation of ammonia-N over time  
272 was analyzed with a repeated measures approach. The statistical model contained the  
273 fixed effects of treatment and sampling time, and the interaction between treatment and  
274 sampling time. Incubation tube nested within treatment was defined as random. The slice  
275 option compared treatments within time. Cow data collected over days were averaged and  
276 1 value per cow per period was used for statistical analysis, except for PUN that was also  
277 analyzed with a repeated measures approach. Data were analyzed with a Latin square  
278 model with the random effect of cow, and the fixed effects of period and treatment. For  
279 PUN, the fixed effect of sampling time and the interaction between treatment and time  
280 were added to the previous model and the interaction between cow, period, and treatment  
281 was defined as random. For the repeated measures analysis of PUN *in vivo* and N-NH<sub>3</sub> *in*  
282 *vitro* the covariance structure adopted was defined by the lowest value for the Akaike's  
283 Information Criterion among first order autoregressive [AR(1)], compound symmetry,  
284 and unstructured. In both studies Degrees of freedom were calculated using the Kenward-  
285 Roger option. Statistical significance was declared at  $P \leq 0.05$  and tendency at  $0.05 < P$   
286  $\leq 0.10$ . Treatments were compared with Tukey multiple comparison adjustment for the  
287 difference of LS-means when a  $P \leq 0.05$  was detected for the treatment effect.

## 288 **RESULTS**

### 289 *Particle size of ESU and in vitro ruminal ammonia accumulation*

290 The particle size distribution and the CP and starch concentrations of each feed  
291 fraction of ESU200 and ESU120 are shown in Table 1. The cumulative frequency of  
292 particles retained above the 1,180 μm screen was 45.9% for ESU200 and 51.0% for

293 ESU120. The ESU200 product had numerically smaller GMPS (423  $\mu\text{m}$ ) than ESU120  
294 (502  $\mu\text{m}$ ), with similar surface area (52  $\text{cm}^2/\text{g}$ ). The CP concentration in ESU200 was  
295 210% of DM and starch was 18% of DM. The ESU120 had 138% CP and 38.1% starch.  
296 The CP to starch ratio was 11.7 for ESU200 and 3.6 for ESU120. The CP to starch ratio  
297 was higher for small feed particles than for large particles for both ESU products, with a  
298 range of 22.1 for ESU200 (11.7 to 33.8) and 12.1 for ESU120 (3.6 to 15.7).

299 The effect of CP source on *in vitro* ruminal N-NH<sub>3</sub> accumulation over time is  
300 reported in Figure 1A. A significant interaction between treatment and time was detected  
301 ( $P < 0.01$ ). At 30 min of incubation, N-NH<sub>3</sub> in rumen fluid *in vitro* was highest for urea  
302 (21.8 mg/dL), lowest for SBM (7.1 mg/dL), and intermediate for WCU (12.7 mg/dL),  
303 ESU200 (13.7 mg/dL), and ESU120 (15.2 mg/dL) ( $P \geq 0.13$ , SEM = 1.3 mg/dL). A  
304 similar pattern of variation among CP sources was detected at 90 min of incubation and  
305 urea induced higher N-NH<sub>3</sub> concentration than the other CP sources at 150 min ( $P \leq 0.05$ ).  
306 At 270 min, N-NH<sub>3</sub> in rumen fluid was similar for all N sources ( $24.4 \pm 1.2$  mg/dL,  $P =$   
307 0.88). The N-NH<sub>3</sub> accumulation over time induced by WCU was similar to ESU200 and  
308 ESU120, regardless of differences in particle size and composition between ESU  
309 products.

310 An interaction between treatment and time was also detected ( $P < 0.01$ ) for  
311 ruminal N-NH<sub>3</sub> over time as affected by the particle size fraction of ESU200 relative to  
312 urea (Figure 1B). The particle size fraction of ESU200 affected the *in vitro* accumulation  
313 of N-NH<sub>3</sub> only at 30 min of incubation (7.9 mg/dL for 1,180 and 150  $\mu\text{m}$  and 10.4 mg/dL  
314 for 2,000, 600, 300  $\mu\text{m}$ , and pan) and it could not be related to the composition of the  
315 fraction (Table 1). At 90 and 150 min of incubation there was no difference among  
316 particle fractions (11.8 and 12.9 mg/dL, respectively). Although the accumulation of N-  
317 NH<sub>3</sub> was highest for urea at 30, 90, and 150 min, no treatment effect was detected at 270  
318 min of incubation.

### 319 ***Diets and lactation performance***

320 The concentration of CP in the diet was increased from 16.4% of DM in CTL to  
321 around 18% in the 3 diets with additional CP (Table 2). The additional CP from SBM  
322 was 2% of diet DM, from urea it was 1.7% of DM, and from ESU200 it was 1.8% of DM.  
323 Citrus pulp ranged from 1.2% of DM in SBM to 4.9% of DM in CTL, while the  
324 concentrations in the diet of forages, whole cottonseeds, and ensiled corn grain were

325 similar. The GMPS of ESU200 during the lactating cow experiment (452  $\mu\text{m}$ . Table 4)  
326 was similar to the GMPS of the *in vitro* incubated sample (423  $\mu\text{m}$ . Table 1), and was  
327 finer than urea (Table 4).

328 Intake, lactation performance, and feed efficiency are in Table 5. No treatment  
329 effect was detected for DMI (24.5 kg/d,  $P = 0.50$ ) or milk yield (33.1 kg/d,  $P = 0.73$ ).  
330 The intake of urea DM was 152 g/d (67 g N/d) and the intake of ESU200 DM was 203  
331 g/d (72 g N/d). There were treatment effects on lactation performance. Fat yield of cows  
332 fed ESU200 (1.120 g/d) was lower than SBM (+112 g/d) and higher than Urea (- 74 g/d)  
333 ( $P \leq 0.05$ ), but no treatment differed from CTL. Milk CP yield was higher ( $P \leq 0.05$ ) for  
334 cows fed SBM (1.114 g/d) than for cows fed CTL (- 59 g/d) and ESU200 (- 60 g/d). There  
335 were tendencies ( $P \leq 0.08$ ) for ECM and casein yield to be highest on SBM. The  
336 concentration of components in milk, the yields of lactose and total solids, feed efficiency,  
337 BCS, and BW did not differ ( $P \geq 0.14$ ).

#### 338 ***Milk and plasma urea-N***

339 The MUN concentration was lowest for cows fed CTL (15.6 mg/dL), higher for  
340 cows fed SBM and urea (19.3 mg/dL), and highest for cows fed ESU200 (21.3 mg/dL)  
341 ( $P \leq 0.05$ ). The MUN excretion (g/d) followed the same trend. The PUN measured 8  
342 times through a 21 h period was lowest ( $P \leq 0.05$ ) for CTL at 3, 6, 9, 12, 15, and 21 h  
343 post-feeding, as well as for the 21 h mean (17.1 mg/dL). At 0 h post-feeding, there was a  
344 tendency ( $P = 0.09$ ) for a treatment effect on PUN (also lowest for CTL cows). The  
345 highest PUN during the day on CTL was at 1.5 h post-feeding (20.1 mg/dL). Figure 3  
346 shows the pattern of variation in PUN over time. Cows fed CTL consistently had the  
347 lowest PUN throughout the day.

348 The pattern of variation in PUN over time differed among the 3 diets with  
349 excessive CP supply (Figure 2). The ESU200 induced the highest PUN (25.5 mg/dL) at  
350 6 h post-feeding, AUC, and daily duration of PUN greater than 21 mg/dL (Table 6)  
351 relative to the other 3 diets. Cows fed SBM and urea had similar AUC and duration of  
352 PUN greater than 21 mg/dL, with values intermediate to CTL and ESU200. Cows fed  
353 urea had higher PUN ( $P \leq 0.05$ ) than cows fed SBM only at 9 h post-feeding (16.9 vs.  
354 19.6 mg/dL).

#### 355 ***N partition***

356 Treatments did not affect ( $P \geq 0.39$ ) the flow (g/d) of N in milk and feces, the  
357 fractional rate of renal urea-N reabsorption (37.5 %/d) and excretion (62.6 %/d), and the  
358 proportion of urea-N in total urine-N (55.9%) (Table 6). However, there was a trend  
359 towards an increase in the glomerular filtration rate (GFR divided by body weight) of  
360 urea, which was higher for the Urea treatment (1431 vs. 1122 GFR/BW,  $P = 0.08$ ) in  
361 relation to the others. The daily excretion of urea-N in urine was lowest ( $P \leq 0.05$ ) for  
362 cows fed CTL (121 g/d), and the other 3 diets did not differ (162 g/d). Similarly, the  
363 proportion of N intake in milk was highest ( $P \leq 0.05$ ) for cows fed CTL (25.2% of intake)  
364 and similar for the other 3 diets (22.9% of intake). The high CP diets reduced the  
365 efficiency of N utilization for lactation and increased the flow of urea-N in urine,  
366 independently of CP source.

367 The urinary N loss of cows fed ESU200 was apparently intermediate to SBM and  
368 urea (Table 6). The excretion of urine-N was higher ( $P \leq 0.05$ ) on urea (317 g/d) than on  
369 CTL and SBM (260 g/d), and there was no difference between ESU200 (300 g/d) and the  
370 other 3 diets. The proportion of N intake in urine was lower ( $P \leq 0.05$ ) for cows fed CTL  
371 and SBM (37.1% of intake) than for cows fed urea (43.5% of intake), and there was no  
372 difference between ESU200 (41.0% of intake) and the other 3 diets.

373 The concentrations of MUN and PUN were positively correlated (Table 7). The  
374 highest linear regression determination coefficient was observed when the mean PUN  
375 was regressed against MUN ( $r^2 = 0.55$ ). Among the single time point measurements, PUN  
376 at 6 h post feeding had the highest correlation with MUN ( $r^2 = 0.42$ ).

### 377 **Chewing**

378 Eating and rumination behaviors were not affected by treatment diets ( $P \geq 0.17$ ),  
379 except for the lowest ( $P \leq 0.05$ ) duration of the first daily meal for cows fed SBM (60.6  
380 min) than the other 3 diets (68.2 min) (Table 8). A tendency ( $P = 0.08$ ) was also observed  
381 for cows fed SBM to have the lowest chewing/DMI. Cows fed CTL had lower ( $P \leq 0.05$ )  
382 proportion of daily intake at night (11.6%) than cows fed urea and ESU200 (16.7%), and  
383 cows fed SBM did not differ from the other 3 diets (15.3%). A tendency ( $P = 0.10$ ) was  
384 observed for cows fed CTL to have the largest proportion of daily intake in the morning.  
385 Cows fed ESU200 selected in favor ( $P \leq 0.05$ ) of feed particle retained on the 8 mm  
386 screen (106%) and cows fed CTL and SBM selected against the 8 mm screen (98%),  
387 while cows fed urea (102%) did not differ from the other 3 diets.

### 388 *Digestibility and rumen microbial yield*

389 There was no detectable treatment effect ( $P \geq 0.28$ ) on the total tract apparent  
390 digestibility of DM, OM, and CP (Table 9). The daily fecal excretion was similar (7.7  
391 kg/d) did not differ ( $P = 0.78$ ), but there was a tendency ( $P = 0.08$ ) for urine excretion  
392 (L/d) to be highest for cows fed urea and lowest for cows fed CTL and SBM. Rumen  
393 microbial yield and efficiency, estimated by the urinary allantoin excretion, did not differ  
394 ( $P \geq 0.37$ ).

## 395 DISCUSSION

### 396 *In vitro evaluation of CP sources*

397 The *in vitro* data suggests that the rate of ruminal N-NH<sub>3</sub> accumulation over time  
398 in slow release NPN sources (WCU, ESU120, ESU200) was intermediate to SBM and  
399 urea. The N-NH<sub>3</sub> accumulation over time was similar for ESU differing in CP and starch  
400 concentrations and WCU. Within the ESU200 product, particle size was intrinsically  
401 confounded with the composition of the particle size fraction, since fine particles had  
402 higher CP to starch ratio than coarser fractions. However, the *in vitro* N-NH<sub>3</sub>  
403 accumulation was not affected by the particle size and composition of ESU200 fractions,  
404 suggesting that the release of N-NH<sub>3</sub> in rumen fluid *in vitro* was determined by the  
405 binding of urea with gelatinized starch. Electron microscopy of ESU120 and ESU200  
406 (Figure 3) showed that urea crystals and starch granules, typical of corn endosperm  
407 (Wang and Copeland, 2013), could not be visualized after the gelatinization of starch in  
408 the presence of urea. The mechanism for the slow release of N in ESU has not been clearly  
409 demonstrated. The formation of starch carbamates has been a proposed mechanism  
410 (Wolff, 1953; Muhrer et al., 1968), but it has never been convincingly demonstrated.  
411 These observations suggest that chemical or physical binding between starch and urea  
412 may have occurred and the rate of N-NH<sub>3</sub> accumulation in rumen fluid was not dependent  
413 of ESU particle size or the CP to starch ratio.

### 414 *In vivo evaluation of CP sources*

415 Under excessive N supply relative to rumen requirement the source of dietary CP  
416 did not affect DMI, milk yield, rumen microbial yield, and the total tract digestibility of  
417 nutrients. Diet RDP concentration estimated by the NRC (2001) dairy model was (% of  
418 DM): 11.0 for CTL, 12.1 for SBM, and 12.6 for urea and ESU (both assumed to have

419 100% fraction A in CP). Rumen undegradable protein was estimated to be 5.9% of DM  
420 for SBM and 5.3% of DM for the other treatments. The MUN and PUN were high in all  
421 treatment diets and their pattern of variation throughout the day most probably reflected  
422 differences in the rate of ruminal release and absorption of N-NH<sub>3</sub> from CP sources.

423 Cows fed CTL consistently had the lowest PUN throughout the day and had the  
424 lowest MUN in relation to the increase in CP in others diets, consistent with the lower  
425 consumption of N. However, the pattern of variation in PUN during the day differed by  
426 CP source in diets with excessive supply of N. Urea induced a flatter PUN profile (similar  
427 do SBM) and ESU200 induced a higher and delayed PUN peak relative to the other diets.  
428 The mean daily PUN was highest for cows fed ESU200 and intermediate for cows fed  
429 urea and SBM. The MUN followed the same trend, highest for cows fed ESU200 and  
430 intermediate for cows fed urea and SBM. The pattern of variation among treatments in  
431 PUN and MUN did not reflect the difference among CP sources in N-NH<sub>3</sub> accumulation  
432 *in vitro*. *In vitro*, some cow factors determining ruminal N-NH<sub>3</sub> concentration are not  
433 considered (Helmer et al., 1970). The divergent result for these variables between  
434 experiments may reflect extra and uncontrolled factors observed *in vivo*, such as nitrogen  
435 recycling (Lapierre and Lobley, 2001) and water consumption rate (Holter et al., 1982).

436 The proportion of daily intake during the day did not explain the difference in  
437 PUN and MUN among the high CP diets, although the increase in diet CP concentration  
438 tended to reduce the proportion of daily intake in the morning and increased the  
439 proportion of intake at night, independently of CP source. The increased flow of ammonia  
440 from the rumen to the urea cycle can increase the oxidative catabolism of amino acids in  
441 the liver (Oba and Allen, 2003). One of the two amino groups of urea comes from  
442 aspartate. Urea synthesis may increase ATP production in the liver by increasing amino  
443 acid oxidation. Accumulation of hepatic ATP can stimulate the hepatic vagus and lead to  
444 satiety (Allen, 2000). However, no change was detected on eating and rumination  
445 behaviors, except for a reduction in first meal duration for cows fed SBM. Cows fed urea  
446 and ESU200 also differed from cows fed CTL and SBM in particle size sorting behavior  
447 in the morning. We do not have an explanation for the preferential selection of particles  
448 retained on the 8 mm screen with urea and ESU200 and for the refusal by cows fed CTL  
449 and SBM. Both urea and ESU200 should be retained in the bottom pan of the particle  
450 separator. Citrus pulp was retained on the 8 mm screen, but diets urea and ESU200 had  
451 the same citrus pulp concentration than CTL. There was no evidence that the ESU200

452 diet differed in palability relative to the diet with 0.6% urea in DM (Thompson et al.,  
453 1972). Overall, the effect of treatment diets on chewing and sorting behaviors was minor.

454 Although MUN and PUN concentrations were positively correlated across cows  
455 ( $r^2 = 0.55$ ), they did not have a strong correlation with N excretion in urine. Urine-N (g/d  
456 and % of daily intake) was highest for cows fed urea and lowest for cows fed CTL and  
457 SBM. Cows fed ESU200 had intermediate excretion of urine-N and did not differ from  
458 the other 3 diets. Urea-N excretion reflected the order across CP sources in N-NH<sub>3</sub>  
459 accumulation in vitro. Based on this variable, ESU200 would be more desirable than urea  
460 to avoid the negative impact of excessive CP supply on the environment. Urine-N is  
461 considered to be more detrimental to the environment than fecal-N (Lessa et al., 2014;  
462 Dijkstra et al., 2013). There was also a tendency for cows fed urea to have the highest  
463 daily excretion of urine (L/d). The increase in urine excretion may reflect an increase in  
464 water intake to excrete excessive PUN (Holter et al., 1982; Colmenero and Broderick,  
465 2006ab), at similar fractional rate of renal urea reabsorption. This justification agrees with  
466 the trend observed in our study ( $P = 0.08$ ) of an increase in GFR in the treatment with  
467 Urea compared to the other, and may explain the mean reduction in NUP in relation to  
468 ESU200. The typo of urea with ESU200 in low protein diets may reduce urine-N  
469 excretion in dairy cows and deserves further evaluation.

470 The ESU200 reduced milk fat yield relative to the diets with additional CP from  
471 SBM and urea. Silveira et al. (2012) observed a reduction in milk fat % when WCU plus  
472 ground corn partially replaced SBM in the diet of lactating dairy cows, similar to the  
473 observation of Souza et al. (2010) when WCU plus soyhulls partially replaced SBM.  
474 Inostroza et al. (2010) also observed a tendency for reduction in milk fat % when WCU  
475 was included in the diet of dairy herds, resulting in an increase in dietary starch  
476 concentration from 25.3 to 26.2% of DM. The partial replacement of SBM with slow  
477 release urea sources opens space in diet formulation for the inclusion of other feed  
478 ingredients, since the CP content is usually lower in SBM than in WCU or ESU with high  
479 CP content. The addition of highly fermentable starch from ESU200 may have changed  
480 rumen fermentation profile and reduced fat yield in our experiment, although the intake  
481 of starch from ESU200 was only 38 g/d ( $203 \text{ g DM/d} \times 0.187 \text{ g of starch/g DM}$ ). The  
482 delayed PUN peak for cows fed ESU200 (6 h post-feeding) may have been related to  
483 reduced rumen pH and its negative effect on N-NH<sub>3</sub> fractional rate of absorption by the  
484 rumen wall (Aschenbach et al., 2011; Abdoun et al., 2006; Carmo et al., 2006), what

485 seems to be consistent with the lower milk fat yield for this treatment. Urea without  
486 gelatinized starch could also increase rumen pH and the rate of N-NH<sub>3</sub> absorption  
487 (Abdoun et al., 2006; Roman-Ponce et al., 1975), a plausible explanation for the flatter  
488 PUN over time for cows fed urea relative to cows fed ESU200. Carmo et al. (2006)  
489 detected no effect of ESU with 150% CP in replacement to SBM or urea on milk fat %  
490 or yield of dairy cows fed diets without corn starch. No change in chewing behavior could  
491 be related to the reduction induced by ESU200 in milk fat yield. Milk protein yield was  
492 increased by SBM relative to CTL, probably as a result of increased RUP and  
493 metabolizable protein supply, since rumen microbial yield and DOMI did not differ.  
494 Cows fed SBM also tended to have increased casein yield. A tendency was observed for  
495 cows fed SBM to have the highest and for cows fed ESU200 to have the lowest ECM.  
496 There was no effect of treatments on feed efficiency. The effect of CP source on dietary  
497 nutrient supply and lactation performance was apparently of small magnitude.

## 498 CONCLUSIONS

499 The accumulation over time of N-NH<sub>3</sub> in rumen fluid *in vitro* was highest for urea,  
500 lowest for SBM, and intermediate for ESU120, ESU200, and WCU, independently of  
501 ESU200 particle size and concentrations of CP and starch in DM. Lactating dairy cows  
502 fed diets with excessive CP supply from SBM, urea, or ESU200 had similar DMI, diet  
503 digestibility, rumen microbial yield, chewing behavior, and lactation performance. Cows  
504 fed excessive CP from ESU200 had higher MUN and PUN than cows fed SBM and urea,  
505 and CTL was lowest. Excessive dietary CP supply reduced the efficiency of N utilization  
506 for lactation and increased urea-N excretion in urine, independently of CP source. The  
507 excretion of urine-N was highest for cows fed urea, lowest for cows fed SBM, and  
508 intermediate for cows fed ESU200, reflecting the ranking of feeds based on N-NH<sub>3</sub>  
509 accumulation *in vitro*.

## 510 REFERENCES

- 511 Abdoun, K., Stumpff, F., Martens, H. 2006. Ammonia and urea transport across the  
512 rumen epithelium: a review. *Animal Health Research Reviews*, 7(1-2), 43-59.  
513 <https://doi.org/10.1017/S1466252307001156>
- 514 Allen, M. S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating  
515 dairy cattle. *Journal of dairy science*, 83(7), 1598-1624.  
516 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)

- 517 AOAC International, 2006. Official Methods of Analysis. 18th ed. AOAC International,  
518 Arlington, VA.
- 519 Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., Gabel, G. 2011. Ruminant nutrition  
520 symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. Journal  
521 of animal science, 89(4), 1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>
- 522 Baker, S., T., Herrman. 2002. Evaluating particle size. Publication MF-2051. Kansas  
523 State University, Manhattan.
- 524 Bartley, E. E., Deyoe, C. W. 1972. U.S. Patent N°. 3,642,489. Washington, DC: U.S.  
525 Patent and Trademark Office.
- 526 Carmo, C. A., Santos, F. A. P., Imaizumi, H., Pires, A. V., Scoton, R. A., 2006.  
527 Substituição do farelo de soja por uréia ou amiréia para vacas em final de lactação. Acta  
528 Scientiarum. Animal Sciences, 27(2), 277-286. [https://doi.org/10.1590/S0100-  
529 204X2004000900014](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000900014)
- 530 Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E., France, J. 2000. A review of efficiency of  
531 nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental  
532 pollution. Journal of Animal and Feed Sciences, 9(1), 1-32.  
533 <https://doi.org/10.22358/jafs/68025/2000>
- 534 Chaney, A. L., Marbach, E. P., 1962. Modified reagents for determination of urea and  
535 ammonia. Clinical chemistry, 8(2), 130-132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- 536 Chen, X. B., Gomes, M. J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and  
537 cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical  
538 details. International Feed Resources Unit, Occasional Publication. Rowett Research  
539 Institute, Aberdeen, UK.
- 540 Colmenero, J. J. O., Broderick, G. A. 2006a. Effect of amount and ruminal degradability  
541 of soybean meal protein on performance of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science,  
542 89(5), 1635-1643. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72230-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72230-5)
- 543 Colmenero, J. J. O., Broderick, G. A. 2006b. Effect of dietary crude protein concentration  
544 on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. Journal of Dairy  
545 Science, 89(5), 1704-1712. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72238-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72238-X)
- 546 DeVries, T. J., Von Keyserlingk, M. A. G., Weary, D. M., Beauchemin, K. A. 2003.  
547 Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. Journal  
548 of Dairy Science, 86(10), 3354-3361. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73938-  
549 1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73938-1)
- 550 Dijkstra, J., Oenema, O., Van Groenigen, J. W., Spek, J. W., Van Vuuren, A. M.,  
551 Bannink, A. 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions.  
552 Animal, 7(s2), 292-302. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000578>
- 553 Fernandes, T., Silva, K. T., Carvalho, B. F., Schwan, R. F., Pereira, R. A. N., Pereira, M.  
554 N., Ávila, C. L. S. 2022. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional  
555 value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels. Animal

- 556 Feed Science and Technology. 285:115-227.  
 557 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115227>
- 558 Macdonald, P. D. M. and Green P. E. J. 1988 Ichthus Data Systems. User's guide to  
 559 program MIX: an interactive program for fitting mixtures of distributions. Hamilton,  
 560 Ont.: Ichthus Data Systems.
- 561 Hailemariam, S., Zhao, S., He, Y., Wang, J. 2021. Urea transport and hydrolysis in the  
 562 rumen: A review. *Animal Nutrition*, 7(4), 989-996.  
 563 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.002>
- 564 Helmer, L. G., Bartley, E. E., Deyoe, C. W., Meyer, R. M., Pfost, H. B., 1970a. Feed  
 565 processing. V. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (Starea) on  
 566 nitrogen utilization in vitro. *Journal of Dairy Science*, 53(3), 330-335.  
 567 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86205-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86205-1)
- 568 Helmer, L. G., Bartley, E. E., Deyoe, C. W., 1970b. Feed processing. VI. Comparison of  
 569 starea, urea, and soybean meal as protein sources for lactating dairy cows. *Journal of*  
 570 *Dairy Science*, 53(7), 883-887. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86312-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86312-3)
- 571 Holter, J. B., Byrne, J. A., Schwab, C. G., 1982. Crude protein for high milk production.  
 572 *Journal of Dairy Science*, 65(7), 1175-1188. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82329-1)  
 573 [0302\(82\)82329-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82329-1)
- 574 Inostroza, J. F., Shaver PASR.D., Cabrera, V.E. and Tricárico, J.M. 2010. Effect of diets  
 575 containing a controlled-release urea product on milk yield, milk composition, and milk  
 576 component yields in commercial Wisconsin dairy herds and economic implications. *The*  
 577 *Professional Animal Scientist*, 26, n. 2, p. 175-180. [https://doi.org/10.15232/S1080-](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30577-5)  
 578 [7446\(15\)30577-5](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30577-5)
- 579 Ipharraguerre, I. R., Clark, J. H. 2005. Varying protein and starch in the diet of dairy  
 580 cows. II. Effects on performance and nitrogen utilization for milk production. *Journal of*  
 581 *Dairy Science*, 88(7), 2556-2570. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72932-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72932-5)
- 582 Lammers, B. P., Buckmaster, D. R., and Heinrichs, A. J. 1996. A simple method for the  
 583 analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *Journal of dairy science*, 79(5),  
 584 922-928
- 585 Lapiere, H., Lobley, G. E. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *Journal*  
 586 *of Dairy Science*, 84, E223-E236. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70222-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70222-6)
- 587 Lefebvre, H. P., Dossin, O., Trumel, C., Braun, J. P. 2008. Fractional excretion tests: a  
 588 critical review of methods and applications in domestic animals. *Veterinary Clinical*  
 589 *Pathology*, 37(1), 4-20. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00010.x>
- 590 Leonardi, C.; Armentano, L. E. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay  
 591 on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 557-564.  
 592 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0)
- 593 Lessa, A. C. R., Madari, B. E., Paredes, D. S., Boddey, R. M., Urquiaga, S., Jantalia, C.  
 594 P., Alves, B. J. 2014. Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures

595 contribute differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. *Agriculture,*  
596 *Ecosystems & Environment*, 190, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.01.010>

597 Muhrer, M. E.; Harris, D. W.; Bloomfield. RA. 1968. A reacted NPN-carbohydrate  
598 complex from urea. In *Journal of Animal Science* (Vol. 27, No. 6, p. 1770). 1111 NORTH  
599 DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874: AMER SOC ANIMAL SCIENCE.  
600 <https://doi.org/10.2527/jas1968.2761755x>

601 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh*  
602 *Revised Edition*, 2001. Washington, DC: The National Academies Press.  
603 <https://doi.org/10.17226/9825>

604 Oba, M., Allen, M.S., 2003. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and  
605 ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. *Journal of Dairy*  
606 *Science*, 86, 1398–1404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73723-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73723-0)

607 Oliveira Junior, R. C. D., Pires, A. V., Fernandes, J. J. D. R., Susin, I., Santos, F. A. P.,  
608 Araújo, R. C. D., 2004. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas  
609 com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os parâmetros sanguíneos e o  
610 metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33, 738-  
611 748. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000300023>

612 Prestegaard-Wilson, J. M., Daley, V. L., Drape, T. A., Hanigan, M. D. 2021. A survey of  
613 United States dairy cattle nutritionists' practices and perceptions of reducing crude  
614 protein in lactating dairy cow diets. *Applied Animal Science*, 37(6), 697-709.  
615 <https://doi.org/10.15232/aas.2021-02179>

616 Roman-Ponce, H., Van Horn, H. H., Marshall, S. P., Wilcox, C. J., Randel, P. F. 1975.  
617 Complete rations for dairy cattle. V. Interaction of sugarcane bagasse quantity and form  
618 with soybean meal, urea, and Starea. *Journal of dairy science*, 58(9), 1320-1327.  
619 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84713-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84713-8)

620 Salami, S. A., Moran, C. A., Warren, H. E., Taylor-Pickard, J. 2021. Meta-analysis and  
621 sustainability of feeding slow-release urea in dairy production. *Plos one*, 16(2), e0246922.  
622 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246922>

623 Silveira, V. A., Lopes, N. M., Oliveira, R. C., Gonzales, B., Siqueira, A. V., Bier, L. P.  
624 P., Zoni, M. S.; Giardini, W.; Pereira, R. A. N.; Almeida, R. de; Pereira, M. N. 2012.  
625 Substituição parcial de farelo de soja por ureia de liberação lenta em rebanhos leiteiros  
626 comerciais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13, 383-395.  
627 <https://doi.org/10.1590/S1519-99402012000200008>

628 Souza, V. L., Almeida, R., Silva, D. F. F., Piekarski, P. R. B., Jesus, C. P., Pereira, M. N.  
629 2010. Substituição parcial de farelo de soja por ureia protegida na produção e composição  
630 do leite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 1415-1422.  
631 <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000600018>

632 Stiles, D. A., Bartley, E. E., Meyer, R. E., Deyoe, C. W., Pfost, H. B., 1970. Feed  
633 processing. VII. Effect of an expansion-processed mixture of grain and urea (starea) on  
634 rumen metabolism in cattle and on urea toxicity. *Journal of Dairy Science*, 53(10), 1436-  
635 1447. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86412-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86412-8)

636 Taylor-Edwards, C. C., Elam, N. A., Kitts, S. E., McLeod, K. R., Axe, D. E., Vanzant, E.  
637 S., Kristensen, N. B., Harmon, D. L., 2009b. Influence of slow-release urea on nitrogen  
638 balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. *Journal of Animal Science*,  
639 87(1), 209-221. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0913>

640 Thompson, L. H., Wise, M. B., Harvey, R. W., Barrick, E. R., 1972. Starea, urea and  
641 sulfur in beef cattle rations. *Journal of animal science*, 35(2), 474-480.  
642 <https://doi.org/10.2527/jas1972.352474x>

643 Virtanen, A. I. 1966. Milk Production of Cows on Protein-Free Feed: Studies of the use  
644 of urea and ammonium salts as the sole nitrogen source open new important perspectives.  
645 *Science*, 153(3744), 1603-1614. <https://doi.org/10.1126/science.153.3744.1603>

646 Wang, S., Copeland, L. 2013. Molecular disassembly of starch granules during  
647 gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. *Food & function*, 4(11),  
648 1564-1580. <https://doi.org/10.1039/c3fo60258c>

649 Williams, E. J. 1949. Experimental designs balanced for the estimation of residual effects  
650 of treatments. *Australian Journal of Scientific Research*, 2, 149-168.  
651 <https://doi.org/10.1071/CH9490149>

652 Wolff, I. A., Watson, P. R., Rist, C. E. 1953. Polysaccharide Aryl Carbamates. III.  
653 Tricarbanilates of Polyglucosans with Various Glucosidic Linkages1b. *Journal of the*  
654 *American Chemical Society*, 75(20), 4897-4899. <https://doi.org/10.1021/JA01116A004>

655

## TABLES AND FIGURES

657 Table 1. Proportion of particles retained on screens varying in mesh diameter (% of total),  
 658 geometrical mean particle size (GMPS), surface area, and concentrations of crude protein  
 659 (CP) and starch (% of dry matter) of extruded starch-urea 200 (ESU200) and 120  
 660 (ESU120)

		CP	Starch	CP/Starch
ESU200		209.9	18.0	11.7
3,500 $\mu\text{m}^1$	$2.2 \pm 0.85$	209.2	19.7	10.6
2,000 $\mu\text{m}$	$17.9 \pm 2.81$	212.3	21.8	9.7
1,180 $\mu\text{m}$	$25.8 \pm 1.90$	190.0	24.2	7.9
600 $\mu\text{m}$	$26.3 \pm 1.85$	189.0	24.8	7.6
300 $\mu\text{m}$	$14.0 \pm 2.00$	213.3	13.1	16.3
150 $\mu\text{m}$	$11.1 \pm 4.84$	241.0	6.9	34.9
Pan	$3.4 \pm 1.52$	229.7	6.8	33.8
GMPS, <sup>2</sup> $\mu\text{m}$	423			
Surface area, $\text{cm}^2/\text{g}$	52			
ESU120		138.0	38.1	3.6
3,500 $\mu\text{m}^3$	$8.2 \pm 1.55$	127.4	42.1	3.0
2,000 $\mu\text{m}$	$19.4 \pm 2.92$	127.8	41.9	3.0
1,180 $\mu\text{m}$	$23.4 \pm 1.09$	127.1	41.0	3.1
600 $\mu\text{m}$	$26.3 \pm 1.72$	131.8	49.9	2.6
300 $\mu\text{m}$	$12.6 \pm 1.92$	146.6	37.2	3.9
150 $\mu\text{m}$	$6.2 \pm 1.67$	190.6	14.9	12.8
Pan	$4.0 \pm 0.49$	205.9	13.1	15.7
GMPS, <sup>2</sup> $\mu\text{m}$	502			
Surface area, $\text{cm}^2/\text{g}$	52			

661 <sup>1</sup>Mean  $\pm$  standard deviation of 40 samples.

662 <sup>2</sup>Kansas State University: MF-2051. Baker & Herrman (2002).

663 <sup>3</sup>Mean  $\pm$  standard deviation of 12 samples.

664

665 Table 2. Composition of diets in ingredients and nutrients (% of dry matter) on treatments  
 666 control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded  
 667 starch-urea (ESU200).

	CTL	SBM	Urea	ESU200
<b>Ingredients</b>				
Corn silage	29.2	29.2	29.2	29.2
Sorghum silage	20.7	20.6	20.6	20.7
Tifton hay	2.0	1.9	2.0	1.9
Whole cottonseeds	10.2	10.2	10.2	10.2
Ensiled corn grain	15.0	15.0	15.0	15.0
Citrus pulp	4.9	1.2	4.3	4.1
SBM	14.5	18.4	14.5	14.5
Urea			0.6	
ESU200				0.8
Premix <sup>1</sup>	3.6	3.6	3.6	3.6
<b>Nutrients</b>				
CP <sup>2</sup>	16.4	18.1	18.0	18.1
CP from SBM	7.5	9.5	7.5	7.5
CP from urea			1.7	
CP from ESU200				1.8
NDF <sup>2</sup>	31.1	30.6	30.9	30.9
Forage NDF	21.9	21.8	21.8	21.8
Ether extract	4.5	4.5	4.5	4.5
Ash	5.6	5.6	5.5	5.6
Starch	27.9	27.8	27.8	27.8
Dry matter, % of as-fed	48.6	48.6	48.7	48.8

668 <sup>1</sup>24.7% limestone, 28.4% sodium bicarbonate, 6.2% magnesium oxide, 6.2% NaCl, 1.2%  
 669 Azomite, 2.5% urucum (*Bixa Orellana*), 12.3% autolysed yeast, and 19.8% minerals and  
 670 vitamins (18.5% Ca, 15.0% P, 3.0% Mg, 3.0% S, 240 ppm Co, 3.000 ppm Cu, 8.000 ppm  
 671 Mn, 12.000 ppm Zn, 90 ppm Se, 180 ppm I, 8.000 KUI/kg Vit.A, 2.000 KUI/kg Vit.D;  
 672 50 KUI/kg Vit.E).

673 <sup>2</sup>CP = Crude protein. NDF = Neutral detergent fiber.

674

675 Table 3. Composition of feed ingredients.

	% of as-fed	% of DM <sup>1</sup>				
	DM	CP <sup>1</sup>	Starch	Ash	NDF <sup>1</sup>	EE <sup>1</sup>
Corn silage	34.7	8.6	35.2	3.12	39.0	3.2
Sorghum silage	34.8	7.9	28.0	3.54	45.0	2.4
Tifton hay	90.9	11.0	0.4	7.19	60.0	1.9
Whole cottonseeds	92.6	27.7	4.0	4.04	50.3	18.6
Ensiled corn grain	62.2	9.0	74.8	1.60	9.0	4.2
Citrus pulp	89.9	8.6	3.3	7.09	23.9	2.9
Soybean meal	89.02	51.6	2.4	6.62	8.9	2.8
Urea	95.9	276.0		0.75		
Extruded starch-urea 200	90.9	222.0	18.7	0.37	5.0	

676 <sup>1</sup>DM = Dry matter. CP = Crude protein. NDF = Neutral detergent fiber. EE = Ether  
 677 extract.

678

679 Table 4. Particle size distribution (% retained on screens), geometrical mean particle size  
 680 (GMPS), and surface area of urea and extruded starch-urea (ESU200). Mean ± standard  
 681 deviation of 4 composite samples (1/period).

	Urea	ESU200
3,500 µm	34.4 ± 0.4	2.9 ± 0.4
2,000 µm	54.2 ± 6.9	19.9 ± 1.7
1,180 µm	7.5 ± 1.6	27.0 ± 0.1
600 µm	3.1 ± 1.1	25.2 ± 1.1
300 µm	0.5 ± 0.2	13.2 ± 0.8
150 µm	0.3 ± 0.01	7.6 ± 0.7
Pan	0.1 ± 0.03	4.2 ± 0.1
GMPS, <sup>1</sup> µm	1721	452
Surface area, <sup>1</sup> cm <sup>2</sup> /g	23	53

682 <sup>1</sup>Kansas State University: MF-2051. Baker and Herrman (2002).

683

684 Table 5. Dry matter intake (DMI), lactation performance, feed efficiency, body condition  
 685 score (BCS), and body weight (BW) on treatments control (CTL) and with additional  
 686 protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200)

	CTL	SBM	Urea	ESU200	SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
kg/d						
DMI	24.8	24.8	24.1	24.2	1.19	0.50
Milk	33.3	33.2	32.8	32.9	1.19	0.73
ECM <sup>2</sup>	32.6	33.7	32.7	31.6	0.98	0.06
Fat	1.190 <sup>ab</sup>	1.232 <sup>a</sup>	1.194 <sup>a</sup>	1.120 <sup>b</sup>	0.0400	0.03
Protein	1.055 <sup>b</sup>	1.114 <sup>a</sup>	1.079 <sup>ab</sup>	1.054 <sup>b</sup>	0.032	0.04
Casein	0.832	0.894	0.839	0.836	0.0266	0.08
Lactose	1.509	1.540	1.484	1.499	0.0589	0.55
Total solids	4.058	4.203	4.065	3.981	0.1260	0.18
% of milk						
Fat	3.64	3.70	3.57	3.44	0.129	0.16
Protein	3.22	3.30	3.22	3.23	0.074	0.59
Casein	2.62	2.63	2.43	2.61	0.073	0.14
Lactose	4.57	4.53	4.45	4.57	0.101	0.71
Total solids	12.38	12.45	12.10	12.20	0.245	0.54
Milk/DMI	1.32	1.29	1.31	1.31	0.041	0.89
ECM/DMI	1.29	1.31	1.30	1.26	0.043	0.45
BCS, 1 to 5	3.08	3.13	3.05	3.10	0.076	0.19
BW, kg	654	652	652	651	20.0	0.89

687 <sup>1</sup>Means in a row with differing superscripts differ at  $P \leq 0.05$  (Tukey). SEM = Standard  
 688 error of the means.

689 <sup>2</sup>ECM = Energy corrected milk.

690

691 Table 6. Milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N at 0,1.5, 3, 6, 9, 12,15 and 21 h post-  
 692 feeding, area under the curve (AUC), duration of PUN  $\geq$  21 mg/dL, N partition, urine N,  
 693 glomerular filtration rate (GFR) and the fractional rate of urea reabsorption (kRE) on  
 694 treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or  
 695 extruded starch-urea (ESU200)

	CTL	SBM	Urea	ESU200	SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
MUN, mg/dL	15.6 <sup>c</sup>	19.3 <sup>b</sup>	19.4 <sup>b</sup>	21.3 <sup>a</sup>	0.51	< 0.01
MUN, g/d	4.99 <sup>c</sup>	6.19 <sup>b</sup>	6.15 <sup>b</sup>	6.79 <sup>a</sup>	0.268	< 0.01
PUN, mg/dL						
0 h	19.6	23.2	21.6	21.3	1.03	0.09
1.5 h	20.1 <sup>b</sup>	24.5 <sup>a</sup>	22.2 <sup>ab</sup>	22.7 <sup>a</sup>	1.01	0.01
3 h	19.9 <sup>b</sup>	24.2 <sup>a</sup>	22.9 <sup>a</sup>	25.3 <sup>a</sup>	1.06	< 0.01
6 h	16.6 <sup>c</sup>	21.3 <sup>b</sup>	21.8 <sup>b</sup>	25.5 <sup>a</sup>	0.90	< 0.01
9 h	14.0 <sup>c</sup>	16.9 <sup>b</sup>	19.6 <sup>a</sup>	20.3 <sup>a</sup>	0.91	< 0.01
12 h	13.6 <sup>b</sup>	19.2 <sup>a</sup>	20.3 <sup>a</sup>	20.1 <sup>a</sup>	1.00	< 0.01
15 h	14.6 <sup>c</sup>	19.7 <sup>ab</sup>	17.4 <sup>b</sup>	20.7 <sup>a</sup>	0.95	< 0.01
21 h	19.3 <sup>b</sup>	23.8 <sup>a</sup>	24.0 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>	1.02	< 0.01
0-21 h, <sup>2</sup> mg/dL	17.1 <sup>c</sup>	21.6 <sup>ab</sup>	21.2 <sup>b</sup>	22.5 <sup>a</sup>	0.61	< 0.01
AUC, mg/dL/21 h	345 <sup>c</sup>	441 <sup>b</sup>	437 <sup>b</sup>	471 <sup>a</sup>	13.1	< 0.01
PUN $\geq$ 21, min/21 h	122 <sup>c</sup>	596 <sup>b</sup>	582 <sup>b</sup>	803 <sup>a</sup>	79.5	< 0.01
N partition, g/d						
Intake	679 <sup>b</sup>	749 <sup>a</sup>	725 <sup>a</sup>	737 <sup>a</sup>	29.1	< 0.01
Milk	167	171	165	166	5.7	0.39
Urine	246 <sup>b</sup>	274 <sup>b</sup>	317 <sup>a</sup>	300 <sup>ab</sup>	13.6	< 0.01
Feces	165	168	161	163	7.8	0.88
N partition, % of intake						
Milk	25.2 <sup>a</sup>	23.0 <sup>b</sup>	22.8 <sup>b</sup>	22.8 <sup>b</sup>	0.69	< 0.01
Urine	37.3 <sup>b</sup>	36.9 <sup>b</sup>	43.5 <sup>a</sup>	41.0 <sup>ab</sup>	2.10	0.05
Feces	24.6	22.7	22.3	22.4	1.00	0.29
Urine						
Urea-N, g/d	121 <sup>b</sup>	150 <sup>a</sup>	178 <sup>a</sup>	159 <sup>a</sup>	10.6	< 0.01
Urea-N/Total-N, %	51.8	54.4	60.3	57.2	6.11	0.78
GFR, mL/min/BW						
Creatinine	1811	1786	2136	1962	209.7	0.61
Urea	1119 <sup>b</sup>	1105 <sup>b</sup>	1431 <sup>a</sup>	1142 <sup>b</sup>	113.1	0.08
kRE, %/min	36.1	37.3	36.6	39.8	4.66	0.91

696 <sup>1</sup>Means in a row with differing superscripts differ at  $P \leq 0.05$  (Tukey). SEM = Standard  
 697 error of the means.

698 <sup>2</sup> $P < 0.01$  for time and  $P < 0.01$  for the interaction between treatment and time.

699 Table 7. Linear regressions between plasma urea nitrogen (PUN, mg/dL) at 0,1.5, 3, 6, 9, 12, 15 and  
 700 21 h post-feeding and milk urea nitrogen (MUN, mg/dL). PUN = Intercept + Slope MUN

	Intercept	Slope	r <sup>2</sup>	P-value
0 h	0.427	9.86	0.24	< 0.01
1.5 h	0.286	12.53	0.15	< 0.01
3 h	0.382	10.12	0.33	< 0.01
6 h	0.444	9.426	0.42	< 0.01
9 h	0.411	11.62	0.25	< 0.01
12 h	0.427	11.07	0.34	< 0.01
15 h	0.429	11.12	0.28	< 0.01
21 h	0.468	8.22	0.38	< 0.01
Mean 0 - 21 h	6.213	0.76	0.55	< 0.01

701

702

703 Table 8. Eating and rumination behaviors, intake during the day, and particle size sorting behavior on  
 704 treatments control (CTL) and with additional protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded  
 705 starch-urea (ESU200)

	CTL	SBM	Urea	ESU200	SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
min/d						
Eating	316	297	308	307	10.5	0.28
Rumination	479	458	469	475	16.0	0.59
Chewing <sup>2</sup>	790	754	776	785	20.8	0.31
min/kg DMI						
Eating	12.4	11.7	12.3	12.5	0.63	0.27
Rumination	19.4	18.0	19.0	19.1	0.85	0.21
Chewing	31.8	29.7	31.3	31.6	1.32	0.08
First meal duration, min	67.8 <sup>a</sup>	60.6 <sup>b</sup>	69.5 <sup>a</sup>	67.3 <sup>a</sup>	4.26	0.04
Meal frequency, meals/d	9.0	8.8	8.4	8.8	0.34	0.68
Meal duration, min/meal	37.9	38.1	41.2	39.2	7.05	0.49
Meal time, min/d	338	324	342	335	12.8	0.56
Meal size, kg/meal	2.7	2.8	3.1	2.7	0.15	0.17
% of daily intake						
0700 to 1300 h	46.9	42.6	41.9	42.9	2.43	0.10
1300 to 1900 h	41.8	42.0	40.7	41.0	1.58	0.91
1900 to 0700 h	11.6 <sup>b</sup>	15.3 <sup>ab</sup>	17.5 <sup>a</sup>	15.9 <sup>a</sup>	2.14	0.04
Observed/Predicted × 100% <sup>2</sup>						
0700 to 1300 h						
> 19 mm <sup>3</sup>	70	80	81	60	7.9	0.19
> 8 mm and < 19 mm	98 <sup>b</sup>	98 <sup>b</sup>	102 <sup>ab</sup>	106 <sup>a</sup>	2.0	0.02
< 8 mm	112	110	108	110	2.3	0.55
1300 to 1900 h						
> 19 mm	55	52	52	58	4.3	0.63
> 8 mm and < 19 mm	101	99	100	101	0.8	0.32
< 8 mm	119	119	119	118	1.6	0.86
1900 to 0700 h <sup>2</sup>						
> 19 mm	63	63	64	61	7.2	0.99
> 8 mm and < 19 mm	127	121	119	127	5.4	0.41
< 8 mm	70	80	81	60	8.1	0.19

706 <sup>1</sup>Means in a row with differing superscripts differ at  $P \leq 0.05$  (Tukey). SEM = Standard error of the  
 707 means.

708 <sup>2</sup>Eating + rumination

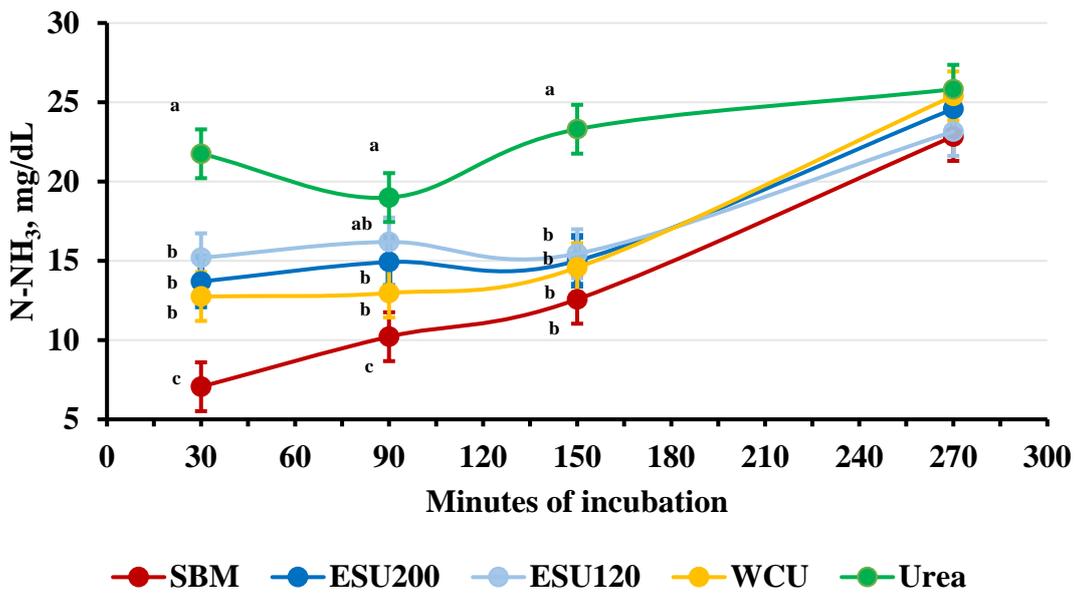
709 <sup>3</sup> < 100 % = rejection, > 100 % = preferential intake, 100 % = no selection. Sieves of the Penn State  
 710 Particle Separator

711 Table 9. Total-tract apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), and  
 712 crude protein (CP), digestible OM intake (DOMI), excretion of feces and urine, and  
 713 urinary allantoin excretion (Allan) on treatments control (CTL) and with additional  
 714 protein from soybean meal (SBM), urea, or extruded starch-urea (ESU200)

	CTL	SBM	Urea	ESU200	SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>
Digestibility, % of intake						
DM	69.6	69.5	70.3	69.8	1.29	0.97
OM	70.3	70.8	70.9	71.0	1.25	0.98
CP	75.4	77.3	77.7	77.6	1.00	0.28
DOMI, kg/d	16.5	16.6	16.1	16.2	0.88	0.69
Feces, kg DM/d	7.7	7.8	7.5	7.6	0.34	0.78
Urine, L/d	20.7	20.6	23.7	22.3	1.40	0.08
Allan, mmol/d	379	390	403	387	23.2	0.37
Allan/DOMI, mmol/kg	24.3	24.2	24.7	22.4	1.84	0.73

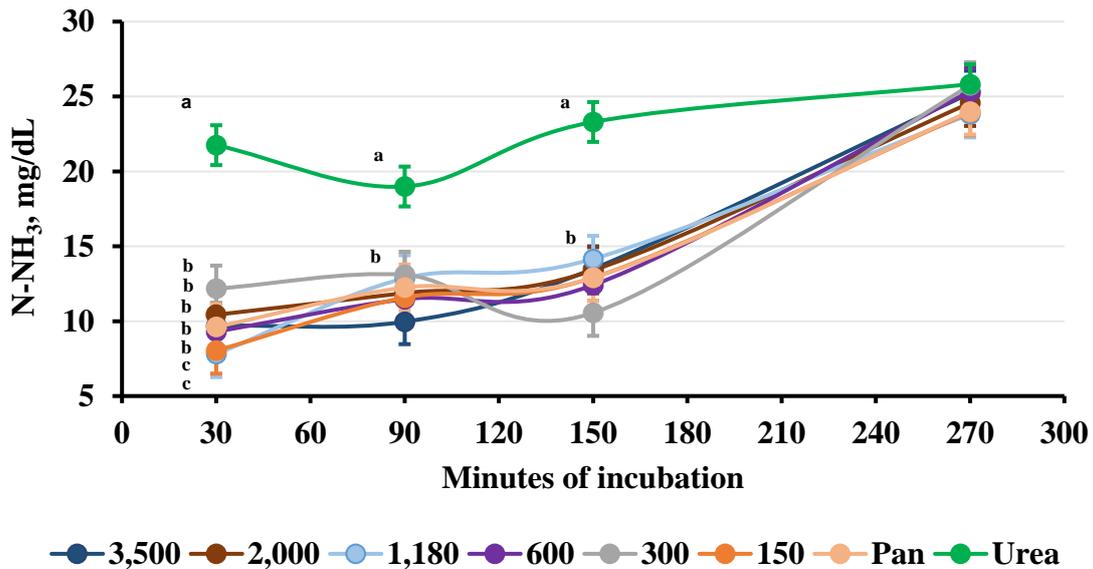
715 <sup>1</sup>Means in a row with differing superscripts differ at  $P \leq 0.05$  (Tukey).  
 716

717 A)



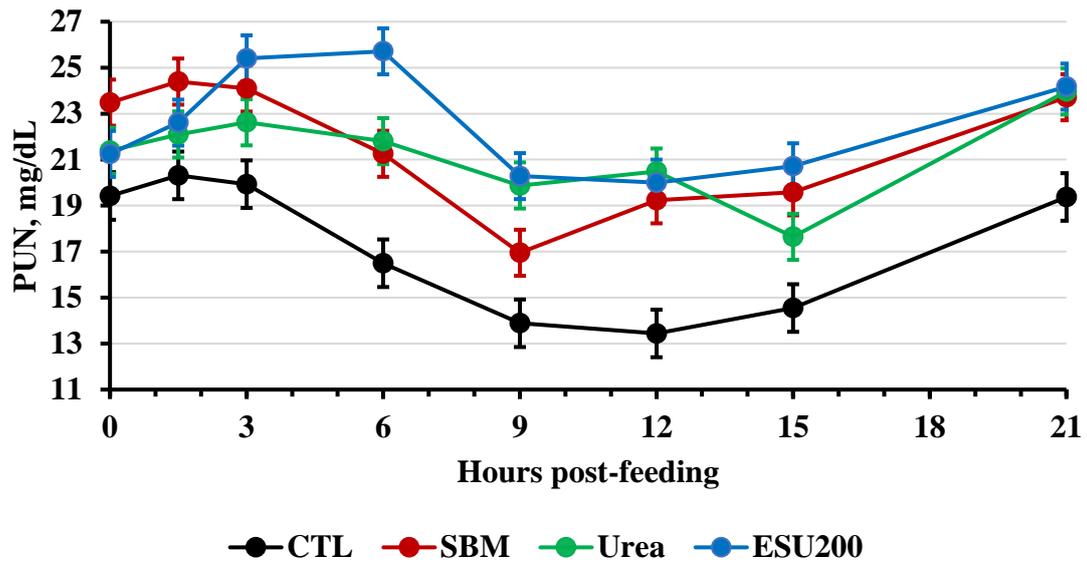
718

719 B)



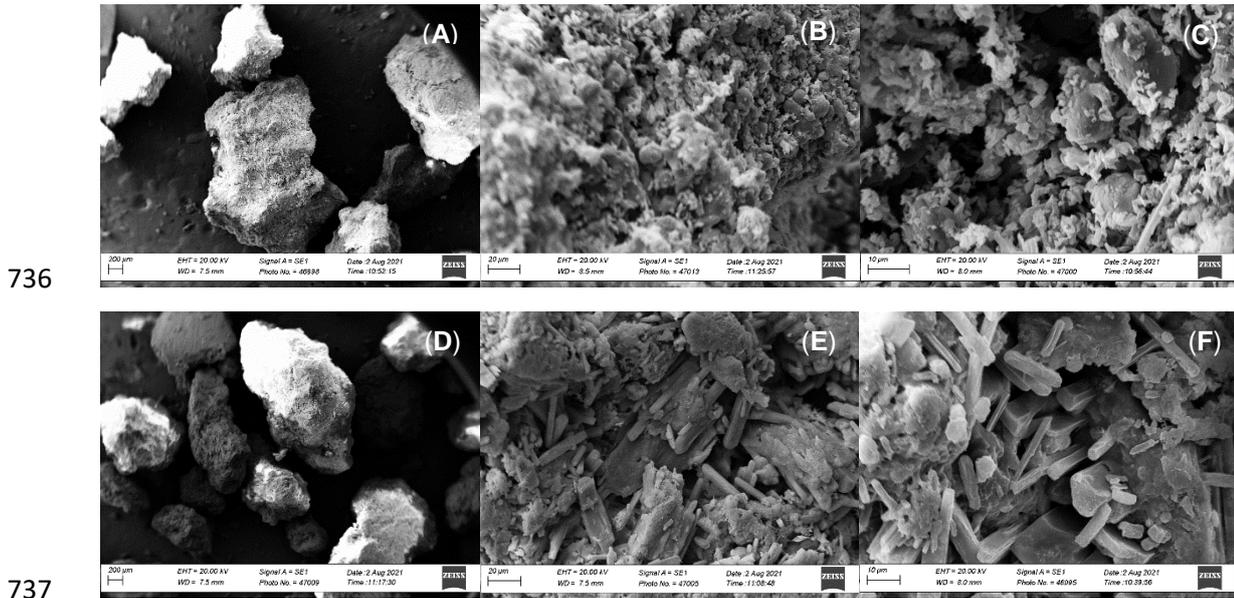
720

721 Figure 1: Ammonia-N (N-NH<sub>3</sub>) concentration in rumen fluid *in vitro*. A) Urea (●),  
 722 extruded starch-urea with 210% (ESU200. ●) and 138% (ESU120. ●) crude protein (CP),  
 723 wax-coated urea (WCU, 249% CP. ●), and soybean meal (SBM, 47.5% CP. ●). B)  
 724 Particles of ESU200 retained on screens with mesh diameters (μm) 3,500 (●), 2,000 (●),  
 725 1,180 (●), 600 (●), 300 (●), 150 (●), and pan (●). Samples were incubated isonitrogenous.  
 726 *P*-values: < 0.01 for treatment, < 0.01 for time, < 0.01 for the interaction between  
 727 treatment and time. Means with different superscripts differ at *P* ≤ 0.05 (Slice).



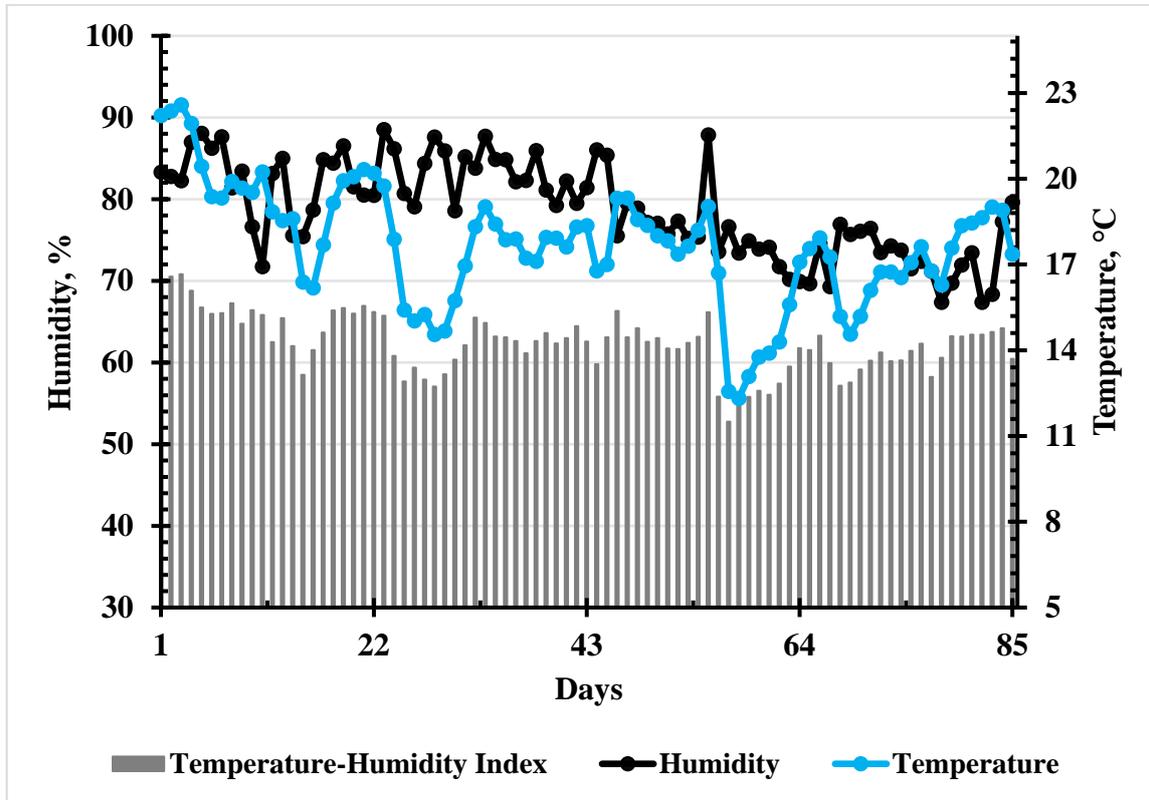
728  
 729 Figure 2. Plasma urea-N (PUN) over time on treatments control (CTL, ●) and with  
 730 additional protein from soybean meal (SBM, ●), urea (●), and extruded starch-urea  
 731 (ESU200, ●).  $P < 0.01$  for treatment,  $P < 0.01$  for time,  $P < 0.01$  for the interaction between  
 732 treatment and time. Cows were fed once per day at 07:00 h.  
 733

734 Figure 3: Scanning electron microscopy of extruded starch urea with 138% (A, B, C) and  
735 210% (D, E, F) crude protein in dry matter (47X, 1000X, 2700X, respectively).



## APÊNDICE A

### Índice de temperatura e umidade



Humidity (●), Temperature (●) and Temperature-Humidity Index (THI, ■) during experiment.

## APÊNDICE B

### Correlação linear entre Nitrogênio ureico leite (MUN) e Nitrogênio ureico plasma médio (PUN) (experimento com as vacas)

Linear correlation between milk urea-N (MUN) and plasma urea-N (PUN) on treatments control (●) and with supplemental protein from soybean meal (●), urea (●), and extruded starch-urea (●).  $PUN = 6.2127 + 0.7611 MUN$ ,  $r^2 = 0.55$ ,  $P < 0.01$ .

