DANIELA SILVA SOUZA

LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DA NUTRIÇÃO PROTEICA EM RUMINANTES

LAVRAS – MG
2026

DANIELA SILVA SOUZA

LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DA NUTRIÇÃO PROTEICA EM RUMINANTES

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora
Profa. Dra. Marina de Arruda Camargo Danes

LAVRAS – MG
2025

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

Souza, Daniela Silva.
Limitações metodológicas para o estudo da nutrição proteica em ruminantes. / Daniela Silva Souza. - 2026.
111 p. : il.

Orientadora: Marina de Arruda Camargo Danes

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Compostos nitrogenados. 2. Coprodutos. 3. Derivados de purina. 4. Vacas leiteiras. I. Danes, Marina de Arruda Camargo. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

DANIELA SILVA SOUZA

LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DA NUTRIÇÃO PROTEICA EM RUMINANTES

METHODOLOGICAL LIMITATIONS IN THE STUDY OF PROTEIN NUTRITION IN RUMINANTS

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 7 de maio de 2026.

Dr (a). Marina de Arruda Camargo Danes UFLA

Dr. Diogo Fleury Azevedo Costa ESALQ/USP

Dr. Alexandre Vaz Pires ESALQ/USP

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARINA DE ARRUDA CAMARGO DANES
Data: 07/07/2026 08:09:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Orientadora
Profa. Dra. Marina de Arruda Camargo Danes

LAVRAS – MG
2026

Aos meus pais Andreia e José Mauricio, que sempre me apoiaram em todas as decisões e estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Ao meu irmão João Mauricio, meu melhor amigo, a pessoa que sempre me incentiva a correr atras dos meus sonhos, não importando quão grande eles sejam.

A minha melhor amiga e irmã de coração Paola, que esteve ao meu lado durante toda a minha jornada acadêmica, por todo o carinho e nunca me deixando desistir.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por ter me guiado ao longo dessa jornada, pois sei que sem ele nada sou, me dando força nos momentos difíceis e me ajudando a superar todos os desafios da minha carreira acadêmica.

A minha família, em especial meus pais Andreia e Mauricio, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a seguir meus sonhos. Ao meu irmão João Maurício, por ter me dado apoio em todas as minhas decisões ao longo desses anos, desde a mudança de curso até a realização de um mestrado.

As minhas amigas Paola e Pollyana, que tive a honra de conhecer durante a graduação e se tornaram minhas melhores amigas. Elas foram essenciais para minha formação, tornando a graduação e o mestrado mais leve. Agradeço por todo amor e carinho.

Ao núcleo de estudos Grupo de Apoio à Pecuária Leiteira (UFLALEITE), por ter sido minha segunda família, em que me encontrei profissionalmente e pessoalmente. Por ter me proporcionado conhecimento teórico e prático ao longo dos anos, e todas as amizades que construí.

Ao grupo de pesquisa INPPAR (Inovação, Pesquisa e Pessoas para Alimentação de Ruminantes), onde encontrei minha paixão pela pesquisa, pelo apoio que mudou o rumo da minha vida e boa parte do meu futuro no mercado de trabalho, aos amigos que levarei para a vida.

Agradeço a à equipe do Laboratório Multiusuário de Pesquisa Animal, vinculado à Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, em especial aos técnicos que acompanharam ao longo da minha trajetória acadêmica, oferecendo apoio constante e contribuindo tanto durante a graduação quanto na condução dos meus experimentos de mestrado. Aos amigos de pesquisa, deixo meu agradecimento por tornarem os dias de trabalho mais leve, entre risadas, trocas de experiência e cafezinhos nos intervalos.

Agradeço de forma especial, aos técnicos Stefania e Antônio, pelo apoio incondicional, incentivo e paciência, sobretudo nos momentos mais desafiadores, não permitindo que eu desistisse no meio do processo. Vocês foram peças fundamentais para a minha formação acadêmica e profissional.

A minha orientadora, Prof.(a) Dr.(a) Marina de Arruda Camargo Danes, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade, incentivo e oportunidades. Agradeço pelas inúmeras vezes que me aconselhou profissionalmente e pessoalmente, que sem sombra de dúvidas, contribuíram de forma significativa para minha formação.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), professores e pesquisadores, por todo conhecimento compartilhado, que permitiu que pudesse hoje escrever esta dissertação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte concedido ao longo do percurso acadêmico.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro concedido à rede PROTEIOS: Nutrição Proteica de Animais de Produção (RED-00052-23).

Agradeço ao grupo de estudos Nutribov e a Esalq (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) que abriram as portas, contribuindo com conhecimentos e aprendizados para minha formação.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os envolvidos na minha carreira profissional e pessoal, que de alguma forma contribuíram na minha evolução.

Obrigada!

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.
(Josué 1:9)

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos”.
(Paulo Coelho)

RESUMO GERAL

O presente estudo foi desenvolvido a partir de dois experimentos. No primeiro o objetivo foi avaliar a degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína de coprodutos de grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), comparando com o principal ingrediente proteico em dietas de ruminantes, o farelo de soja. Foram avaliados quatro ingredientes proteicos: farelo de soja (alimento controle), DDG milho, DDG sorgo e DDG blend (milho e sorgo). A degradação ruminal da proteína foi avaliada pelo método in situ e a digestibilidade intestinal foi avaliada pelo método de três estágios in vitro. Para comparar os alimentos, as frações proteicas e a digestibilidade intestinal foram submetidas à análise de variância pelo PROC MIXED do pacote estatístico SAS 9.4. A concentração de PB (%MS) foi de 45,4% para FS, 35,0% para DG1, 37,8% para DG2 e 33,5% para DG3. A fração a foi menor para DG2 (29,0%) e FS (16,8%) em comparação com DG3 e DG1 (40,6% e 42,7%, respectivamente; $P < 0,01$), enquanto a fração c foi maior para DG2 (37,3%; $P < 0,01$) do que para FS (4,2%), DG1 (17,2%) e DG3 (24,4%). Todas as fontes de DDGS apresentaram menor fração b (33,8% para DG2, 35,0% para DG3 e 40,1% para DG1) em comparação ao FS (79,0%; $P < 0,01$). A taxa de degradação da fração b tendeu a diferir entre os alimentos ($P = 0,07$), sendo o menor valor observado para DG2 (4,8%), seguido por DG3 (6,1%), DG1 (6,5%) e FS (7,8%). A PNDR (%PB) foi maior para DG2 (56,8%; $P < 0,01$), em comparação com FS (37,4%), DG1 (38,0%) e DG3 (44,1%). Apesar disso, o FS apresentou a maior quantidade de PNDR digestível (35,8%; $P < 0,01$), seguido por DG3 (33,8%), DG1 (32,7%) e DG2 (17,7% da PB). Esse tipo de análise fornece uma base mais robusta para a comparação de custos entre ingredientes. Em vez de avaliar os ingredientes apenas com base em seu nutriente principal, essa abordagem permite uma avaliação mais abrangente da sua contribuição para a dieta. Esse entendimento é essencial para orientar a seleção de ingredientes, sua inclusão nas formulações e a determinação do real valor nutricional e econômico de cada ingrediente dentro da dieta. No segundo foi utilizado amostras compostas de urina provenientes de três vacas leiteiras, com o objetivo de avaliar os efeitos da diluição, tempo e tipo de armazenamento sobre a estabilidade dos compostos nitrogenados e derivados de purina, presentes na urina. Foram avaliados três tipos de diluição das amostras, submetidas a três tipos de armazenamento e analisadas para concentração de pH, N total, ureia, creatinina, ácido úrico e alantoína no momento da coleta (dia 0), e após 1, 7 e 15, 30 e 60 dias. As análises estatísticas foram realizadas utilizando modelos lineares mistos R (R Core Team), por meio dos pacotes lme4, lmerTest e emmeans. O pH foi significativamente influenciado pelo tempo, tipo de armazenamento e acidificação ($p < 0,01$), especialmente sob recongelamento. A

concentração de N total foi influenciada pelo tempo de armazenamento ($p < 0,01$), sem efeito da diluição, sendo a principal variação associada à volatilização ao longo do tempo. A ureia foi influenciada principalmente pelo tempo de armazenamento ($p < 0,01$), com maior estabilidade no freezer até 30 dias. A creatinina foi influenciada pelo tempo, acidificação e tipo de armazenamento ($p < 0,02$), apresentando maior estabilidade em geladeira no curto prazo e maior variabilidade em freezer recongelamento. A acidificação influenciou significativamente o ácido úrico ($p < 0,01$), principalmente sob refrigeração, enquanto que no congelamento não houve efeito. A concentração de alantoína foi influenciada pelo tempo, tipo de armazenamento e acidificação ($p < 0,01$). Os resultados deste estudo demonstram que a estabilidade dos compostos nitrogenados e derivados de purina na urina de bovinos é fortemente dependente das condições de armazenamento, do tempo e do nível de diluição da amostra, evidenciando que esses fatores devem ser cuidadosamente controlados para garantir a confiabilidade das análises.

Palavras - chave: compostos nitrogenados; coprodutos; derivados de purina; vacas leiteiras.

GENERAL ABSTRACT

This study consisted of two experiments. The first experiment aimed to evaluate the ruminal degradation and intestinal digestibility of protein from distillers dried grains with solubles (DDGS) coproducts compared with soybean meal (SBM), the primary protein ingredient used in ruminant diets. Four protein sources were evaluated: soybean meal (control feed), corn DDGS (DG1), sorghum DDGS (DG2), and a blended DDGS source derived from corn and sorghum (DG3). Ruminal protein degradation was assessed using the *in situ* technique, whereas intestinal digestibility was determined using the in vitro three-step procedure. Protein fractions and intestinal digestibility data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS 9.4. Crude protein (CP; % DM) concentrations were 45.4% for SBM, 35.0% for DG1, 37.8% for DG2, and 33.5% for DG3. Fraction a was lower for DG2 (29.0%) and SBM (16.8%) compared with DG3 and DG1 (40.6% and 42.7%, respectively; $P < 0.01$), whereas fraction c was greater for DG2 (37.3%; $P < 0.01$) than for SBM (4.2%), DG1 (17.2%), and DG3 (24.4%). All DDGS sources exhibited lower fraction b values (33.8% for DG2, 35.0% for DG3, and 40.1% for DG1) compared with SBM (79.0%; $P < 0.01$). The degradation rate of fraction b tended to differ among feed sources ($P = 0.07$), with the lowest value observed for DG2 (4.8%/h), followed by DG3 (6.1%/h), DG1 (6.5%/h), and SBM (7.8%/h). Rumen undegradable protein (RUP; % of CP) was greater for DG2 (56.8%; $P < 0.01$) than for SBM (37.4%), DG1 (38.0%), and DG3 (44.1%). However, SBM provided the greatest amount of digestible RUP (35.8% of CP; $P < 0.01$), followed by DG3 (33.8%), DG1 (32.7%), and DG2 (17.7% of CP). These results demonstrate that evaluating both ruminal degradation characteristics and intestinal digestibility provides a more robust basis for comparing feed ingredients than considering crude protein concentration alone. Such an approach enables a more comprehensive assessment of each ingredient's contribution to metabolizable protein supply and supports more accurate decisions regarding ingredient selection, dietary inclusion rates, and the determination of the true nutritional and economic value of feed ingredients in ruminant diets. The second experiment utilized composite urine samples obtained from three dairy cows to evaluate the effects of dilution level, storage duration, and storage method on the stability of urinary nitrogenous compounds and purine derivatives. Three sample dilution levels were evaluated under three storage conditions. Samples were analyzed for pH, total nitrogen, urea, creatinine, uric acid, and allantoin concentrations at collection (d 0) and after 1, 7, 15, 30, and 60 d of storage. Statistical analyses were conducted using linear mixed-effects models in R (R Core Team) with the lme4, lmerTest, and emmeans packages. Urine pH was significantly affected by storage

duration, storage method, and acidification treatment ($P < 0.01$), with the greatest changes observed under freeze–thaw conditions. Total nitrogen concentration was influenced by storage duration ($P < 0.01$) but was not affected by sample dilution, with most variation attributed to nitrogen volatilization over time. Urea concentration was primarily affected by storage duration ($P < 0.01$), remaining relatively stable when samples were stored frozen for up to 30 d. Creatinine concentration was influenced by storage duration, acidification, and storage method ($P < 0.02$), exhibiting greater stability under refrigeration during short-term storage and greater variability under repeated freeze–thaw cycles. Acidification significantly affected uric acid concentration ($P < 0.01$), particularly under refrigerated storage, whereas no significant effects were observed under frozen storage conditions. Allantoin concentration was influenced by storage duration, storage method, and acidification treatment ($P < 0.01$). Overall, the results demonstrate that the stability of nitrogenous compounds and purine derivatives in bovine urine is highly dependent on storage conditions, storage duration, and sample dilution level. These findings highlight the importance of carefully controlling sample handling and storage protocols to ensure the accuracy and reliability of laboratory analyses used to estimate nitrogen utilization and microbial protein synthesis in dairy cows.

Keywords: coproducts; dairy cows; nitrogenous compounds; purine derivatives.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

A crescente demanda por sistemas de produção animal mais eficientes e sustentáveis exige avanços tanto na formulação de dietas quanto na precisão das ferramentas de avaliação nutricional. Este estudo, teve como objetivo caracterizar a proteína dos principais ingredientes proteicos utilizados em dietas de vacas leiteiras, bem como avaliar a estabilidade dos compostos urinários relacionados ao metabolismo proteico sob diferentes técnicas de processamento da amostra. Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA). No aspecto social, este estudo permitiu identificar o melhor protocolo para armazenamento e diluição de amostras de urina, assim como caracterizar novas fontes proteicas a serem adicionadas parcialmente na dieta de bovinos, reduzindo os custos de produção e melhorando a eficiência das dietas. Do ponto de vista tecnológico, este estudo contribui para melhoria na eficiência do uso de nitrogênio na dieta um dos principais desafios da pecuária moderna, fornecendo subsídios para a padronização de métodos de coleta de urina. Além disso combinar fontes proteicas na dieta permite reduzir perdas, aumentar a eficiência produtiva e mitigar impactos como excreção de amônia e contaminação do solo e água. Sob a perspectiva econômica os resultados dos estudos podem contribuir para a redução de custos com alimentação com melhor aproveitamento de coprodutos da indústria de etanol, agregando valor a cadeia produtiva promovendo maior sustentabilidade econômica para os produtores rurais. Adicionalmente, o estudo trouxe insights sobre o aproveitamento da proteína nas dietas, garantindo maior confiabilidade nos indicadores utilizados na estimativa da síntese de proteína microbiana e do metabolismo proteicos em ruminantes, reduzindo vieses e aumentando a robustez dos dados experimentais.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC, AND CULTURAL IMPACTS

The increasing demand for more efficient and sustainable animal production systems requires advances in both diet formulation and the precision of nutritional evaluation tools. The objective of this study was to characterize the protein fraction of major feed ingredients used in dairy cow diets and to evaluate the stability of urinary compounds associated with protein metabolism under different sample processing techniques. The experiments were conducted at the Federal University of Lavras (UFLA). From a social perspective, this study identified optimal protocols for urine sample storage and dilution, as well as characterized alternative protein sources that can be partially included in cattle diets, contributing to reduced production costs and improved dietary efficiency. From a technological standpoint, the study contributes to improving nitrogen use efficiency in ruminant diets one of the main challenges in modern livestock systems by providing a basis for standardizing urine sampling methodologies. In addition, combining protein sources in the diet can reduce nutrient losses, enhance production efficiency, and mitigate environmental impacts such as ammonia excretion and soil and water contamination. From an economic perspective, the results support cost reduction in feed formulation through improved utilization of ethanol industry co-products, adding value to the production chain and promoting greater economic sustainability for producers. Furthermore, this study provides insights into protein utilization in ruminant diets, improving the reliability of indicators used to estimate microbial protein synthesis and protein metabolism, thereby reducing bias and increasing the robustness of experimental data.

3. INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas são macromoléculas compostas basicamente por cadeias lineares de aminoácidos (AA), sendo essenciais para a mantença, crescimento, reprodução e produção de leite. Nos ruminantes, a utilização dessas proteínas envolve processos complexos de degradação ruminal, síntese microbiana, e absorção intestinal e o metabolismo dos tecidos, os quais determinam a eficiência de uso no nitrogênio (EUN) pelo animal. As proteínas provenientes da dieta são inicialmente degradadas por microrganismos ruminais, resultando na formação de AA e amônia, que são reutilizados pelas bactérias para a síntese de proteína microbiana (Pmic). O perfil e quantidade de AA que chegam no intestino delgado (ID) são determinados pela composição da dieta e pelo consumo. Além disso, os microrganismos ruminais são capazes de utilizar fontes de nitrogênio (N), como a ureia para a síntese de Pmic, desde que haja disponibilidade de carboidratos fermentáveis (NASEM, 2021).

A proteína dietética é tradicionalmente expressa como proteína bruta (PB), calculada a partir do teor de N total do alimento (N x 6,25), considerando que, em média, as proteínas contêm 16% de N. Essa métrica representa o aporte total de N, incluindo tanto a proteína verdadeira (PV) quanto nitrogênio não proteico (NNP). A PV é composta por uma fração degradada no rúmen (PDR) e uma fração não degradada no rúmen (PNDR), enquanto o NNP é quase totalmente degradado no rúmen, sendo constituído por compostos como peptídeos, AA livres, ácidos nucleicos, nitratos, amidas, aminas e amônia. Dessa forma, o fornecimento adequado de N no rúmen é essencial para sustentar a atividade microbiana, garantindo digestão eficiente e consumo adequado, enquanto o suprimento de AA metabolizáveis é determinante para a produção de leite e de seus componentes (NRC, 2001).

Com o aumento do potencial produtivo dos rebanhos, a Pmic isoladamente deixa de atender às exigências de AA, tornando o aporte de PNDR e sua digestibilidade intestinal fatores críticos para a formulação de dietas mais precisas e eficientes. Neste cenário, a correta estimativa da degradação ruminal e da digestibilidade intestinal da proteína torna-se essencial para predizer o suprimento de AA ao animal (Gargallo Let al., 2006). Assim, a nutrição proteica evoluiu de uma abordagem baseada exclusivamente em PB para sistemas que consideram a dinâmica de degradação ruminal e o fluxo de proteína metabolizável (PM) ao intestino.

No entanto, a precisão dessas estimativas ainda é limitada pela escassez de informações específicas sobre a cinética de degradação ruminal e a digestibilidade intestinal da fração proteica dos ingredientes, especialmente no caso de coprodutos, cujas características variam amplamente em função do processamento. A utilização de valores provenientes de tabelas de

referência pode não representar adequadamente essa variabilidade, comprometendo a eficiência de utilização do N dietético e acurácia das recomendações nutricionais (Lee et al., 2015).

Além da caracterização dos ingredientes, a eficiência proteica em ruminantes depende da integração entre os processos digestivos e metabólicos. A Pmic representa a principal fonte de PM em ruminantes, a segunda fonte é a PNDR e em seguida a proteína endógena, enquanto o excesso de N absorvido é excretado na urina, na forma de ureia e derivados de purinas, como a alantoína e ácido úrico. Esses compostos refletem tanto a produção microbiana quanto o metabolismo nitrogenado sistêmico, sendo amplamente utilizados com indicadores indiretos da EUN. Dessa forma, a avaliação dos compostos urinários permite inferir sobre o destino metabólico do N e a eficiência de sua utilização pelo animal.

Animais mais eficientes e resilientes tendem a apresentar maior capacidade de sincronizar a oferta de energia e N no rúmen, otimizar a síntese de Pmic e minimizar perdas nitrogenadas, refletindo em menor excreção urinária e maior eficiência produtiva. No entanto, a interpretação desses indicadores depende da confiabilidade das metodologias utilizadas para quantificação dos compostos urinários, desde a coleta até o processamento e armazenamento das amostras.

Apesar dos avanços na nutrição de ruminantes, ainda há uma lacuna importante na integração entre caracterização nutricional dos ingredientes proteicos e as respostas metabólicas do animal, especialmente sob a perspectiva de eficiência e resiliência. Essa limitação dificulta a compreensão dos mecanismos que determinam a EUN, uma vez que informações sobre a degradação ruminal, da digestibilidade intestinal e metabolismo nitrogenado frequentemente são avaliadas de forma isolada.

Diante disso, o presente trabalho foi desenvolvido com dois objetivos complementares, visando integrar a caracterização nutricional dos ingredientes com as respostas metabólicas associadas ao uso do nitrogênio. No primeiro experimento, buscou determinar a degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína de coprodutos de grãos secos de destilaria com solúveis, comparando com o principal ingrediente proteico em dietas de ruminantes, o farelo de soja. No segundo experimento, o objetivo foi avaliar os efeitos da diluição, tempo e tipo de armazenamento sobre a estabilidade dos compostos nitrogenados e derivados de purina, presentes na urina. De forma integrada, esses experimentos visam contribuir para a compreensão dos mecanismos que determinam a EUN, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais precisas e para o avanço de modelos preditivos em sistemas de produção animal.

4. REFERÊNCIAS

Gargallo, S., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2006. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. J. Anim. Sci. 84:2163–2167.

Lee, C., F. Giallongo, A. N. Hristov, H. Lapierre, T. W. Cassidy, K. S. Heyler, G. A. Varga, and C. Parys. 2015. Effect of dietary protein level and rumen protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 98:1885–1902.

Nasem (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine) Nutrient Requirements of Dairy Cattle (8th rev. ed.), The National Academies Press, 2021.

National Research Council - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DE ALIMENTOS PROTEICOS UTILIZADOS EM DIETAS DE RUMINANTES.

Figura 1 – Esta imagem apresenta um esquema detalhado da produção de DDGS milho e sorgo. Adaptado por Souza, 2026.....37

ARTIGO 2: EFEITO DO PROCESSAMENTO E TEMPO DE CONGELAMENTO DAS AMOSTRAS DE URINA NAS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO METABOLISMO PROTEICO DE RUMINANTES.

Figura 1- Esta imagem apresenta um esquema detalhado do catabolismo de purinas em bovinos (Chen et al., 1990 e Verbic et al., 1990), com foco nas vias digestivas, metabólicas e de excreção da degradação de nucleotídeos, de purina e formação de derivados de purina. Adaptado por Souza, 2026.....63

Figura 2: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0832.....71

Figura 3: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em congelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0889.....71

Figura 4: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0682.....72

Figura 5: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,02),

armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P=0,51); Erro padrão da média 0,1332.....73

Figura 6: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,07) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0631.....74

Figura 7: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0548.....74

Figura 8: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,45) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0409.....76

Figura 9: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,95) e interação tempoxdiluição (P=0,93); Erro padrão da média 0,0885.....77

Figura 10: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,28) e interação tempoxdiluição (P=0,58); Erro padrão da média 0,0365.....78

Figura 11: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,91) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0769.....79

Figura 12: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,88) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0612.....79

Figura 13: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,52) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0617.....80

Figura 14: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 24,2007. 81

Figura 15: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,11) e interação tempoxdiluição (P<0,02); Erro padrão da média 441,0825. 82

Figura 16: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,03) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 36,6319. 83

Figura 17: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 486,5927. 83

Figura 18: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 133,5572.....84

Figura 19: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 129,0501. 84

Figura 20: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 2,8711. 86

Figura 21: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 3,5045. 87

Figura 22: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P=0,15); Erro padrão da média 2,0802. 88

Figura 23: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 2,3306. 88

Figura 24: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P=0,27); Erro padrão da média 3,7693. 89

Figura 25: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido

forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 2,7920. 89

Figura 26: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,3834. 92

Figura 27: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,10) e interação tempoxdiluição (P=0,11); Erro padrão da média 0,5787. 93

Figura 28: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P=0,21); Erro padrão da média 0,3924.....93

Figura 29: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,4055.....94

Figura 30: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,4759.....95

Figura 31: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,6393.....95

Figura 32: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 361,1588.....98

Figura 33: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 485,4712.....99

Figura 34: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 263,0464.....100

Figura 35: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 151,4889.....101

Figura 36: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 458,0528.....101

Figura 37: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 556,5155.....102

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DE ALIMENTOS PROTEICOS UTILIZADOS EM DIETAS DE RUMINANTES.

Tabela 1 - Teor de proteína bruta (PB) e de proteína não degradada no rúmen (PNDR) e parâmetros de degradação ruminal da proteína dos ingredientes avaliados.....41

Tabela 2 - Digestibilidade intestinal da matéria seca (MS) e da proteína bruta (PB) e da proteína não degradada no rúmen (PNDR) em % da MS e % da PB.....44

ARTIGO 2: EFEITO DO PROCESSAMENTO E TEMPO DE CONGELAMENTO DAS AMOSTRAS DE URINA NAS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO METABOLISMO PROTEICO DE RUMINANTES.

Tabela 1 – Recomendações práticas para armazenamento, acidificação e estabilidade de compostos nitrogenados e derivados de purina na urina.....111

LISTA DE SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
NASEM	National Academies of Sciences, Engineering and Medicine
NRC	National Research Council
UFLA	Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

Conteúdo **Pág. XXIII**

1. RESUMO GERAL....8
2. GENERAL ABSTRACT....10
3. INTRODUÇÃO GERAL....12
4. REFERÊNCIAS....14
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DE ALIMENTOS PROTEICOS UTILIZADOS EM DIETAS DE RUMINANTES.
5. RESUMO....28
6. ABSTRACT....29
7. INTRODUÇÃO....30
8. REFERENCIAL TEÓRICO....31
8.1 Evolução do conceito de proteína na nutrição de ruminantes 31
8.2 Proteína metabolizável e avanços nos modelos nutricionais....33
8.3 Métodos de avaliação da degradação ruminal....33
8.4 Padronização metodológica e cinética de degradação....35
8.5 Digestibilidade intestinal da proteína....35
8.6 Caracterização de ingredientes proteicos e coprodutos da indústria de etanol....36
9. MATRIAL E MÉTODOS....38
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO....41
11. CONCLUSÕES....46
12. REFERÊNCIAS....47
ARTIGO 2: EFEITO DO PROCESSAMENTO E TEMPO DE CONGELAMENTO DAS AMOSTRAS DE URINA NAS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO METABOLISMO PROTEICO DE RUMINANTES.
13. RESUMO....58
14. ABSTRACT....59
15. INTRODUÇÃO....60
16. REFERENCIAL TEORICO....62
16.1 Metabolismo do nitrogênio em ruminantes....62
16.2 Compostos nitrogenados urinários e sua origem metabólica....62

16.3 Importância e desafios da urina como ferramenta experimental.....64
16.4 Métodos de coleta de urina e uso da creatinina como marcador.....65
16.5 Métodos de conservação e limitações atuais.....65
17. MATRIAL E MÉTODOS.....66
17.1 Desenvolvimento do modelo.....66
17.2 Diluição das amostras de urina 67
17.3 Formas e tempos de armazenamento.....67
17.4 Analises químicas.....68
17.5 Analises estatísticas.....68
18. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....70
18.1 pH.....71
18.2 Nitrogênio total.....76
18.3 Ureia.....81
18.4 Creatinina.....85
18.5 Ácido úrico.....91
18.6 Alantoína.....97
19. CONCLUSÃO.....103
20. REFERÊNCIAS.....104
21. PROTOCOLO RECOMENDADO PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE URINA.....109
21.1 Recomendações geral de coleta.....109
21.1.1 Materiais de coleta.....109
21.1.2 Procedimento de coleta (*spot sample*).....109
21.1.3 Preparação da solução ácida.....110
21.1.4 Procedimentos imediato da amostra.....110
21.1.5 Cuidados adicionais.....110
21.2 Recomendação por composto.....110
21.3 Advertências metodológicas.....111
21.4 Recomendação para cada composto.....111

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE INTESTINAL DE ALIMENTOS PROTEICOS UTILIZADOS EM DIETAS DE RUMINANTES

RESUMO

A caracterização da degradação ruminal e da digestibilidade intestinal de alimentos proteicos é essencial para a formulação de dietas mais eficientes, econômicas e sustentáveis para ruminantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína de coprodutos de grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), comparando com o principal ingrediente proteico em dietas de ruminantes, o farelo de soja (FS). Quatro ingredientes proteicos foram utilizados no estudo: farelo de soja alimento controle, DDGS de milho (DG1), DDGS de sorgo (DG2) e blend de DDGS (milho e sorgo) (DG3). A degradação ruminal da proteína foi avaliada pelo método *in situ*. Em cada uma das três rodadas de incubação, os sacos de náilon foram incubados em duas vacas não lactantes por 0, 2, 4, 8, 16, 24, e 48 horas. As amostras dos alimentos antes da incubação e dos resíduos foram secas e analisadas para matéria seca (MS), matéria orgânica e proteína bruta (PB). Os resíduos dos sacos de 16 horas de incubação ruminal foram utilizados para avaliar a digestibilidade intestinal utilizando a técnica de três estágios in vitro. Para comparar os alimentos, as frações proteicas e a digestibilidade intestinal foram submetidas à análise de variância pelo PROC MIXED do pacote estatístico SAS 9.4, considerando os efeitos fixos de alimento e como aleatório a rodada de incubação. A concentração de PB (%MS) foi de 45,4% para FS, 35,0% para DG1, 37,8% para DG2 e 33,5% para DG3. A fração a foi menor para DG2 (29,0%) e FS (16,8%) em comparação com DG3 e DG1 (40,6% e 42,7%, respectivamente; $P < 0,01$), enquanto a fração c foi maior para DG2 (37,3%; $P < 0,01$) do que para FS (4,2%), DG1 (17,2%) e DG3 (24,4%). Todas as fontes de DDGS apresentaram menor fração b (33,8% para DG2, 35,0% para DG3 e 40,1% para DG1) em comparação ao FS (79,0%; $P < 0,01$). A taxa de degradação da fração b tendeu a diferir entre os alimentos ($P = 0,07$), sendo o menor valor observado para DG2 (4,8%), seguido por DG3 (6,1%), DG1 (6,5%) e FS (7,8%). A PNDR (%PB) foi maior para DG2 (56,8%; $P < 0,01$), em comparação com FS (37,4%), DG1 (38,0%) e DG3 (44,1%). Apesar disso, o FS apresentou a maior quantidade de PNDR digestível (35,8%; $P < 0,01$), seguido por DG3 (33,8%), DG1 (32,7%) e DG2 (17,7% da PB). Esse tipo de análise fornece uma base mais robusta para a comparação de custos entre ingredientes. Em vez de avaliar os ingredientes apenas com base em seu nutriente principal, essa abordagem permite uma avaliação mais abrangente da sua contribuição para a dieta. Esse entendimento é essencial para orientar a seleção de ingredientes, sua inclusão nas formulações e a determinação do real valor nutricional e econômico de cada ingrediente dentro da dieta.

Palavras-chave: in situ; in vitro; vacas leiteiras.

ABSTRACT

Characterization of ruminal protein degradation and intestinal digestibility of distillers dried grains with solubles (DDGS) is essential for developing more efficient, cost-effective, and sustainable ruminant feeding strategies. The objective of this study was to evaluate the ruminal degradation and intestinal digestibility of protein from DDGS sources compared with soybean meal (SBM), the primary protein supplement used in ruminant diets. Four protein ingredients were evaluated: soybean meal as the control feed, corn DDGS (DG1), sorghum DDGS (DG2), and a blended DDGS source containing corn and sorghum (DG3). Ruminal protein degradation was assessed using the *in situ* technique. In each of three incubation runs, nylon bags containing feed samples were incubated in two non-lactating cows for 0, 2, 4, 8, 16, 24, and 48 h. Feed samples before incubation and incubation residues were dried and analyzed for dry matter (DM), organic matter, and crude protein (CP). Residues collected after 16 h of ruminal incubation were used to determine intestinal digestibility using the in vitro three-step procedure. Protein fractions and intestinal digestibility were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS 9.4. Feed source was included as a fixed effect, and incubation run was treated as a random effect. Crude protein concentration (% DM) was 45.4% for SBM, 35.0% for DG1, 37.8% for DG2, and 33.5% for DG3. Fraction a was lower for DG2 (29.0%) and SBM (16.8%) than for DG3 and DG1 (40.6% and 42.7%, respectively; $P < 0.01$), whereas fraction c was greater for DG2 (37.3%; $P < 0.01$) than for SBM (4.2%), DG1 (17.2%), and DG3 (24.4%). All DDGS sources exhibited lower fraction b values (33.8% for DG2, 35.0% for DG3, and 40.1% for DG1) compared with SBM (79.0%; $P < 0.01$). The degradation rate of fraction b tended to differ among feeds ($P = 0.07$), with the lowest value observed for DG2 (4.8%/h), followed by DG3 (6.1%/h), DG1 (6.5%/h), and SBM (7.8%/h). Rumen undegradable protein (RUP; % of CP) was greater for DG2 (56.8%; $P < 0.01$) than for SBM (37.4%), DG1 (38.0%), and DG3 (44.1%). However, SBM provided the greatest amount of digestible RUP (35.8% of CP; $P < 0.01$), followed by DG3 (33.8%), DG1 (32.7%), and DG2 (17.7% of CP). This type of evaluation provides a more robust basis for comparing feed ingredient costs and nutritional value. Rather than assessing ingredients solely based on their primary nutrient concentration, this approach enables a more comprehensive evaluation of their contribution to metabolizable protein supply. Such information is essential for guiding ingredient selection, determining inclusion rates in diet formulations, and accurately assessing the nutritional and economic value of feed ingredients in ruminant production systems.

Keywords: dairy cows; in situ; in vitro.

7. INTRODUÇÃO

A avaliação da degradação ruminal e da digestibilidade intestinal de alimentos proteicos é fundamental para o adequado balanceamento de dietas para vacas leiteiras, uma vez que determina a eficiência de utilização do nitrogênio pelo animal e influencia diretamente o desempenho produtivo. Este processo envolve a avaliação da taxa e da extensão de degradação das frações proteicas no rúmen, representadas pela proteína degradada no rúmen (PDR), bem como da fração que escapa à fermentação ruminal e atinge o intestino delgado, denominada proteína não degradada no rúmen (PNDR), cuja digestibilidade intestinal influencia diretamente a oferta de proteína metabolizável (PM).

A nutrição proteica de ruminantes depende do equilíbrio entre as exigências dos microrganismos ruminais, atendidos pela PDR, e as exigências do próprio animal, supridas pela PM, a qual é composta pelas frações digestíveis da proteína microbiana (Pmic) e da PNDR. Nesse contexto, técnicas como a incubação *in situ* e métodos in vitro, têm sido amplamente utilizados para estudar esses parâmetros, permitindo a caracterização nutricional de ingredientes proteicos (Schwab e Broderick et al., 2017).

Alimentos como farelo de soja, farelo de canola, cevada, farelo de soja de baixa degradação ruminal e grãos secos de destilaria (DDG), apresentam variações na degradação ruminal da proteína e na digestibilidade intestinal, as quais são influenciadas por processos físicos e químicos aplicados aos ingredientes. No Brasil, o farelo de soja é amplamente utilizado devido ao seu elevado valor nutricional e ampla disponibilidade. De fato, em um levantamento realizado por Mapanzene et al. (2024), o farelo de soja esteve presente em 100% das fazendas leiteiras avaliadas. Entretanto, a crescente busca por alternativas nutricionais economicamente competitivas tem impulsionado o uso de coprodutos na dieta de vacas leiteiras, especialmente em regiões com ampla disponibilidade.

Estudos com vacas em lactação indicam que a substituição do farelo de soja por coprodutos do milho pode manter o desempenho produtivo (Christen et al., 2010; Oba et al., 2010; Carroll et al., 2023). O modelo NASEM (2021) reforça a importância da PM e dos aminoácidos (AA) pós-absortivos na nutrição de precisão. Assim, o uso exclusivo de valores de tabelas nutricionais pode comprometer a acurácia das formulações, destacando a necessidade de dados experimentais que considerem as especificidades de cada ingrediente para otimizar o desempenho animal e reduzir perdas nutricionais e ambientais.

No Brasil, a expansão da indústria de etanol de milho tem impulsionado o uso de coprodutos, como os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), que apresentam elevado

potencial para substituir parcialmente fontes proteicas convencionais no mercado nacional, aumentando sua utilização nas dietas de vacas leiteiras.

Apesar do crescente uso de DDGS na alimentação de vacas leiteiras no Brasil, ainda são escassas as informações sobre a composição química, a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal das fontes de DDGS nacionais, uma vez que grande parte dos dados disponíveis na literatura foi gerada a partir de coprodutos oriundos de plantas industriais norte-americanas, cujas características podem diferir daquelas observadas em coprodutos produzidos no Brasil em função das variações na matéria-prima e nos processos industriais. Essa limitação compromete a precisão das estimativas nutricionais e evidencia a necessidade de caracterizar fontes nacionais para subsidiar sistemas de alimentação mais precisos e adequados às condições brasileiras.

O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar a degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína e dos coprodutos de grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), comparando com o principal ingrediente proteico em dietas de vacas leiteiras, o farelo de soja.

Esse objetivo geral se agrega com objetivos específicos de:

- Comparar a degradação ruminal e a digestibilidade intestinal da matéria seca e proteína bruta de ingredientes proteicos utilizados nas dietas de ruminantes potencializando seu uso e reduzindo desperdícios.
- Comparar diferentes alimentos proteicos quanto a degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal, a fim de obter informações confiáveis para suprir o banco de dados dos modelos nutricionais e formular dietas mais precisas.

8. REFERENCIAL TEÓRICO

8.1 Evolução do conceito de proteína na nutrição de ruminantes

A avaliação da proteína em dietas de vacas leiteiras evoluiu significativamente nas últimas décadas, acompanhando o avanço do entendimento sobre o metabolismo ruminal e pós-absortivo dos nutrientes. Nas décadas de 1960 e 1970, estudos utilizando animais fistulados e técnicas de fluxo duodenal demonstraram que grande parte da proteína consumida é degradada pelos microrganismos ruminais em peptídeos, AA e amônia, através da ação de enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais, que utilizam esses componentes para multiplicação celular e síntese de Pmic (Broderick et al., 2010).

Inicialmente, os sistemas de alimentação, consideravam apenas no teor de PB dos alimentos, assumindo que toda a proteína ingerida era digerida e absorvida de maneira relativamente direta, semelhante ao observado em monogástricos (Das et al., 2014). No entanto, essa abordagem não considerava as diferentes frações da proteína e seus destinos no trato digestivo, pois nem toda a proteína ingerida desaparece do rúmen, parte dela escapa da fermentação ruminal e atinge o intestino delgado relativamente intacta. A partir dos anos de 1970 e 1990, surgiram sistemas sofisticados que passaram a fracionar a proteína em PDR e PNDR. Essa subdivisão proporcionou avanços significativos na formulação de deitas, permitindo maior eficiência na utilização do nitrogênio, redução de perdas ambientais e otimização dos custos com suplementação proteica (Arriola et al., 2014 e Tedeschi et al., 2015).

Posteriormente, os sistemas nutricionais evoluíram do conceito de PB para o conceito de PM, definido como o conjunto de AA absorvidos no intestino, preveniente da digestão intestinal da Pmic, da proteína não degradada no rúmen digestível no intestino e perdas endógenos (Schwab e Broderick et al., 2017). A Pmic passou então a ser reconhecida como uma das fontes, mas importantes de AA para ruminantes, devido ao seu elevado valor biológico e perfil de AA essências relativamente equilibrado (Sok et al., 2017). Modelos modernos de formulação de deitas, incorporam estimativas mais refinadas da degradação ruminal, síntese microbiana e digestibilidade intestinal dos AA (Hristov et al., 2019). Esses sistemas passaram a reconhecer que não apenas a quantidade, mas também o perfil e a disponibilidade intestinal de AA essenciais influenciam diretamente a produção e composição do leite.

Mais recentemente, a evolução do conceito de proteína na nutrição de vacas leiteiras passou para uma abordagem focada na cinética de degradação ruminal, pesquisadores observaram que diferentes alimentos apresentam distintas taxas e extensões de degradação ruminal (Hristov el al., 2019). A extensão da degradação da PB é influenciada pelo tempo de retenção do alimento no rúmen, pH ruminal e processamento do alimento. O aumento da taxa de passagem, normalmente associado ao maior consumo de matéria seca ou à redução do tamanho de partícula dos alimentos, diminui o tempo de retenção de alimento no rúmen, reduzindo a exposição da proteína à degradação microbiana e aumentando o fluxo de PNDR para o intestino delgado (Saussana et al., 2021).

O pH ruminal também exerce papel importante, pois pode alterar a solubilidade das proteínas, modificar a atividade da microbiota ruminal e afetar a digestão da fibra, interferindo indiretamente no acesso dos microrganismos às frações proteicas do alimento. O processamento térmico de grãos e seus coprodutos, podem reduzir a degradabilidade ruminal da proteína devido à formação de complexos entre proteínas e carboidratos, decorrentes da reação de

Maillard, além do aumento das ligações dissulfeto, que tornam a proteína menos acessível à ação microbiana. Dessa forma, esses processamentos são amplamente utilizados na indústria de alimentação animal com o objetivo de aumentar a fração da PNDR e reduzir perdas de N na forma de amônia ruminal (Iommelli et al., 2022).

Com isso, a nutrição proteica de vacas leiteiras deixou de ser baseada exclusivamente no teor de PB dos alimentos e passou a considerar a cinética de degradação ruminal, a sincronização entre N e energia fermentável, a eficiência microbiana e o perfil de AA absorvidos.

8.2 Proteína metabolizável e avanços nos modelos nutricionais

A partir dessa evolução conceitual, se consolidou o conceito de PM, que integra a contribuição da Pmic digestível e da fração digestível da PNDR, tornando a principal métrica para atender às exigências do animal (NASEM, 2021).

As recomendações de PDR passaram a ser estabelecidas em faixas específicas, entre 10% e 12% da MS da dieta (NASEM, 2021). No entanto, sistemas anteriores, como o NRC (2001), apresentavam limitações, incluindo a tendência de superestimar a PNDR e subestimar a PDR.

A revisão do NASEM (2021) ajustou esses parâmetros ao reduzir as taxas de passagem ruminal, impactando diretamente as estimativas de PNDR e alterando a composição do fluxo de proteína ao intestino delgado, com maior contribuição da Pmic e menor participação da PNDR. A redução no suprimento de PDR pode comprometer a síntese de Pmic e reduzir o consumo de MS (Firkins et al., 2006 e Titze et al., 2024), evidenciando a importância do equilíbrio entre frações proteicas na dieta.

8.3 Métodos de avaliação da degradação ruminal

Diversos métodos têm sido utilizados para avaliar a degradação ruminal e caracterizar os alimentos. Entre eles, se destaca a técnica *in situ*, também conhecida como técnica do saco de náilon. Essa técnica consiste na incubação de amostras de alimentos em sacos de material sintético diretamente no rúmen de animais canulados, permitindo a estimativa do desaparecimento do substrato ao longo do tempo (Orskov and McDonald, 1979; Stern et al., 1997; Hvelplund and Weisbjerg, 1998 e Mohamed and Chaudhry, 2008). Trata-se de uma das metodologias mais representativas das condições ruminais, embora não reproduza

completamente processos como mastigação, ruminação e dinâmica de passagem. A técnica permite estimar a taxa e a extensão da degradação da proteína, sendo amplamente utilizada na construção de modelos nutricionais. No entanto, sua aplicação exige o uso de animais canulados no rúmen e, em alguns casos, no duodeno, dependendo da variável estudada (Saussana et al., 2021).

Apesar de sua ampla utilização, essa metodologia apresenta limitações, como a variabilidade entre animais e entre condições experimentais, além da possível contaminação das amostras por Pmic (Nocek, 1988), especialmente em alimentos com baixo teor proteico. A degradação ruminal também está associada à composição da dieta, sendo influenciada pela participação de volumosos e pela sincronia entre a degradação de carboidratos e proteínas (Souza et al., 2000; Ítavo et al., 2002 e Balsalobre et al., 2003).

Para garantir que a técnica *in situ* forneça resultados confiáveis alguns fatores devem ser observados, como a qualidade e a porosidade dos sacos de náilon utilizados, devemos pensar nesses poros como pequenas peneiras (Saussana et al., 2021). Dessa forma, é muito importante que a porosidade esteja com um tamanho adequado permitindo a entrada de microrganismos no interior dos sacos para a degradação do alimento, que os produtos finais desse processo saiam e que as partículas que ainda não foram degradas permaneçam dentro. A faixa de 45 a 50 µm é o padrão recomendado, pois, de acordo com (Van Hellen e Ellis, 1977), essa dimensão garante a entrada e saída certa, minimizando as perdas de amostra. Porém essa recomendação tradicional vem sendo discutida em alguns estudos nacionais e internacionais. Segundo Hvelplund e Weisbjerg, (2000) recomendam a utilização de sacos de náilon com porosidade entre 30 a 50 µm para estudos de degradação *in situ* da PB.

Além disso, a qualidade do material, a definição do número e dos horários de incubação depende do tipo de alimento a ser avaliado. Por exemplo, pesquisadores como (Ørskov et al., 1988) constataram que tempos como 2, 6, 12, 24 e 36 horas são suficientes para a maioria dos ingredientes. Já Pires et al. (2010) usaram uma sequência diferente (0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas), adaptando a metodologia às características específicas de suas amostras, sendo os sacos colocados em tempos diferentes para serem retirados todos ao mesmo tempo do rúmen, promovendo uma lavagem uniforme dos sacos retirados do rúmen. Com o objetivo de uniformizar os procedimentos experimentais utilizados na avaliação da degradação ruminal, o NASEM (2021) recomenda que as amostras sejam incubadas em sacos de náilon com porosidade de 50 µm durante os tempos de 0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 horas. Essa metodologia foi utilizada no presente estudo para estimar os parâmetros de degradação ruminal da proteína dos ingredientes avaliados.

Após a incubação, a etapa de lavagem é essencial para remover partículas externas e contaminação microbiana. A presença de nitrogênio microbiano nos resíduos pode levar à subestimação da degradabilidade, especialmente em alimentos com baixo teor de proteína e alto teor de fibra, além de comprometer a estimativa dos parâmetros cinéticos (Guevara-Gonzáles et al., 2013 e Kamoun et al., 2014). Isso nos mostra que não existe uma fórmula única para análise *in situ*, a necessidade de adaptação existe para que o método reflita a realidade e não apenas a um protocolo fixo (Volden, 2011 e Van Duinkerken et al., 2011).

8.4 Padronização metodológica e cinética de degradação

Para garantir maior consistência entre estudos, o NASEM (2021) estabeleceu protocolos padronizados para incubação *in situ*, como citado anteriormente, permitindo a estimativa das frações *a*, *b* e *c* e da taxa de degradação (kd). A fração a corresponde à proteína solúvel, desaparecendo imediatamente, a fração *b* representa a fração potencialmente degradável e a fração c corresponde à fração não degradável. A partir dessas frações e da taxa de passagem ruminal, é possível estimar os valores de PDR e PNDR.

$$PDR = (a \times 0{,}936) + b \times (kd/(kd+kp))$$

$$PNDR = (a \times 0{,}064) + b \times (kp/(kd+kp)) + c$$

Essas equações consideram que parte da fração solúvel escapa da degradação ruminal e que a fração *b* pode desaparecer tanto por degradação quanto por passagem. Estudos demonstram que o tempo ideal de incubação pode variar entre ingredientes, sendo inadequado o uso de tempos fixos para todos os alimentos (Menezes et al., 2017; Menezes et al., 2019).

8.5 Digestibilidade intestinal da proteína

A digestibilidade intestinal dos nutrientes é tão importante quanto sua composição química. O método mais representativo para determinação da digestibilidade é o ensaio in vivo, que envolve a mensuração do consumo e da excreção fecal. No entanto, esse método apresenta limitações operacionais, incluindo necessidade de animais individualizados e alta complexidade experimental.

Como alternativa, métodos in vitro foi desenvolvido para simular o processo digestivo. Entre eles, se destaca a técnica dos três estágios, descrita por (Calsamiglia et al., 1995) e adaptada por (Gargallo et al., 2006), amplamente utilizada no banco de dados do (NASEM, 2021).

Essa metodologia consiste em três etapas: incubação ruminal por 16 horas, representando o material que escapa da degradação ruminal e atinge o duodeno (estágio 1), esse tempo de incubação corresponde a uma taxa de passagem aproximada de 6%/h, compatível com tempo médio de retenção do saquinho de 16 horas no rúmen. Digestão ácida onde o resíduo remanescente é exposto a uma solução de pepsina e HCl (pH ácido) por uma hora a 39°C, com o objetivo de reproduzir a digestão ácida no abomaso. E digestão enzimática, onde a solução ácida é substituída por uma solução de pancreatina, contendo um mix de enzimas pancreáticas e a incubação é realizada por 24 horas a 39°C, simulando o processo de digestão enzimática no intestino delgado. Essas três etapas são responsáveis por simular as condições do rúmen, abomaso e intestino delgado. Esses métodos permitem estimativas comparáveis entre alimentos, sendo amplamente utilizados em pesquisas e sistemas de formulação.

8.6 Caracterização de ingredientes proteicos e coprodutos da indústria de etanol

Alimentos proteicos apresentam variações significativas em sua composição afetando a degradação ruminal e digestibilidade intestinal, influenciadas por características intrínsecas e por processos tecnológicos aplicados aos ingredientes. Nos sistemas de produção de ruminantes, a alimentação representa entre 50 a 70% dos custos totais, tornando a caracterização dos ingredientes uma ferramenta essencial para aumentar a eficiência produtiva e econômica (NASEM, 2021).

Os coprodutos de agroindústrias têm sido amplamente estudados e utilizados como alternativas aos ingredientes convencionais, principalmente devido ao seu potencial de redução de custos. Entre esses coprodutos, destacam-se os grãos secos de destilaria (DDG), que vem ganhando espaço na alimentação de vacas leiteiras no Brasil por apresentarem elevado valor proteico e energético (Lee et al., 2016). O DDG é um coproduto derivado principalmente do milho durante a produção de etanol, sendo considerado uma alternativa estratégica ao farelo de soja (Boila et al., 1994; Iram et al., 2019 e Polizel e Soares, 2021).

O avanço recente da produção de etanol de milho no Brasil tem impulsionado a oferta desses coprodutos. De acordo com a Conab, na safra 2025/26 cresceu 29,8% na comparação coma safra 2024/25, na produção de etanol de milho, refletindo o avanço tecnológico em regiões como Centro-Oeste e Sul, onde há maior disponibilidade de matéria-prima e infraestrutura adequada. Esse cenário favorece a crescente utilização do DDG na formulação de dietas para bovinos, consolidando seu papel no sistema produtivo.

Além do crescimento da oferta, diversos estudos têm demostrado que a inclusão de DDG nas dietas pode aumentar a produção de leite, melhorar a eficiência alimentar e reduzir custos (Paz et al., 2013 e Kleinschmit et al., 2007). Dietas contendo entre 10 a 20% de DDG na MS apresentam boa aceitabilidade pelos animais, sem comprometer a digestibilidade dos nutrientes. Esses resultados evidenciam os avanços no uso desse ingrediente como alternativa nutricional viável.

Entretanto, apesar do crescente interesse pelo DDG, ainda existem limitações importantes para sua adequação e utilização. O DDG tem sido amplamente utilizado na alimentação de bovinos em países como Estados Unidos, Argentina e Paraguai, sendo uma importante fonte de proteína e energia (Prado et al., 2022). Como citado anteriormente, com a expansão da indústria de etanol de milho no Brasil tem impulsionado a disponibilidade desse coproduto no mercado nacional, apesar do crescente interesse pelo DDG ainda há escassez de informações sobre a composição química e o valor nutricional desse coproduto, devido ao fato de serem altamente variáveis, principalmente em função das diferenças nos processos industriais, nas condições de secagem e no tipo de grão utilizado (Spiehs et al., 2002). Essa variabilidade impacta diretamente a degradação ruminal da proteína e a fração de PNDR, tornando necessária uma caracterização mais detalhada da cinética de degradação desses ingredientes (Westreicher-Kristen et al., 2013).

O processo de produção de DDG envolve etapas de moagem, liquefação, fermentação e destilação, originando diferentes coprodutos, como WDG, DDG e DDGS (figura 1).

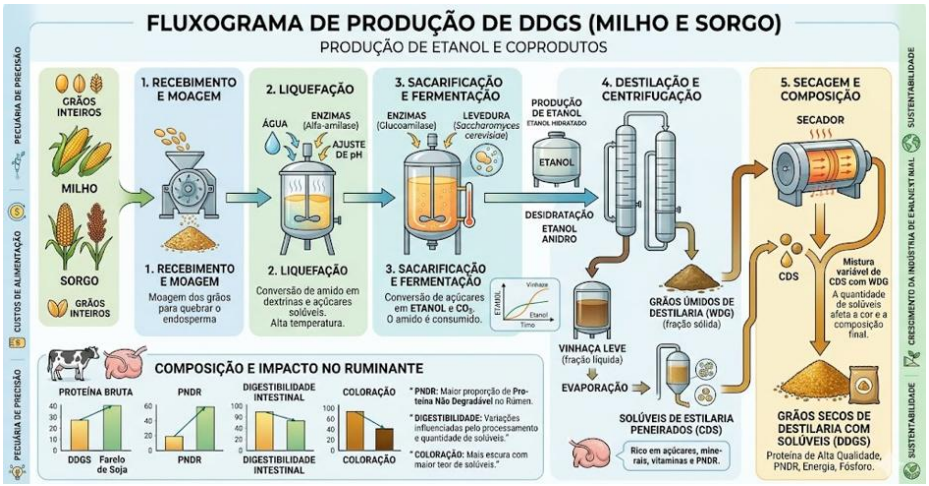


Figura 1: Esta imagem apresenta um esquema detalhado da produção de DDGS milho e sorgo. Adaptado por Souza, 2026.

A inclusão da fração solúvel (DDGS) altera significativamente a composição nutricional, aumentando a concentração de proteína, lipídeos e compostos derivados da

fermentação. Essas alterações influenciam tanto as características físicas quanto nutricionais do ingrediente, incluindo coloração e perfil de AA. Dessa forma, os grãos de destilaria apresentam maior concentração da proteína, lipídeos e fibra em comparação ao grão de origem (Klopfenstein et al., 2008 e Castro-Pérez et al., 2014), sendo reconhecidos por apresentarem maior proporção de PNDR em relação ao farelo de soja. Essa característica decorre do fato de que a fração mais degradável da proteína é utilizada durante a fermentação (Klopfenstein et al., 2008). No entanto, essa mesma característica pode alterar a cinética de degradação ruminal da proteína e da MS (Lee et al., 2016), influenciando o suprimento de AA metabolizáveis.

Nesse cenário, diferentes matérias-primas utilizadas na produção de etanol podem intensificar ainda mais a variabilidade nutricional dos DDG (Kleinschmit et al., 2007). O sorgo, por exemplo, tem se destacado como alternativa ao milho devido à sua maior tolerância à seca e menor custo de produção (Pancini et al., 2021). No entanto, O DDGS de sorgo apresenta diferenças importantes em relação ao de milho, como teor de amido (2 a 3% vs. 8%) e lipídeos, e maior concentração de fibra (Jaworski et al, 2015) resultando em menor densidade energética (Stein e Schurson, 2009 e May et al., 2010).

Essas diferenças sugerem que o desempenho animal e a eficiência de utilização dos nutrientes podem variar significativamente entre fontes de DDGS. No entanto, os resultados sobre a caracterização do DDGS de sorgo ainda são limitados e, muitas vezes, inconclusivos, especialmente no contexto de dietas para vacas leiteiras.

Além disso, fatores logísticos e a necessidade de maior capacitação técnica ainda representam desafios para a adoção ampla desse ingrediente, principalmente em regiões distantes dos polos produtores.

Dessa forma, embora os avanços na utilização de DDG demonstrem seu potencial como fonte proteica e energética, as limitações associadas à variabilidade de composição e à escassez de informações sobre diferentes matérias-primas, como o sorgo, evidenciam a necessidade de estudos que avaliem de forma integrada a degradação ruminal e a digestibilidade intestinal da proteína.

9. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Corte e no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, entre os meses de junho e setembro de 2025. Os procedimentos experimentais

foram aprovados pelo Comitê de Bioética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Lavras, protocolo 035/23.

Foram utilizadas duas vacas da raça Tabapuã, canuladas no rúmen, com peso corporal médio de 486 ± 12 kg. Os animais foram alojados em baias individuais, com área aproximada de 20 m², piso de concreto, cocho e bebedouro, garantindo acesso irrestrito à água. Antes do início da fase experimental, foi realizado um período de adaptação de sete dias às instalações, ao manejo e à dieta basal, composta por volumoso e concentrado na proporção de 91:9 (com base na matéria seca). A mesma dieta foi mantida durante todo o experimento, uma vez que o objetivo do estudo não foi avaliar o efeito da dieta, mas sim caracterizar a degradabilidade ruminal dos ingredientes proteicos incubados.

O número de animais foi definido com base na capacidade ruminal do animal, uma vez que os animais atuaram como unidades experimentais para a técnica *in situ*. Ensaios preliminares indicaram que cada animal comportava aproximadamente 160 sacos de náilon (10 x15 cm), sem comprometer a dinâmica ruminal ou a recuperação das amostras.

Foram avaliados quatro ingredientes proteicos: farelo de soja (FS) utilizado como alimento controle, DDGS de milho (DG1), DDGS de sorgo (DG2) e uma mistura de DDGS de milho e sorgo DDGS (DG3). A degradabilidade ruminal da proteína foi estimada por meio do método *in situ*. Para isso, as amostras dos ingredientes foram previamente moídas em moinho (TECNAL – Macro moinho tipo Willey – R-TE-650/1) equipado com peneira com crivo de 2 mm e acondicionadas em sacos de náilon com dimensão de 10 × 15 cm e com porosidade de 50 μm. A escolha dos sacos de náilon foi baseada em avaliações preliminares que consideraram a resistência do material, a integridade durante a incubação ruminal e a capacidade de retenção das partículas dos ingredientes avaliados, minimizando perdas físicas e garantindo maior confiabilidade nas estimativas de degradação ruminal.

Os sacos foram incubados no rúmen das duas vacas não lactantes nos tempos de 48, 24, 16, 8, 4, 2 e 0 horas, utilizando a técnica de retirada simultânea. Nesse procedimento, os sacos foram introduzidos em momentos distintos e removidos simultaneamente ao final do período experimental, com o objetivo de padronizar a etapa de lavagem e minimizar possíveis variações decorrentes do processamento das amostras. O ensaio foi realizado em três rodadas de incubação independentes, com intervalo de 24 horas entre cada rodada, de forma a respeitar a capacidade de incubação ruminal dos animais e garantir a adequada distribuição dos sacos no ambiente ruminal.

As amostras referentes ao tempo (0 h) não foram incubadas no rúmen. Esses sacos foram guardados até o momento da hora zero e adicionados aos demais antes da etapa de lavagem

utilizada para as amostras incubadas. Após a retirada do rúmen, todos os sacos foram imediatamente imersos em água gelada por 20 minutos para interromper a atividade microbiana. Em seguida, foram lavados manualmente em água corrente até que a água de lavagem se apresentasse límpida, indicando a remoção dos resíduos solúveis e partículas não aderidas.

Posteriormente, os sacos foram acondicionados em peneiras para drenagem do excesso de água e distribuídos em bandejas de alumínio, sendo então levados à estufa de ventilação forçada de ar para secagem a 55°C por 48 horas. Os resíduos obtidos foram posteriormente compostos por ingrediente, tempo de incubação e animal, formando uma amostra representativa de cada tratamento para as análises subsequentes. As amostras dos alimentos antes da incubação e os resíduos obtidos foram analisados quanto aos teores de MS, PB e matéria orgânica (MO). Os dados de desaparecimento da PB ao longo dos tempos de incubação foram ajustados a um modelo exponencial para estimativa das frações *a* (solúvel), *b* (potencialmente degradável), *c* (não degradável) e da taxa de degradação da fração *b* (kd).

A PNDR foi calculada de acordo com a equação do NASEM (2021):

$$PNDR = (a \times 0{,}064) + b \times (kp/(kd+kp)) + c$$

Onde:

- *a* é a fração solúvel (o que desaparece na lavagem dos sacos de náilon);
- *b* é a fração potencialmente degradável da PB (é calculado por diferença (100 - fração *a* - fração *c*));
- *c* é a fração não degradável (é a proteína que ainda está no saco de náilon após 48 horas de incubação ruminal) e,
- kp é a taxa de passagem de concentrados (valor fixo de 5,28%/h).

Os resíduos obtidos após 16 horas de incubação ruminal foram utilizados para estimativa da digestibilidade intestinal da MS e PB, utilizando a técnica *in vitro* descrita por Gargallo et al. (2006). As amostras foram alocadas em sacos de náilon (10 × 5 cm; porosidade de 50 µm), submetidas à digestão ácida com solução de HCl e pepsina (Sigma P-700), sob rotação constante a 39 °C por 1 hora, em incubadora *in vitro* Tecnal (TE-150). Após a lavagem com água destilada, os sacos foram incubados em solução de pancreatina (Sigma P-7545), também sob agitação constante a 39 °C, por 24 horas. Em seguida, os sacos foram lavados até a obtenção de água limpa, secos em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 48 horas, e os resíduos analisados quanto ao teor de nitrogênio por combustão.

A digestibilidade intestinal foi calculada de acordo com a PB ou MS que desapareceu no ensaio *in vitro*. A PNDR digestível (PNDRd, como % PB e como % MS) de cada alimento foi calculada pela multiplicação do valor de PNDR e da digestibilidade intestinal da PB.

Os dados referentes às frações proteicas *a*, *b*, *c*, kd, PNDR, e à digestibilidade intestinal da MS e PB de cada alimento foram analisadas utilizando o procedimento MIXED do software estatístico SAS (versão 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando como efeitos fixos o tipo de ingrediente e como efeito aleatório a rodada de incubação. Comparações múltiplas de médias foram realizadas, sendo considerados significativos os efeitos com $P < 0,05$, as tendências foram declaradas em $0,05 < P < 0,10$.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os DDGS são conhecidos como uma importante fonte de energia e proteína bruta para a alimentação de ruminantes, sendo uma boa fonte de PNDR. Além disso, a incorporação da fração solúvel durante o processamento pode influenciar significativamente as características físicas e nutricionais desses coprodutos (Belyea et al., 2004; Kleinschmit et al., 2007; Westreicher-Kristen et al., 2012; Liu, 2012). A tabela 1 apresenta os parâmetros da cinética ruminal da proteína dos ingredientes avaliados.

Tabela 1. Teor de proteína bruta (PB) e de proteína não degradada no rúmen (PNDR) e parâmetros de degradação ruminal da proteína dos ingredientes avaliados.

Item	Farelo de soja	DDGS milho	DDGS sorgo	DDGS blend	EPM	*P valor*
PB, % MS	51,70	36,60	40,00	35,60		
a, %	16,82[a]	42,71[c]	28,95[b]	40,58[c]	1,72	< 0,01
b, %	79,02[c]	40,10[b]	33,79[a]	35,05[a]	1,54	< 0,01
c, %	4,16[a]	17,19[b]	37,26[d]	24,36[c]	1,10	< 0,01
kd, %/h	7,8	6,5	4,8	6,1	0,10	0,07
PNDR, % PB	37,35[a]	38,02[a]	56,80[c]	44,09[b]	2,55	< 0,01

Médias na mesma linha seguidas por diferentes sobrescritos diferem em p < 0,05.

O FS, utilizado como alimento controle, apresentou maior teor de PB (51,70 % da MS), sendo semelhante aos valores relatados por (Oliveira et al., 2003; Valadares Filho et al., 2006; Lee et al., 2016 e NASEM 2021). Esses resultados estão de acordo com a literatura, que

descreve o FS como uma das principais fontes proteicas, com alta concentração e elevada degradabilidade ruminal em dietas para ruminantes (Casalmiglia & Stern, 1995).

Como esperado, os DDGS apresentaram valores inferiores ao FS (36,60; 40,00 e 35,60%). O DDGS de milho é o coproduto da indústria do etanol mais utilizado na alimentação animal e, por isso, há uma vasta literatura que reporta teores de PB muito semelhantes ao encontrado neste estudo (Espinosa et al., 2018; Yang et al., 2019 e Palowski et al., 2021). Já o DDGS de sorgo é bem menos comum e pouco descrito (Schingoethe et al., 2009). Sotak et al. (2010) avaliaram amostras de DDGS de sorgo de diferentes plantas de produção de etanol e reportaram teor médio de PB de 34,21% MS, variando de 31,23 a 39,13. A concentração de PB nas amostras de grãos de destilaria depende da eficácia do processo de remoção do óleo e da quantidade de solúveis que é retornada ao produto. Por fim, a mistura entre os dois DDGS (representada pelo DG3) é um produto que está sendo avaliado pela primeira vez no presente estudo. Sendo uma mistura dos outros dois produtos, era esperado que o teor de PB do DG3 fosse intermediário entre DG1 e DG2, mas observou-se um valor semelhante ao do DG1. Isso reforça o entendimento da alta variabilidade na composição nutricional de coprodutos de processos industrial e a necessidade de avaliação constante.

O fracionamento proteico diferiu ($P < 0,01$) ou tendeu a diferir ($P = 0,07$) entre os alimentos. O FS é utilizado como um controle interno da qualidade das incubações, já que é um ingrediente bem caracterizado. De acordo com a biblioteca do NASEM (2021), a proteína do FS se distribui em 18% de fração *a*, 79% de fração *b*, 2% de fração *c* e 9%/h de kd, valores bastante próximos dos encontrados neste estudo. Em relação ao FS, os três DDGS apresentaram maior fração *a*, com o DG1 e DG3 atingindo valores acima de 40% e o DG2 sendo intermediário. Esses resultados diferem do padrão geralmente reportado na literatura, onde os DDGS tendem a apresentar menores valores da fração solúvel durante o processamento, o que pode aumentar a proporção de compostos nitrogenados rapidamente disponíveis, como nitrogênio não proteico, peptídeos e aminoácidos livre (Belyea et al., 2004; Kleinschmit et al., 2007; Liu et al., 2012 e Westreicher-Kristen et al., 2013). Por outro lado, a fração *a* é altamente sensível à etapa de lavagem inicial, podendo incluir não apenas compostos verdadeiramente solúveis, mas também perdas físicas de partículas finas. Estudos clássicos (Ørskov & McDonald, 1979; Nocek, 1988; Vanzant et al., 1998 e Mertens et al., 2002) demonstraram que procedimentos de lavagem mais intensos podem superestimar essa fração, principalmente em ingredientes com elevada fragmentação estrutural, como o DDGS. Dessa forma, os valores elevados observados neste estudo podem refletir, ao menos em parte, efeitos do processo de lavagem. Da mesma forma, a fração *c* dos três DDGS foi maior do que do FS e diferiram entre

si. O DG2 apresentou maior fração *c*, seguido do DG3 e por fim o DG1. O aumento expressivo da fração *c* no DG2 sugere possível ocorrência de reações de Maillard durante o processamento, mecanismo amplamente descrito como responsável pela redução da degradação ruminal da proteína (Weiss et al., 1989 e Russell et al., 1992). Já a fração *b* foi similar entre os 3 DDGS e menor do que no FS. A taxa de degradação da fração *b* tendeu a ser menor para os DDGS do que para o FS.

Como resultado do fracionamento proteico, os DDGS, especialmente o DG2, apresentaram maior PNDR em comparação ao FS, evidenciando seu potencial como fontes de proteínas de escape ruminal. Os valores de PNDR observados para o FS (37,35%) foram semelhantes aos reportados pelo NRC (1989), que indica aproximadamente (35,00%) de PNDR, com ampla variação em função do processamento do alimento.

Para os DDGS, foram observados valores de PNDR de (38,02; 56,80 e 44,09%) P <0,01, evidenciando grande variação entre as fontes. Para o DG1, o valor de PNDR foi inferior aos trabalhos de Mjoun et al. (2010), que variam de aproximadamente 44% até 55% de PNDR, sugerindo que fatores como condições de processamento podem ter influenciado a degradação ruminal da proteína. Por outro lado, o modelo do NASEM (2021) apresenta valores próximos de 65% de PNDR, reforçando o potencial desse ingrediente como alternativa para substituição de fontes proteicas convencionais.

Trabalhos avaliando diretamente o DG2 ainda são escassos, porém os estudos disponíveis indicam um perfil característico de proteína by-pass (Urriola et al., 2009 e Pan et al., 2021), que está de acordo com os resultados observados neste estudo. Adicionalmente, o menor valor de PDR observado para o DG2 pode ser explicado pela natureza do grão de sorgo, que apresenta menor degradação ruminal de amido e proteína em comparação a outros cereais, resultando em maior proporção de PNDR (Mjoun et al., 2010 e Westreicher-Kristen et al., 2012).

Apesar das diferenças nas frações proteicas, o kd apresentou apenas tendência de variação (P = 0,07), sugerindo que as diferenças observadas na degradabilidade estão mais associadas à distribuição das frações do que à velocidade de degradação da fração potencialmente degradável.

Esse resultado reforça a importância da caracterização das frações a, b e c, conforme proposto em sistemas de avaliação nutricional modernos (NASEM, 2021). O FS, DG1 e DG2 apresentaram uma taxa de degradação semelhantes (7,8; 6,5 e 6,1% h-1), valores próximos ao relatados pelo (NASEM, 2021) de 9,0% h-1 para o FS e 5,0% h-1 para o DDGS de milho. Em concordância com os resultados deste experimento (Lee et al., 2016) relataram uma taxa de

degradação para o DDGS de milho de 7,2% h-1. Na tabela 2 estão apresentados os resultados da digestibilidade intestinal dos ingredientes avaliados e a estimativa de PNDR digestível que cada alimento entrega.

Tabela 2. Digestibilidade intestinal da matéria seca (MS) e da proteína bruta (PB) e da proteína não degradada no rúmen (PNDR) em % da MS e % da PB.

	Suplementos proteicos					
Item	Farelo de soja	DDGS milho	DDGS sorgo	DDGS blend	EPM	*P-valor*
MS, %	17,71	32,61	47,25	31,83		
PB, %	95,70^{d}	86,00^{c}	30,78^{a}	76,49^{b}	1,49	<0,01
PNDRd, % MS	18,04^{c}	12,73^{b}	7,42^{a}	12,57^{b}	0,96	<0,01
PNDRd, % PB	35,76^{b}	32,74^{b}	17,65^{a}	33,77^{b}	2,28	<0,01

Médias na mesma linha seguidas por diferentes sobrescritos diferem em p < 0,05.

Quando expressa em porcentagem da MS, a digestibilidade intestinal foi maior para o DG2, seguida pelo DG1 e DG3 (47,25; 32,61 e 31,83%), enquanto o FS apresentou o menor valor (17,71%) P <0,01. Entretanto, quando a digestibilidade foi expressa em porcentagem de PB, o FS apresentou o maior valor (95,70%). Esse resultado evidencia a elevada disponibilidade intestinal da proteína do farelo de soja, mesmo apresentando menor proporção de PNDR.

Os DG1 e DG3 apresentaram valores intermediários de digestibilidade intestinal da proteína (86,00 e 76,49%), enquanto o DG2 apresentou o menor valor (30,78%) P <0,01. Essa redução na digestibilidade da proteína do DG2 pode estar associada à maior proporção da fração *c* (Benchaar et al., 2013). Essas diferenças refletiram diretamente nos valores de proteína não degradada no rúmen digestível (PNDRd).

Quando expressa como porcentagem da MS, a PNDRd foi maior para o FS (18,04%), seguida pelos DG1 e DG3 (12,73 e 12,57%), enquanto o DG2 apresentou o menor valor (7,42%) P <0,01. Quando expressa em % da PB, a PNDRd foi semelhante entre FS, DG1 e DG3 (35,76; 32,74 e 33,77%) e o DG2 (17,65%) obteve o menor valor (P <0,01). Esses resultados sugerem que a fração de PNDR após 16 horas de incubação foi relativamente baixa no DG2 quando comparado ao FS. Harty et al. (1998), relatou que os valores de digestibilidade variaram de 64,2 a 92,2% para os DDGS avaliados, valores muitos distantes aos encontrados neste estudo. Reforçando que o processamento e o aquecimento podem reduzir a digestibilidade intestinal e aumentar a variabilidade dos coprodutos, conforme observado em outros ingredientes (Kleinschmit et al., 2007). O modelo do NASEM (2021) traz valores próximos de (29,8 e 34,1%) de PNDRd com base na porcentagem de PB, mostrando ser semelhantes aos

valores encontrados neste estudo. Chrenková et al. (2012), avaliando o DDGS de milho, observaram uma variação de (38,6 – 49,9%) de PNDRd. Nossos resultados estão de acordo com esses dados da literatura.

De forma geral, nossos resultados evidenciam que os coprodutos do etanol apresentam grande variabilidade em sua composição e no comportamento da proteína no trato digestivo, reforçando a necessidade de sua caracterização específica. Enquanto o FS apresentou elevada degradabilidade ruminal e alta digestibilidade intestinal da proteína, os DDGS apresentaram perfis distintos entre si, especialmente em relação à proporção de proteína não degradada no rúmen e sua digestibilidade intestinal.

Esses achados indicam que os DDGS não devem ser tratados como um único ingrediente, uma vez que diferenças na matéria-prima e no processamento resultam em variações significativas em seu valor nutricional (Russell et al., 1992; Nuez-Ortín e Yu, 2009; Kajikawa et al., 2012 e Li et al., 2012). Nesse sentido, a comparação direta entre diferentes fontes de DDGS deve ser feita com cautela, pois cada ingrediente apresenta características próprias que influenciam seu comportamento no rúmen e no intestino.

Além disso, a utilização de valores reportados na literatura internacional deve ser considerada com ressalvas, uma vez que fatores como o tipo de hibrido utilizado na produção dos grãos, especialmente no contexto brasileiro, podem resultar em diferenças estruturais e nutricionais relevantes. Dessa forma, a caracterização de ingredientes em condições locais é fundamental para aumentar a precisão das formulações e evitar extrapolações inadequadas.

A interpretação desses resultados é limitada pela forma como o modelo do NASEM (2021) representa os DDGS, sem distinção clara entre as diferentes fontes, como DDGS de sorgo e de milho. Essa abordagem limita comparações diretas e pode não refletir adequadamente a variabilidade nutricional desses ingredientes, particularmente em condições nacionais. Embora a base de dados do NASEM (2021) inclua múltiplas categorias de resíduos de destilaria, as diferenças entre esses coprodutos se concentram principalmente nos teores de PB e gordura, enquanto o fracionamento proteico permanece constante entre eles.

Assim, a avaliação conjunta da degradação ruminal e da digestibilidade intestinal se mostra essencial para a correta caracterização do valor proteico dos alimentos, contribuindo para o uso mais eficiente do nitrogênio em sistemas de produção de ruminantes.

11. CONCLUSÃO

Essa abordagem fornece uma base mais robusta para a comparação econômica entre ingredientes, ao considerar não apenas o nutriente principal, mas sua contribuição efetiva dentro da dieta. Dessa forma, permite uma avaliação mais precisa do valor nutricional e econômico, auxiliando na seleção de ingredientes e na definição de níveis de inclusão mais eficientes.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o valor proteico de diferentes fontes de DDGS, considerando simultaneamente a degradação ruminal e a digestibilidade intestinal da proteína. Os resultados demonstram que, embora os DDGS sejam relevantes fontes de energia e proteína, com destaque para o fornecimento de PNDR, sua composição nutricional apresenta elevada variabilidade, fortemente influenciada pelo tipo de grão e pelas condições de processamento.

Em comparação ao FS, que apresentou maior teor de PB e alta degradabilidade ruminal, os DDGS mostraram menores teores de proteína, mas maior proporção de frações menos degradáveis, especialmente a fração *c*, associado a proteínas indisponíveis. Essas características foram mais evidentes no DDGS de sorgo, possivelmente devido a reações de Maillard durante o processamento, resultando em maior PNDR.

A digestibilidade intestinal da proteína variou entre os ingredientes. O FS apresentou maior digestibilidade da proteína, enquanto o DDGS de sorgo teve os menores valores, indicando que nem toda proteína de escape é aproveitada pelo animal. Já os DDGS de milho e blend apresentaram valores intermediários. No entanto, foi observado que as diferenças na degradabilidade entre os ingredientes estão mais associadas à distribuição das frações proteicas (a, b e c) do que ao kd. Essa integração permite uma estimativa mais acurada do aporte proteico e do uso do nitrogênio na dieta.

Contudo, o estudo reforça que a utilização eficiente dos DDGS depende da sua caracterização específica, especialmente em condições locais, onde a variabilidade tende a ser maior. Os resultados, indicam que avanços na nutrição de ruminantes passam não apenas pela inclusão desses coprodutos, mas pelo refinamento dos critérios de avaliação, permitindo maior precisão na formulação de dietas e melhor aproveitamento dos recursos disponíveis.

12. REFERÊNCIAS

ARRIOLA APELO, S. I. et al. Effects of reduced dietary protein and supplemental rumen protected essential amino acids on the nitrogen efficiency of dairy cows. J. Dairy Sci. 97:5688–5699. 2014b.

BALSALOBRE, M.A.A.; CORSI, M.; SANTOS, P.M.; PENATI, M.A.; DEMETRIO, C.G.B. Cinética da degradação ruminal do capim Tanzânia irrigado sob três níveis de resíduo pós-pastejo. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, p.1747-1762, 2003.

BELYEA R.L., RAUSCH K.D., TUMBLESON M.E., 2004. Composition of corn and distillers grains with solubles from dry grind ethanol processing. Biosource Technol. 94, 293-298.

BENCHAAR, C.; HASSANAT. F.; GERVAIS, R.; CHOUINARD, P.Y.; JULIEN, C.; PETTI, H.V.; MASSÉ, D.I. Effects of increasing amounts of corn dried distillers grains with solubles in dairy cow diets on methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. Journal Of Dairy Science, 2013.

BOILA R, INGALLS J. The ruminal degradation of dry matter, nitrogen and amino acids in wheat-based distillers' dried grains in sacco. Anim Feed Sci Technol. 1994;48:57–72.

BRODERICK, G. A., AND S. COLOMBINI. 2010. In vitro methods to determine rate and extent of ruminal protein degradation. Pages 691–702 in Energy and Protein Metabolism and Nutrition. EAAP Publication No. 127. G. M. Crovetto, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

CARROLL, A.L.; MORRIS, D.L.; JOLLY-BEITHAUPT, M.L.; HERRICK, J.; WATSON, A.K.; KONONOFF, P.J. Energy and nitrogen utilization of lactating dairy cattle fed increasing inclusion of a high protein processed corn coproduct. Journal Of Dairy Science, 2023.

CASALMIGLIA, S., E M. D. J. STERN. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. Journal Animal Science. 73:1459-1465.

CASTRO-PÉREZ BI, ESTRADA-ANGULO A, RÍOS FG, DÁVILA-RAMOS H, ROBLES-ESTRADA JC, CONTRERAS-PÉREZ G, CALDERÓN-CORTÉS JF, LÓPEZ-SOTO MA, BARRERAS A, PLASCENCIA A. Effects of replacing partially dry-rolled corn and soybean meal with different levels of dried distillers grains with solubles on growth performance, dietary energetics, and carcass characteristics in hairy lambs fed a finishing diet. Small Rumin Res. 2014;119:8–15.

CHRENKOVÁ M, CERESNAKOVÁ Z, FORMELOVÁ Z, POLÁCIKOVÁ M, MLYNEKOVÁ Z, FL'AK P. Chemical and nutritional characteristics of different types of DDGS for ruminants. J Anim Feed Sci. 2012;21:425–35.

CHRISTEN, K. A.; SCHINGOETHE, D. J.; KALSCHEUR, K. F.; HIPPEN, A. R.; KARGES, K. K.; GIBSON, M. L. Response of lactating dairy cows to high protein distillers grains or 3 other protein supplements. Journal Of Dairy Science, v. 93, p. 2095–2104, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Sétimo levantamento de grãos para o atual ciclo, abril 2026 – safra 2025/26.: Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2026.

DAS LK, KUNDU SS, KUMAR D, DATT C (2014) Metabolizable protein systems in ruminant nutrition: A review. Veterinary World 7(8): 622-629.

ESPINOSA, C. D., AND H. H. STEIN. 2018. High-protein distillers dried grains with solubles produced using a novel front-end-back-end fractionation technology has greater nutritional value than conventional distillers dried grains with solubles when fed to growing pigs. J. Anim. Sci. 96:1869–1876.

FIRKINS JL. et al. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. J. Dairy Sci. 89(E. Suppl.):E31–E51. 2006.

GARGALLO, S.; CERDÑO, A.; GÓMEZ, A.; STERN, M. D. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. Journal of Animal Science, v. 84, p. 2163-2167, 2006.

GUEVARA-GONZÁLEZ, J. A., J. GONZÁLEZ, J. M. ARROYO, V. J. MOYA, AND O. PIQUER. 2013. Effects of the correction of particle microbial contamination and particle transit model in the rumen on in situ protein evaluation of grass hays. Anim. Prod. Sci. 53:134–141.

HARTY S.R., AKAYEZU J.-M., LINN J.G., CASSADY J.M., 1998. Nutrient composition of distillers grains with added solubles. J. Dairy Sci. 81, 1201 (Abstr.).

HVELPLUND, T., AND M. R. WEISBJERG. 1998. In vitro techniques to replace in vivo methods for estimating amino acid supply. Page 131 in In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants. E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington, and T. L. J. Lawrence, ed. Occasional Pub. No. 22, Br. Soc. of Anim. Sci. Proc., July 1997, Univ. of Reading, UK.

HVELPLUND, T. AND WEISBJERG, M.R., 2000. In Situ Techniques for the Estimation of Protein Degradability and Postrumen. Forage evaluation in ruminant nutrition, p.233.

IRAM A, CEKMECELIOGLU D, DEMIRCI A (2019) Optimization of dilute sulfuric acid, aqueous ammonia, and steam explosion as the pretreatments steps for distillers' dried grains with solubles as a potential fermentation feedstock. Bioresour Technol 282:475–481.

IOMMELLI P, ZICARELLI F, MUSCO N, SARUBBI F, GROSSI M, LOTITO D, LOMBARDI P, INFASCELLI F, TUDISCO R. Efeito do processamento de cereais e leguminosas na degradabilidade in situ da proteína ruminal: uma revisão. Fermentação. 2022; 8(8):363.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. et al. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero Cynodon e rações concentradas utilizando indicadores internos. Rev. Bras. Zootec., v.31, supl., p.1024-1032, 2002.

JAWORSKI, N.W., LÆRKE, H.N., BACH KNUDSEN, K.E., STEIN, H.H., 2015. Carbohydrate composition and in vitro digestibility of dry matter and nonstarch polysaccharides in corn, sorghum, and wheat and coproducts from these grains. J. Anim. Sci. 93 (3), 1103–1113.

KAJIKAWA H, MIYAZAWA K, YANASE A, TANABE Y, TSUCHIDA Y, MITSUMOTO Y, KOZATO Y AND MITSUMORI M 2012. Variation in chemical composition of corn dried distillers grains with solubles in relation to in situ protein degradation profiles in the rumen. Animal Science Journal 83, 299–304.

KAMOUN, M., H. AMMAR, A. THÉWIS, Y. BECKERS, J. FRANCE, AND S. LÓPEZ. 2014. Comparison of three 15N methods to correct for microbial contamination when assessing in situ protein degradability of fresh forages. J. Anim. Sci. 92:5053–5062.

KLEINSCHMIT DH, ANDERSON JL, SCHINGOETHE DJ, KALSCHEUR KF AND HIPPEN AR 2007. Ruminal and intestinal degradability of distillers grains plus solubles varies by source. Journal of Dairy Science 90, 2909–2918.

KLOPFENSTEIN TJ, ERICKSON GE, BREMER VR. Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. J Anim Sci. 2008;86:1223–31.

LEE, Y.H.; AHMADI, F.; CHOI, D.Y.; KWAK, W. S. In situ ruminal degradation characteristics of dry matter and crude protein from dried corn, high-protein corn, and wheat distillers grains. Journal of Animal Science and Technology, 2016.

LI C, LI JQ, YANG WZ AND BEAUCHEMIN KA 2012. Ruminal and intestinal amino acid digestion of distiller's grain vary with grain source and milling process. Animal Feed Science and Technology 175, 121–130.

LIU B., 2012. Indepth study of the relationship between protein molecular structure and the digestive characteristics of the protein in dried distillers grains with solubles. A thesis for the degree of master of science. Department of Animal and Poultry Science. University of Saskatchewan, Saskatoon (Canada), pp. 114

MAPANZENE, C. Levantamento sobre a nutrição proteica de vacas em lactação com nutricionistas brasileiros. 2024. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2024.

MAY, M.L., DECLERCK, J.C., QUINN, M.J., DILORENZO, N., LEIBOVICH, J., SMITH, D.R., HALES, K.E., GALYEAN, M.L., 2010. Corn or sorghum wet distillers grains with solubles in combination with steam-flaked corn: Feedlot cattle performance, carcass characteristics, and apparent total tract digestibility. J. Anim. Sci. 88 (7), 2433–2443.

MENEZES, A. C. B., FILHO, S. V., ROTTA, P. P., SANTOS, S. A., PACHECO, M. V. C., SILVA, B. C., & CATON, J. S. (2017). Does microbial nitrogen contamination affect the estimation of crude protein degradability of concentrate feeds?. Journal of Animal Science, 95(9), 4164-4171.

MENEZES, A. C. B., VALADARES FILHO, S.C., PUCETTI, P., C. PACHECO, M. V, GODOI, L. A., ZANETTI, D., ALHADAS, H. M; PAULINO, M. F, CATON, J. S. Oscillating and static dietary crude protein supply: II. Energy and protein requirements of young Nellore bulls. Translational Animal Science, v. 3, p. 1216-1226, 2019.

MERTENS, C. J., M. G. MLYNCZAK, M. LO´PEZ-PUERTAS, P. P. WINTERSTEINER, R. H. PICARD, J. R. WINICK, L. L. GORDLEY, AND J. M. RUSSELL III (2002), Retrieval of kinetic temperature and carbon dioxide abundance from non-local thermodynamic equilibrium limb emission measurements made by the SABER experiment on the TIMED satellite, in Proceedings of SPIE, Remote Sensing of Clouds and the Atmosphere VII, Agia Pelagia, Crete, Greece, September 24 – 27 , vol. 4882, pp. 162 – 171.

MJOUN K, KALSCHEUR K, HIPPEN A, SCHINGOETHE D. Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers grains products. J Dairy Sci. 2010;93:4144–54.

MOHAMED, R., AND A. S. CHAUDHRY. 2008. Methods to study degradation of ruminant feeds. Nutr. Res. Rev. 21:68–81.

NRC. 1978. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 5th rev. ed. Natl. Acad. Sci., 8 Washington, DC.

NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine) Nutrient Requirements of Dairy Cattle (8th rev. ed.), The National Academies Press, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 6.rev.ed. (update 1989) National Academy Press, Washington, DC. 157p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requeriments of dairy cattle. 7ªed. Washington: National Academy Press, 2001. 381 p.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate protein and energy digestibility. A review. Journal of Dairy Science, 71:2051, 1988.

NUEZ-ORTÍN WG, YU P. Nutrient variation and availability of wheat DDGS, corn DDGS and blend DDGS from bioethanol plants. J Sci Food Agric. 2009; 89:1754–61.

OBA, M.; PENNER, G. B; WHYTE, T. D. WIERENGA, K. Effects of feeding triticale dried distillers grains plus solubles as a nitrogen source on productivity of lactating dairy cows. Journal Of Dairy Science, v. 93, p. 2044–2052, 2010.

OLIVEIRA, M.V.M.; VARGAS JUNIOR, F.M.; SANCHEZ, L.M.B. et al. Degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal de alimentos por intermédio da técnica in situ associada à do saco de náilon móvel. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.6, p.2023-2031, 2003 (supl.2.).

ORSKOV, E. R., AND P. MCDONALD. 1979. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92:499–503.

ØRSKOV, E. R.; REID, G. W.; KAY, M. Predicting of intake by cattle from degradation characteristics of roughage. Animal Production, 46:29, 1988.

PALOWSKI, Z YANG, J JANG, T DADO, P E URRIOLA, G C SHURSON. Determination of in vitro dry matter, protein, and fiber digestibility and fermentability of novel corn coproducts for swine and ruminants, Translational Animal Science, Volume 5, Issue 2, April 2021, txab055.

PAN, L.; HUANG, K.H.; MIDDLEBROOK, T.; ZHANG, D.; BRYDEN, W.L.; LI, X. Rumen Degradability of Barley, Oats, Sorghum, Triticale, and Wheat In Situ and the Effect of Pelleting. Agriculture 2021, 11, 647.

PANCINI, S.; SIMEONE, A.; BENTANCUR, O.; BERETTA, V. Evaluation of sorghum dried distillers' grains plus solubles as a replacement of a portion of sorghum grain and soybean meal in growing diets for steers. Livest. Sci. 2021, 250, 104564.

PAZ H, CASTILLO-LOPEZ E, RAMIREZ-RAMIREZ H, CHRISTENSEN D, KLOPFENSTEIN T, KONONOFF P. Invited review: ethanol co-products for dairy cows: there goes our starch… now what? Can J Anim Sci. 2013;93:407–25.

PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P. D.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; RUGGIERI, A. C.; ROTH, M. D. T. P. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da proteína bruta e da fração fibrosa de silagens de milho, de sorgo e de Brachiaria brizantha. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.2, p.391-400, 2010.

PRADO A.C.P., SILVA R.C., OLIVEIRA T.A. O impacto do crescimento do DDG no brasil nas exportações. Revista Observatório Portuário, 2022, 1(1): 95-108.

POLIZEL, D. M; SOARES, L. C. B. DDG: qual a qualidade nutricional do coproduto que utilizo na minha propriedade? Milkpoint. 2021. Disponível em: https://www.milkpoint.com.br/colunas/esalqlab/ddg-qual-a-qualidade-nutricional-do-coproduto-que-utilizo-na-minha-propriedade-224301/

ROTTER, M., BRANDMAIER, S., PREHN, C. et al. Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. Metabolomics 13, 4 (2017).

RUSSELL, J. B., J. D. O'CONNOR, D. G. FOX, P. J. VAN SOEST, AND C. J. SNIFFEN. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 70:3551–3561.

SCHINGOETHE D., KALSCHEUR K., HIPPEN A., GARCIA A. Invited review: The use of distillers products in dairy cattle diets. J. Dairy Sci. 2009;92:5802–5813. doi: 10.3168/jds.2009-2549.

SCHWAB, CG; BRODERICK, GA. Uma revisão de 100 anos: Nutrição de proteínas e aminoácidos em vacas leiteiras. J. Dairy Sci. 2017 , 100 , 10094–10112.

SOK, M., D. R. OUELLET, J. L. FIRKINS, D. PELLERIN, AND H. LAPIERRE. 2017. Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. J. Dairy Sci. 100:5241–5249.

STEIN, H.H., SHURSON, G.C., 2009. Board-invited review: The use and application of distillers dried grains with solubles in swine diets. J. Anim. Sci. 87 (4), 1292–1303.

STERN, M. D., A. BACH, AND S. CALSAMIGLIA. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J. Anim. Sci. 75:2256–2276.

SPIEHS MJ, WHITNEY MH, SHURSON GC. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. J Anim Sci. 2002;80:2639–45.

SOTAK, K.M., GOODBAND, R.D., TOKACH, M.D., DEROUCHEY, J.M., DRITZ, S.S., NELSSEN, J.L., 2010. Nutrient analysis of sorghum dried distillers grains with solubles from ethanol plants located in the Western Plains Region. In: Swine Day Conference, Manhattan, KS, USA, 18 November, pp. 265–272.

SOUZA, N.H. DE; FRANZOLIN, R.; RODRIGUES, P.H.M.; CLARO, G.R. DEL. Efeitos de níveis crescentes de fibra em detergente neutro na dieta sobre a digestão ruminal em bubalinos e bovinos. Revista Brasileira de Zootecnia, v.29, p.1565-1577, 2000.

TEDESCHI, L. O., D. G. FOX, M. A. FONSECA, AND L. F. L. CAVALCANTI. 2015. Invited Review: Models of protein and amino acid requirements for cattle. Rev. Bras. Zootec. 44:109–132.

TITZE, N. et al. Linkage of in situ ruminal degradation of crude protein with ruminal degradation of amino acids and phytate from different soybean meals in dairy cows. J. Dairy Sci. 107:2011–2025. 2024.

URRIOLA PE, HOEHLER D, PEDERSEN C, STEIN HH AND SHURSON GC, Amino acid digestibility of distillers dried grains with solubles, produced from sorghum, a sorghum-corn blend, and corn fed to growing pigs. J Anim Sci 87: 2574–2580 (2009).

VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JR., V.R. et al. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos. 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2006. 329p.

VAN DUINKERKEN, G., M. C. BLOK, A. BANNINK, J. W. CONE, J. DIJKSTRA, A. M. VAN VUUREN, AND S. TAMMINGA. 2011. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: The DVE/OEB2010 system. J. Agric. Sci. 149:351–367.

VAN HELLEN, R. W.; ELLIS, W. C. Sample contain porosity for rumen in situ studies. Journal of Animal Science, 44:141, 1977.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VANZANT, E.S.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, E.C. Standardization of In Situ Techniques for Ruminant Feedstuff Evaluation. J. Anim. Sci. 1998, 76, 2717–2729.

VOLDEN, H. 2011. NorFor - The Nordic feed evaluation system. EAAP Publications No. 130, Wageningen Academic Publishers, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.

WEISS, W. P., D. O. ERICKSON, G. M. ERICKSON, AND G. R. FISHER. 1989. Barley distillers grains as a protein supplement for dairy cows. J. Dairy Sci. 72:980–987.

WESTREICHER-KRISTEN E, STEINGASS H AND RODEHUTSCORD M 2012. Variations in chemical composition and in vitro and in situ ruminal degradation characteristics of dried

distillers' grains with solubles from European ethanol plants. Archives of Animal Nutrition 66, 458–472.

WESTREICHER-KRISTEN E, STEINGASS H, RODEHUTSCORD M. In situ ruminal degradation of amino acids and in vitro protein digestibility of undegraded CP of dried distillers' grains with solubles from European ethanol plants. Animal. 2013;7:1901–9.

YANG, Z., P. E. URRIOLA, A. HILBRANDS, L. J. JOHNSTON, AND G. C. SHURSON. 2020. Effects of feeding high-protein corn distillers dried grains and a mycotoxin mitigation additive on growth performance, carcass characteristics, and pork fat quality of growing-finishing pigs. Transl. Anim. Sci. 4:txaa051.

ARTIGO 2

EFEITO DO PREPARO DA AMOSTRA, DO TEMPO E FORMA DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE URINA NAS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO METABOLISMO PROTEICO DE RUMINANTES.

RESUMO

A avaliação de compostos nitrogenados na urina é de grande importância em experimentos de nutrição para ruminantes. Contudo, a melhor metodologia para processamento das amostras não está bem definida na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da diluição, tempo e tipo de armazenamento sobre a estabilidade dos compostos nitrogenados e derivados de purina presentes na urina. O experimento foi realizado com amostras compostas de urina provenientes de três vacas leiteiras em sistema de confinamento. Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram submetidas a três tipos de diluição somente com água destilada, solução o com ácido fraco (0,036M de H2SO4) ou solução com ácido forte (0,41M de H2SO4). Todas as amostras foram diluídas na proporção 1:4 com as respectivas soluções. As amostras foram analisadas para concentração de pH, N total, ureia, creatinina, ácido úrico e alantoína no momento da coleta (dia 0), e após 1, 7 e 15, 30 e 60 dias de congelamento a -20ºC e sob refrigeração a 4°C. Um terceiro conjunto de amostras com os 3 tipos de diluição que também foi mantido a -20°C, era descongelado em cada dia de análise e recongelado após a utilização. As análises estatísticas foram realizadas utilizando modelos lineares mistos R (R Core Team), por meio dos pacotes lme4, lmerTest e emmeans. Os efeitos foram considerados significativos quando $P < 0,05$, as tendências foram declaradas em $0,05 < P < 0,10$. O pH foi significativamente influenciado pelo tempo, tipo de armazenamento e acidificação ($p < 0,01$), especialmente sob recongelamento. A concentração de N total foi influenciada pelo tempo de armazenamento ($p < 0,01$), sem efeito da diluição. A ureia foi influenciada principalmente pelo tempo de armazenamento ($p < 0,01$). A creatinina foi influenciada pelo tempo, acidificação e tipo de armazenamento ($p < 0,02$). A acidificação influenciou significativamente o ácido úrico ($p < 0,01$), principalmente sob refrigeração, enquanto que no congelamento não houve efeito ($p = 0,10$). O tempo e o método de armazenamento afetaram significativamente as concentrações ($p < 0,02$), com maior instabilidade em amostras recongeladas. A concentração de alantoína foi influenciada pelo tempo, tipo de armazenamento e acidificação ($p < 0,01$). Os resultados deste estudo demonstram que a estabilidade dos compostos nitrogenados e derivados de purina na urina de bovinos é fortemente dependente das condições de armazenamento, do tempo e do nível de diluição da amostra, evidenciando que esses fatores devem ser cuidadosamente controlados para garantir a confiabilidade das análises.

Palavras-chave: compostos nitrogenados; creatinina; derivados de purina; vacas leiteiras.

ABSTRACT

The evaluation of urinary nitrogenous compounds is essential in ruminant nutrition research; however, standardized methodologies for sample processing and storage remain poorly defined. The objective of this study was to evaluate the effects of dilution level, storage duration, and storage method on the stability of urinary nitrogenous compounds and purine derivatives. Composite urine samples were collected from three dairy cows housed in a confinement system. Following collection, samples were transported to the Animal Research Laboratory of the Department of Animal Science at the Federal University of Lavras (UFLA), where they were assigned to one of three dilution treatments: distilled water, a weak-acid solution (0.036 M H_2SO_4), or a strong-acid solution (0.41 M H_2SO_4). All samples were diluted at a 1:4 ratio using their respective solutions. Samples were analyzed for pH, total nitrogen (N), urea, creatinine, uric acid, and allantoin concentrations at collection (d 0) and after 1, 7, 15, 30, and 60 d of storage under freezing conditions (−20°C) or refrigeration (4°C). A third set of samples representing the three dilution treatments was stored at −20°C and subjected to repeated freeze–thaw cycles, whereby samples were thawed for analysis at each sampling day and subsequently refrozen. Statistical analyses were performed using linear mixed-effects models in R (R Core Team) with the *lme4*, *lmerTest*, and *emmeans* packages. Effects were considered significant at $P < 0.05$, and trends were declared when $0.05 \leq P < 0.10$. Urine pH was significantly affected by storage duration, storage method, and acidification treatment ($P < 0.01$), particularly under repeated freeze–thaw conditions. Total N concentration was influenced by storage duration ($P < 0.01$) but was not affected by dilution treatment. Urea concentration was primarily affected by storage duration ($P < 0.01$). Creatinine concentration was influenced by storage duration, acidification treatment, and storage method ($P < 0.02$). Acidification significantly affected uric acid concentration ($P < 0.01$), particularly under refrigerated storage, whereas no effect was observed in frozen samples ($P = 0.10$). Storage duration and storage method also affected uric acid concentrations ($P < 0.02$), with greater instability observed in samples subjected to repeated freeze–thaw cycles. Allantoin concentration was significantly influenced by storage duration, storage method, and acidification treatment ($P < 0.01$). These results demonstrate that the stability of urinary nitrogenous compounds and purine derivatives in bovine urine is highly dependent on storage conditions, storage duration, and sample dilution level. Therefore, these factors should be carefully controlled to ensure the accuracy and reliability of laboratory analyses used to assess nitrogen metabolism and microbial protein synthesis in dairy cattle.

Keywords: nitrogenous compounds; creatinine; purine derivatives; dairy cows.

15. INTRODUÇÃO

A urina é uma amostra biológica importante para avaliação da nutrição proteica de ruminantes principalmente na quantificação de compostos nitrogenados (CN) e derivados de purina (DP). Por meio da urina conseguimos avaliar a excreção de nitrogênio, principalmente na forma de ureia e nitrogênio total (N), que estão ligados tanto à eficiência do uso do nitrogênio (EUN) quanto ao impacto ambiental do N vindo da dieta.

O N excretado na urina é um problema ambiental sério em sistemas de produção animal, e as formas como ele se perde acabam comprometendo a EUN e causando impactos ambientais. Dentre essas vias, a excreção de ureia na urina é a mais preocupante, pois a ureia é altamente solúvel e no ambiente sofre rápida hidrólise a amônia (NH_3) com a ajuda da enzima urease. Essas perdas ocorrem principalmente via volatização de NH_3, lixiviação do nitrato (NO_3^-), e a emissão de óxido nitroso (N_2O) (Eckard et al., 2010).

Do ponto de vista do metabolismo animal, a quantidade de N perdida está diretamente ligada ao consumo de nutrientes e ao balanço entre proteína e energia fermentável na dieta. Em média, vacas leiteiras excretam 70% do N ingerido nas fezes e na urina, proporção consideravelmente maior ao N secretado no leite (21 a 33%; Calsamiglia et al., 2010). Em bovinos, a ureia na urina é a principal forma da perda de N, resultado de um desbalanço entre a ingestão de proteína e a disponibilidade de energia fermentável no rúmen. O excesso de N é absorvido na forma de amônia, convertido em ureia no fígado e enviado para a circulação periférica, para irrigar tanto os rins quanto o trato gastrointestinal, nos rins essa ureia é filtrada e excretada na urina.

Apesar da urina ter se consolidado como uma matriz biológica adequada para a avaliação da excreção de N e do metabolismo de CN, ainda não há padronização clara quanto aos procedimentos de coleta, processamento e armazenamento das amostras, especialmente no que se refere à estabilidade dos compostos ao longo do tempo. A urina apresenta vantagens como facilidade de coleta e a capacidade de refletir diretamente o metabolismo pós-abortivo, incluindo a excreção de DP provenientes da degradação de ácidos nucleicos microbianos.

No entanto, a literatura carece de informações consistentes sobre os efeitos do armazenamento e do processamento de amostras de urina na estabilidade de CN e DP. Os estudos disponíveis apresentam elevada heterogeneidade metodológica, variando desde a análise de urina in natura até o uso de diferentes concentrações de ácido para diluição e conservação das amostras. Essa variabilidade pode comprometer a solubilidade de determinados metabólitos, levando à precipitação ou à subestimação de suas concentrações,

além de dificultar a comparação entre estudos e a definição de protocolos experimentais consistentes.

Evidências experimentais indicam que as condições de armazenamento podem influenciar significativamente a estabilidade dos compostos presentes na urina. Diante disso, surge a seguinte questão: como os métodos de diluição, acidificação e armazenamento influenciam a estabilidade dos CN e DP em amostras de urina de bovinos?

Dessa forma, levantou-se a hipótese que o tempo de armazenamento das amostras de urina influencia na preservação dos CN e DP, e que a urina acidificada com ácido fraco, quando armazenada sob refrigeração ou congelamento, preserva melhor esses compostos em comparação à urina não acidificada ou com ácido forte.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da diluição, do tempo e do tipo de armazenamento sobre a estabilidade dos CN e DP presentes na urina. Esse objetivo geral se agrega com objetivos específicos de:

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0,036M e 0,41M) na conservação da urina bovina, em comparação a amostras não acidificadas.
- Comparar a estabilidade das amostras de urina armazenadas sob refrigeração (4°C) e congelamento (-20°C), em diferentes intervalos de tempo 0h até 60 dias.
- Determinar o impacto do congelamento e descongelamento repetido sobre a integridade físico-química das amostras, avaliando possíveis alterações de pH, precipitação de substâncias e formação de cristais de ácido úrico.
- Identificar potenciais interações entre os fatores testados como diluição, tempo de armazenamento e tipo de armazenamento e seus efeitos sobre a confiabilidade das análises de CN e DP.
- Propor a padronização de protocolos de conservação e processamento de amostras de urina de bovinos, visando aumentar a reprodutibilidade de estudos sobre metabolismo proteico.

16. REFERENCIAL TEORICO

16.1 Metabolismo do nitrogênio em ruminantes

A proteína na dieta de vacas leiteiras tem como principais funções atender as exigências de nitrogênio (N) dos microrganismos ruminais e as exigências de aminoácidos (AA) do animal. No entanto, de forma indireta, o atendimento das exigências de N no rúmen garante digestão e consumo adequados, o que assegura o aporte de todos os nutrientes necessários para produção de leite (NASEM, 2021).

Historicamente, a formulação de dietas se baseou na métrica de proteína bruta (PB), que nada mais é que uma medida de N dos alimentos. No entanto, esse N dietético se apresenta de diferentes formas, como nitrogênio não proteico (NNP), proteína degradada no rúmen (PDR) e proteína não degradada no rúmen (PNDR), cada uma atendendo exigências específicas da microbiota ou do animal.

Animais de baixo desempenho podem ter grande parte da sua exigência de AA atendida por proteína microbiana (Pmic), que é a própria massa de microrganismos que se multiplicou utilizando PDR. Conforme as produções aumentam, a Pmic torna-se insuficiente, aumentando a dependência de PNDR (Santos et al., 2019 e Schwab & Broderick, 2017).

Dessa forma, o metabolismo do nitrogênio em ruminantes envolve a transformação do N dietético em diferentes CN que podem ser utilizados ou excretados, principalmente via urina (Reynolds & Kristensen, 2008).

16.2 Compostos nitrogenados urinários e sua origem metabólica

Além da utilização para síntese de Pmic e tecidual, o N absorvido pode ser convertido em diferentes compostos excretados na urina. Entre esses compostos, se destaca a ureia, a creatinina e os DP, como alantoína e ácido úrico.

A ureia é formada no fígado a partir da amônia absorvida no rúmen ou do N proveniente de AA oxidados nos tecidos, sendo um dos principais mecanismos de desintoxicação de N no organismo (Lapierre & Lobley, 2001 e Reynolds & Kristensen, 2008). A creatinina, por sua vez, está relacionada ao metabolismo muscular e é excretada de forma relativamente constante (Valadares et al., 1999).

Os DP têm origem principalmente no metabolismo dos ácidos nucleicos microbianos. Após a digestão da Pmic no intestino delgado, os ácidos nucleicos (RNA e DNA) são

degradados liberando nucleotídeos, que são posteriormente hidrolisados a nucleosídeos e bases púricas, principalmente adenina e guanina. Essas bases são absorvidas pela mucosa intestinal e transportadas até o fígado, onde sofrem catabolismo (Fujihara & Shem, 2011).

No fígado, as purinas são convertidas inicialmente em hipoxantina e xantina, que são então oxidadas pela enzima xantina oxidase para formar ácido úrico. Em bovinos, diferentemente de ovinos, o ácido úrico é rapidamente convertido em alantoína pela ação da enzima uricase, resultando em maiores proporções de alantoína na urina em relação ao ácido úrico (Chen & Gomes, 1992 e Verbic et al., 1990) (figura 1).

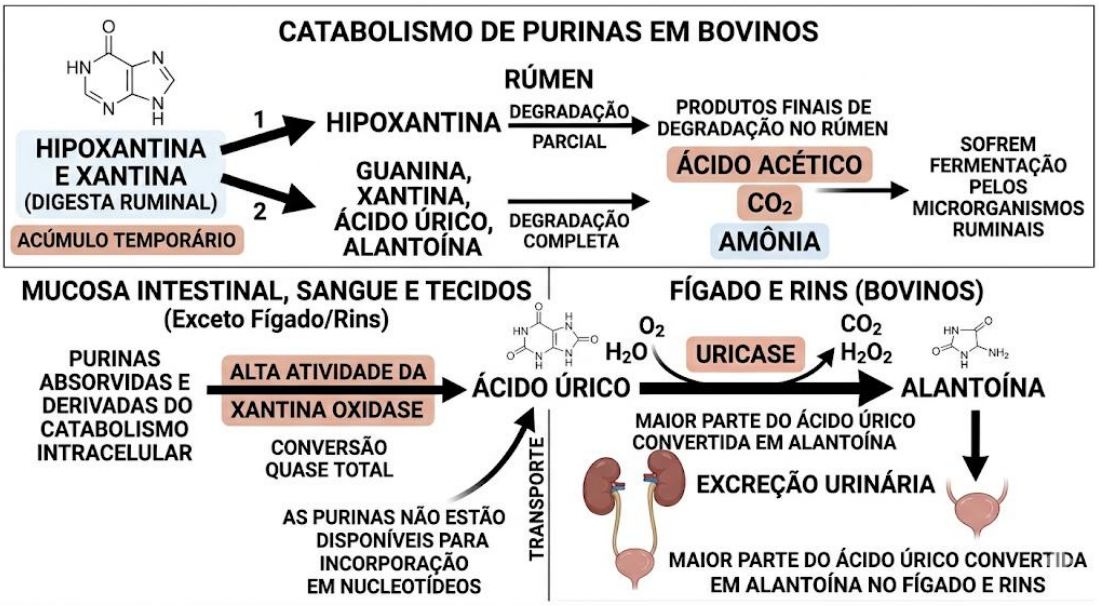


Figura 1: Esta imagem apresenta um esquema detalhado do catabolismo de purinas em bovinos (Chen et al., 1990 e Verbic et al., 1990), com foco nas vias digestivas, metabólicas e de excreção da degradação de nucleotídeos, de purina e formação de derivados de purina. Adaptado por Souza, 2026.

Além da origem microbiana, uma pequena fração dos DP pode ter origem endógena, proveniente da renovação de células do trato digestivo e de tecidos corporais. No entanto, a maior parte da excreção urinária desses compostos está associada à síntese de Pmic no rúmen.

Um outro ponto importante é a estabilidade dos DP na urina, especialmente da alantoína, pode ser significativamente influenciada pelas condições de armazenamento das amostras (Chen et al., 1995; Rennó et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2001 e Rennó et al., 2003). O pH urinário desempenha papel central nesse processo, uma vez que ambientes

próximos à neutralidade favorecem a atividade microbiana e enzimática, podendo resultar na degradação ou transformação desses compostos ao longo do tempo (Chen et al., 1995).

A alantoína, embora relativamente estável sob condições adequadas, pode ser degradada por ação microbiana quando a urina não é devidamente acidificada ou armazenada, especialmente em temperaturas mais elevadas (Santos et al., 2019). A presença de microrganismos pode promover a utilização de CN como substrato, alterando suas concentrações originais (Spek et al., 2012 e Dijkstra et al., 2013). Além disso, enzimas presentes na própria urina ou oriundas de contaminação microbiana podem catalisar reações que levam à degradação de CN.

Apesar da fragilidade metodológica, a quantificação de alantoína e ácido úrico na urina tem sido amplamente utilizada como ferramenta indireta para estimar a produção de Pmic em ruminantes, sendo considerada uma abordagem prática e não invasiva (Chen & Gomes, 1992; Broderick & Merchen, 1992).

16.3 Importância e desafios da urina como ferramenta experimental

A urina representa uma matriz biológica importante para avaliação do metabolismo nitrogenado em ruminantes, pois integra os processos digestivos, metabólicos e excretórios do animal (Valadares et al., 1999).

Neste contexto, quantificação de compostos como ureia, creatinina e DP permite inferências de utilização do nitrogênio e síntese de Pmic (Chen & Gomes, 1992 e Broderick & Clayton, 1997). No entanto, a interpretação desses compostos depende da precisão analítica das amostras desde a coleta até a análise.

Apesar do amplo uso desses marcadores, diversos fatores podem influenciar sua concentração e estabilidade nas amostras. Dentre estes fatores, destacam-se o pH da urina, a atividade microbiana, a temperatura de armazenamento e o tempo entre a coleta e a análise (Chen et al., 1995). Esses fatores podem levar à degradação ou transformação dos CN, comprometendo a confiabilidade dos resultados. Além disso, o processo de descongelamento pode afetar a quantificação de determinados compostos, tornando seus valores dependentes do momento da análise, enquanto outros compostos podem apresentar maior estabilidade (Rotter et al., 2017).

16.4 Métodos de coleta de urina e uso da creatinina como marcador

A coleta de urina em ruminantes pode ser realizada por diferentes métodos, cada um com vantagens e limitações que devem ser considerados de acordo como o objetivo experimental. Entre os métodos mais utilizados estão a coleta total de urina e a coleta pontual (spot sampling).

A coleta total de urina é considerada o método mais preciso para quantificar a excreção urinária dos compostos presentes na urina, pois permite mensurar diretamente o volume total excretado em determinado período (Fleming et al., 1991 e Valadares et al., 1997). No entanto, esse método é operacionalmente complexo, exige contenção dos animais, à necessidade de infraestrutura especializada, ao desafio associado a experimentos de larga escala e a dificuldade em animais em pastejo devido aos seus hábitos extensivos de ocupação das áreas de produção (Valadares et al., 1999).

Como alternativa, a coleta pontual de urina tem sido amplamente utilizada devido à sua praticidade. Nesse método, amostras únicas são coletadas em momentos específicos e utilizadas para estimar a excreção de CN e DP. No entanto, para que essa abordagem seja válida, é necessário utilizar marcadores que permitam estimar o volume urinário diário.

Nesse contexto, a creatinina é amplamente utilizada como marcador interno de excreção urinária. A creatinina é um produto do metabolismo da creatina muscular e sua excreção é relativamente constante em função do peso corporal do animal, sendo pouco influenciada pela dieta ou pelo estado fisiológico em curto prazo (Ørskov & McDonald, 1979; Susmel et al., 1994; Vagnoni et al., 1997; Valadares et al., 1997 e Oliveira et al., 2001). Dessa forma, a relação entre a concentração de creatinina na urina e sua excreção diária permite estimar o volume urinário, viabilizando o uso de amostras pontuais para inferir a excreção total de urina (Broderick & Reynal, 2009; Lee et al., 2012 e Chizzotti et al., 2008).

16.5 Métodos de conservação e limitações atuais

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para preservar amostras de urina, incluindo refrigeração, congelamento e acidificação. A acidificação é frequentemente empregada para reduzir a atividade microbiana e evitar a degradação dos CN (Chen & Gomes, 1992). No entanto, não há padronização clara na literatura quanto os melhores métodos de conservação, especialmente em relação ao tempo de armazenamento, à necessidade de intensidade da acidificação e aos efeitos da diluição das amostras.

Além disso, muitos estudos não abordam de forma detalhada o impacto dessas variáveis sobre a estabilidade dos compostos urinários, o que pode comprometer a comparabilidade entre resultados. Silva Júnior et al. (2023), observaram um aumento na concentração de creatinina em urina acidificada (pH 2,5 – 3,5) armazenada entre 28 e 39°C por até 150 dias, isso indica que as condições de armazenamento podem influenciar significativamente a estabilidade dos compostos presentes na amostra. Santos et al. (2019), observaram que não há a necessidade de adição de ácido ou base para quantificação da excreção de creatinina, ureia e ácido úrico, por outro lado, para a quantificação da excreção de alantoína é necessário a adição de uma base.

Segundo o protocolo clássico descrito por Chen e Gomes (1992), para conservar a urina adequadamente é necessário acidificar a amostra com ácido sulfúrico (H2SO4) a 10% ajustando o pH para valores inferiores a 3, de modo a prevenir a degradação dos compostos presentes na urina. Esses achados reforçam que tanto a creatinina quanto os DP, podem ser degradados ao longo do tempo se as amostras não forem devidamente acidificadas ou se forem armazenadas em condições inadequadas (Topps e Eliot, 1965; Blaxter e Martin, 1962 e Mayes et al., 1995). Outros protocolos descritos na literatura utilizaram acidificação com H2SO4 a 4% com diluição com água destilada na proporção 1:4 (v/v), seguida de congelamento a -20°C para análise de creatinina e DP (Pereira et al., 2021), ou acidificação com H2SO4 a 0,036M com diluição com água destilada na proporção 1:4 (v/v), conforme descrito por (Valadares et al., 1999).

Portanto, aspectos como o tempo máximo de armazenamento, os efeitos da acidificação, a influência da diluição e o impacto de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento ainda são pouco explorados na literatura. Dessa forma, é necessário avaliar de forma sistemática como diferentes métodos de armazenamento e preparo das amostras influenciam a quantificação desses compostos, garantindo maior confiabilidade e padronização das análises.

17. MATERIAL E MÉTODOS

17.1 Desenvolvimento do modelo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram analisadas amostras compostas de urina provenientes de três vacas leiteiras, todas em sistema de confinamento do tipo Free Stall.

A coleta de urina foi realizada às 13h, 7 horas após a alimentação, durante micção induzida por massagem perineal. A vulva e a região perineal foram limpas com papel toalha

para remover resíduos fecais, e os primeiros mililitros de urina foram descartados antes da coleta. Cada vaca foi amostrada uma única vez, e a amostra foi imediatamente dividida em três subamostras. O número de animais foi definido com o objetivo de remover o efeito do indivíduo (animal) na resposta das amostras aos diferentes processamentos. Dessa forma, as urinas das três vacas foram misturadas e subamostradas para aplicação dos tratamentos nas unidades experimentais. Para cada combinação de tratamentos (diluição, forma e tempo de armazenagem), quatro replicatas foram preparadas.

17.2 Diluição das amostras de urina

Todas as amostras foram diluídas na proporção 1:4 (v/v), sendo 1 mL de urina para 4 mL de solução. A primeira solução continha apenas água destilada, enquanto as outras duas continham também ácido sulfúrico (H2SO4), na concentração de 0,036 M (Valadares et al., 1999) ou 0,41 M (Pereira et al., 2021).

Para o preparo da solução 0,036 M (denominada ácido fraco), 1,92 mL de H2SO4 p.a. foi adicionado a um balão volumétrico de um litro, contendo 500 mL de água destilada e completou-se o restante do volume com água destilada. Da mesma forma, para a solução 0,41 M (denominada ácido forte), 22,4 mL de H2SO4 p.a. foi adicionado a um balão volumétrico de um litro, contendo 500 mL de água destilada e completou o restante do volume com água destilada.

17.3 Formas e tempos de armazenamento

Foram avaliadas três condições de armazenamento da urina como o objetivo de determinar sua estabilidade ao longo do tempo. As replicatas refrigeradas a 4°C ou congeladas a -20°C foram removidas do armazenamento nos tempos 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a coleta para realização das análises. Em cada tempo, as replicatas analisadas eram descartadas após a análise. Para as amostras armazenadas sob congelamento, o material foi acondicionado em tubos tipo eppendorf e retirado do freezer aproximadamente uma hora antes das análises. As amostras foram então deixadas para descongelar à temperatura ambiente (21°C) até o completo descongelamento, sendo posteriormente homogeneizadas e submetidas às análises.

Adicionalmente, foi avaliado o efeito de recongelamento das amostras após as análises realizadas nos dias 15, 30 e 60 dias de armazenamento. Para a realização das análises, as amostras congeladas eram retiradas do freezer e deixadas para descongelar à temperatura

ambiente (21°C) sobre a bancada do laboratório na tarde do dia anterior à avaliação, por volta das 17h00, horário de encerramento das atividades laboratoriais. As análises eram realizadas na manhã do dia seguinte. Inicialmente, procedia-se à determinação do pH das amostras, seguida das demais analises realizadas no período da tarde. Após a conclusão das analises previstas para a avaliação do efeito do recongelamento, as amostras eram novamente acondicionadas a -20°C até o próximo período experimental, quando eram submetidas a um novo ciclo de descongelamento e análise.

17.4 Análises químicas

Todas as análises foram realizadas por espectrofotometria. Em todas as combinações entre diluição, tempo e tipo de armazenamento descritas, as amostras de urina foram analisadas para: alantoína, creatinina, ácido úrico, ureia, nitrogênio total e pH.

A alantoína foi determinada pelo método colorimétrico, conforme técnica de Fujihara et al., (1987), descrita por Chen & Gomes (1992) e consiste na hidrólise alcalina a 100°C da alantoína e ácido alantoico, que posteriormente é convertido em ureia e ácido glioxílico em solução ácida. O ácido glioxílico reage com hidrocloreto de fenilhidrazina para produzir fenilhidrazona do ácido. O produto forma um cromógeno instável com ferricianeto de potássio que pode ser dosado colorimétricamente a 522 nm.

A concentração de creatinina foi determinada por meio do método colorimétrico utilizando kit comercial (Creatinina Cinética K067-24.3. Bioclin Diagnostics (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). Da mesma forma, o ácido úrico foi quantificado por reação colorimétrica (Ácido úrico monorreagente K303-1. Bioclin Diagnostics (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). A ureia foi determinada por método enzimático baseado em hidrólise (Ureia Cinética UV K317-1. Bioclin Diagnostics (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). A concentração de nitrogênio total foi determinada por combustão (LECO F828) e o pH foi quantificado por meio de um pHmetro digital.

17.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando modelos lineares mistos R (R Core Team), por meio dos pacotes lme4, lmerTest e emmeans. Para cada variável resposta (pH, N, ureia, creatinina, alantoína e ácido úrico), foram ajustados modelos incluindo os efeitos fixos

de tempo (0, 1, 7, 15, 30 e 60 dias), diluição (sem, fraco e forte) e armazenamento (geladeira, freezer e recongelamento), bem como suas interações. A repetição foi incluída como efeito aleatório, considerando um intercepto aleatório para cada unidade experimental. O modelo geral utilizado foi:

$$\text{Resposta} = \mu + \text{tempo} + \text{fator} + \text{tempo x fator} + \text{repetição} + \varepsilon$$

em que fator correspondeu ao ácido ou ao armazenamento, dependendo da análise.

Foram conduzidas duas abordagens analíticas complementares:

1. Avaliação do efeito de ácido (diluição) dentro de cada condição de armazenamento, incluindo o tempo 0 como referência;
2. Avaliação do efeito de armazenamento dentro de cada nível de ácido, considerando apenas os tempos após o início do experimento (tempo>0), com inclusão do valor basal (tempo 0) apenas para fins descritivos.

O efeito de tempo foi tratado como variável categórica. Não foi especificada estrutura de covariância para medidas repetidas, assumindo-se independência das observações condicionalmente ao efeito aleatório de repetição.

As médias ajustadas (least squares means) foram obtidas utilizando o pacote emmeans, e as comparações múltiplas foram realizadas com ajuste para múltiplas comparações conforme apropriado à estrutura dos contrastes.

A significância dos efeitos principais e das interações foi avaliada por meio de análise de variância dos modelos, com graus de liberdade ajustados pelo método de Kenward-Roger.

As diferenças entre médias foram apresentadas por meio de letras:

- Letras maiúsculas indicam diferenças entre níveis de ácido ou armazenamento dentro de cada tempo;
- Letras minúsculas indicam diferenças ao longo do tempo de cada nível do fator.

Os resultados foram expressos como médias ajustadas acompanhadas do erro padrão da média (SE). Devido ao delineamento balanceado e à suposição de variância residual homogênea, os erros padrão foram constantes entre as combinações de tratamentos.

Adicionalmente, formam reportados os p-valores dos efeitos principais e da interação, bem como os p-valores dos efeitos de tempo dentro de cada nível do fator e das comparações

entre níveis do fator dentro de cada tempo, os efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$, as tendências foram declaradas em $0,05 < p < 0,10$.

18. RESULTADOS E DISCUSSÃO

18.1 pH

O pH foi influenciado pelo tempo de armazenamento, pela acidificação e pela interação entre esses fatores ($p < 0,01$), mostrando que a condição química das amostras não se mantém constante ao longo do tempo de armazenamento. Dessa forma, foi observado que o padrão dessas variações depende diretamente das condições físicas da amostra.

Na condição de refrigeração (figura 2), o pH permaneceu moderadamente estável na ausência de ácido. Enquanto, as amostras acidificadas apresentaram leve aumento ao longo do tempo, sugerindo perda parcial de acidez. Quando as amostras foram submetidas ao congelamento (figura 3), foi observado aumento gradual do pH em todos os tratamentos, inclusive nas amostras acidificadas. Esse comportamento indica que a formação de gelo favorece a redistribuição de solutos e reduz a concentração real de íons de hidrogênio na fase líquida residual. Nas amostras sem adição de ácido teve aumento de 7,17 para 8,10. Já as amostras com ácido fraco o comportamento foi semelhante ao observado nas amostras sem ácido, porém mais pronunciado 1,83 a 2,3. E as amostras com ácido forte apresentaram aumento progressivo de 0,57 a 1,51.

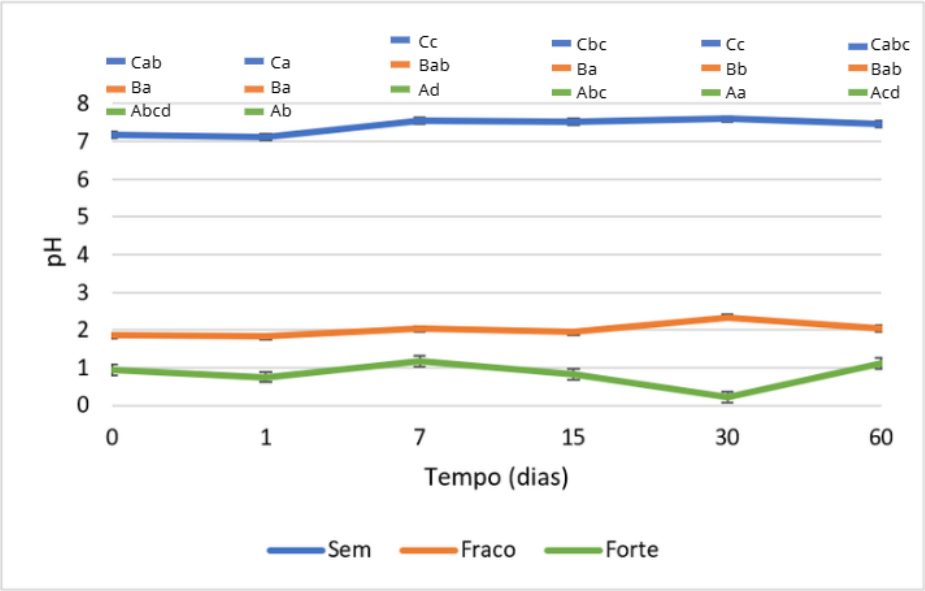


Figura 2: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0832.

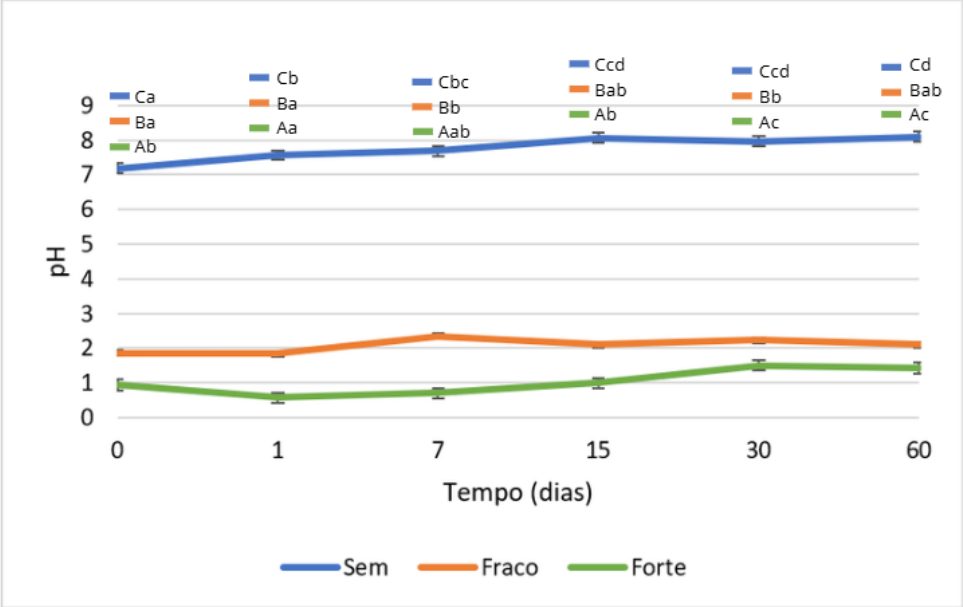


Figura 3: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em congelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0889.

Esse efeito tornou ainda mais evidente nas condições de recongelamento (figura 4), principalmente nas amostras com ácido forte, que apresentaram maior instabilidade e oscilações mais pronunciadas. Esse comportamento sugere que ciclos sucessivos de congelamento e

descongelamento intensificam a instabilidade física e química das amostras. Dessa forma, mesmo sob acidificação o pH não permaneceu constante, o que tem implicações diretas na estabilidade e na quantificação de DP sensíveis ao pH, como ácido úrico e alantoína (Antoniewicz et al., 1979). Dessa forma, a variação do pH ao longo do tempo de armazenamento constitui como um dos principais fatores responsáveis pelas variações observadas nesses compostos.

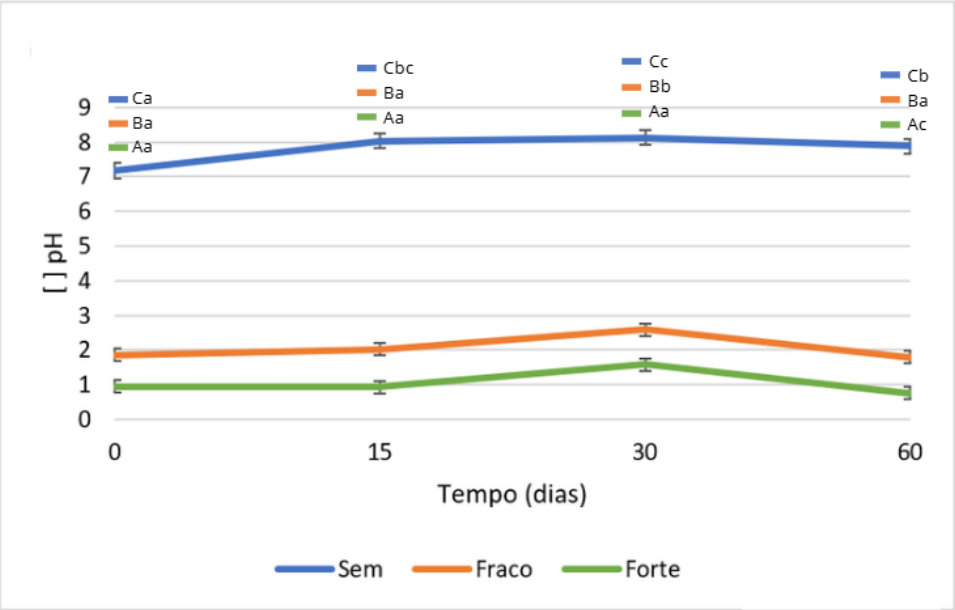


Figura 4: Respostas do pH submetido à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0682.

Em relação as respostas do pH sob diferentes armazenamentos, considerando os três meios de diluição: sem adição de ácido, ácido fraco, e ácido forte. Para as amostras sem adição de ácido (figura 5), o pH foi significativamente influenciado pelo tempo de armazenamento e pelo tipo de diluição (p <0,02), sem efeito da interação entre esses fatores (p=0,51). Nessa condição, o pH permaneceu relativamente estável em geladeira, enquanto o congelamento promoveu aumento significativo, sugerindo tendência à alcalinização da amostra.

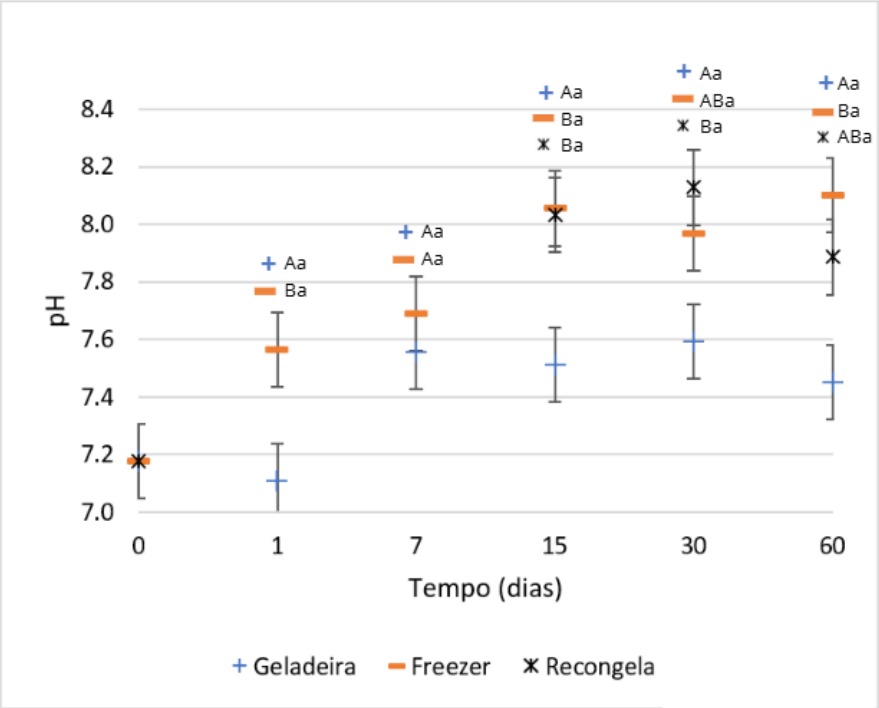


Figura 5: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,02), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P=0,51); Erro padrão da média 0,1332.

No tratamento com ácido fraco (figura 6), foi observado efeito significativo de tempo de armazenamento (p <0,01), além de tendência para o tipo de diluição (p=0,07) e a interação ente esses fatores foi significativamente afetada (p <0,01). Esse foi o tratamento que apresentou maior estabilidade relativa entre os avaliados, embora tenha ocorrido aumento gradual do pH ao longo do tempo de armazenamento, principalmente em condições de recongelamento. Por outro lado, a acidificação com ácido forte (figura 7) resultou em maior oscilação do pH ao longo do armazenamento, sugerindo elevada sensibilidade do sistema às condições físicas e químicas.

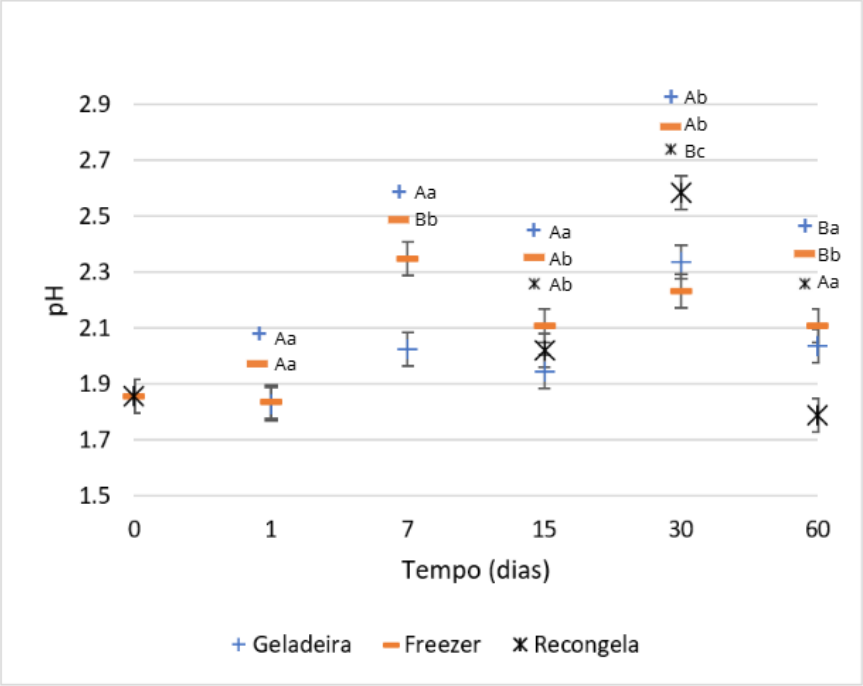


Figura 6: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,07) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0631.

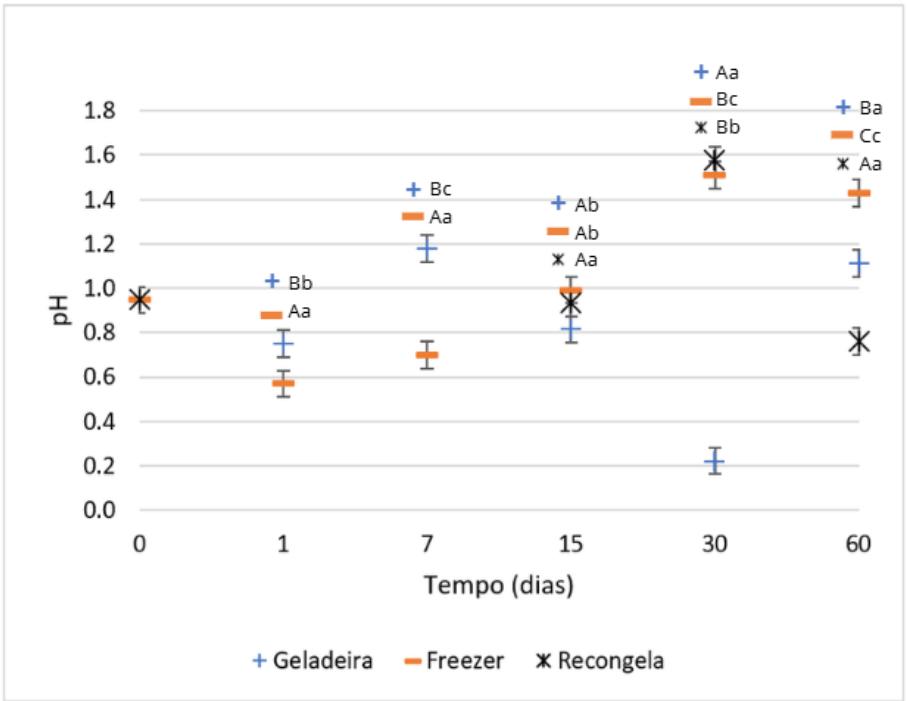


Figura 7: Respostas do pH submetido à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo

(P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0548.

Do ponto de vista metodológico, é importante destacar que, segundo Chen e Gomes (1992), a conservação de amostras de urina em meio ácido deve manter o pH abaixo de 3, a fim de evitar a degradação de CN. No entanto, embora a acidificação seja uma estratégia eficaz de estabilização, valores de pH excessivamente baixos também podem influenciar a integridade de algumas moléculas avaliadas, como DP, indicando que há um intervalo ótimo de pH para preservação. Nesse contexto, a classificação adotada neste estudo entre "ácido fraco" e "ácido forte" refere-se à concentração das soluções utilizadas, e não à força ácido-base intrínseca do ácido. Do ponto de vista químico, um sistema verdadeiramente caracterizado como fracamente ácido apresentaria valores de pH acima de 3, o que nem sempre foi observado experimentalmente, reforçando a nomenclatura empregada deve ser interpretada como relativa à intensidade da acidificação aplicada.

Para interpretar de forma mais consistente esses resultados, é necessário considerar a diferença entre pH do meio e o pH da reação. O pH do meio representa a concentração média de H+ em todo o volume da solução, assumindo que o sistema está relativamente homogêneo. Ele pode ser determinado pelos equilíbrios ácido-base predominantes, principalmente os sistemas NH4+/ NH3 e CO2/HCO3-, além da dinâmica de transformação da ureia ao longo do tempo de armazenamento. A hidrólise da ureia promove a formação de CN alcalinizantes, contribuindo para o aumento gradual do pH, enquanto a capacidade tampão atua modulando essas variações.

Dessa forma, por se tratar como uma medida média, não necessariamente representa as condições químicas nos locais onde as reações ocorrem efetivamente. Em regiões interfaciais, como a interface líquido/ar, podem se estabelecer gradientes de concentração devido às limitações no transporte de massa e à ocorrência simultânea de reações químicas. Nessas condições, o pH da reação pode diferir significativamente do pH do meio, influenciando diretamente nos processos como volatilização da amônia e a estabilidade dos CN. Esse comportamento é consistente com a literatura, que demonstra que o pH em microescala pode divergir do valor médio da solução em sistemas interfaciais (Wachta e Balasubramanian, 2024).

Contudo, devido ao comportamento mais estável, aliado à menor magnitude de variação observada em comparação aos demais tratamentos, o armazenamento em freezer associado à acidificação com ácido fraco mostrou ser a estratégia mais adequada para conservação da urina nas condições avaliadas.

18.2 NITROGÊNIO TOTAL

A concentração de N total (%) na urina, avaliada sob o efeito de diluição dentro de cada condição de armazenamento, foi influenciada de forma significativa pelo tempo de armazenamento (p <0,01), sem efeito do nível de diluição da urina para os três tratamentos. Esse resultado reforça achados prévios que indicam que a diluição da urina, quando adequadamente considerada no cálculo do volume urinário, não altera a quantificação do N total, sendo o tempo de armazenamento o principal fator de variação (Van Niekerk at al., 1963 e Valadares et al., 1999).

Em geladeira, (figura 8) foi observado interação significativa entre tempo e acidificação (p <0,01), sem efeito de nível de diluição da urina (p=0,45), com estabilidade relativa até 30 dias, seguida de redução acentuada no tempo 60 dias. Esse comportamento está de acordo com estudos que relatam perdas progressivas de nitrogênio quando armazenado em temperaturas mais altas, principalmente associadas à volatilização de amônia (Dijkstra et al., 2013). No entanto, os presentes resultados ampliam a literatura ao demonstrar que essa estabilidade inicial pode ser mantida por períodos intermediários, mas não se sustenta em armazenamento prolongado, mesmo sob acidificação.

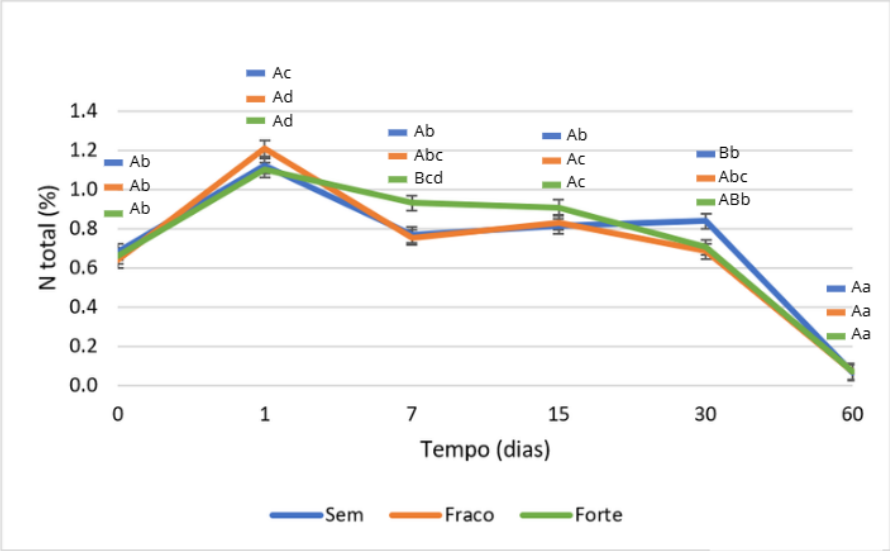


Figura 8: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,45) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,0409.

Nas amostras mantidas em freezer (figura 9), não houve interação entre tempo e diluição (p=0,93), nem efeito de diluição (p=0,95), evidenciando um padrão mais uniforme entre os tratamentos. O comportamento observado, caracterizado por um aumento inicial seguido de redução gradual, sugere menor influência de processos químicos e maior predominância de efeitos físicos, como redistribuição de solutos durante o congelamento. Esses achados corroboram a literatura que indica o congelamento como a melhor estratégia e a mais eficiente para preservação do N na urina, ao mesmo tempo em que refinam essa interpretação ao evidenciar que ainda ocorrem variações ao longo do tempo, ainda que em menor magnitude (Hristov et al., 2019).

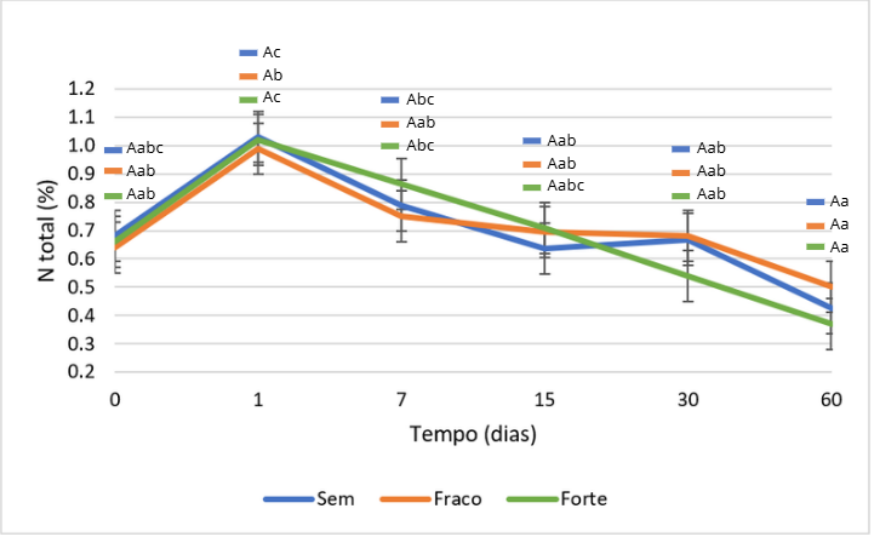


Figura 9: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,95) e interação tempoxdiluição (P=0,93); Erro padrão da média 0,0885.

No recongelamento (figura 10), não foi observada interação ente tempo e diluição da urina (p=0,28), nem efeito de diluição (p=0,58), porém este foi o tratamento que apresentou maior instabilidade. O padrão de queda acentuada seguido de recuperação parcial reforça o entendimento de que ciclos de congelamento e descongelamento promovem redistribuição de solutos e comprometem a homogeneidade da amostra.

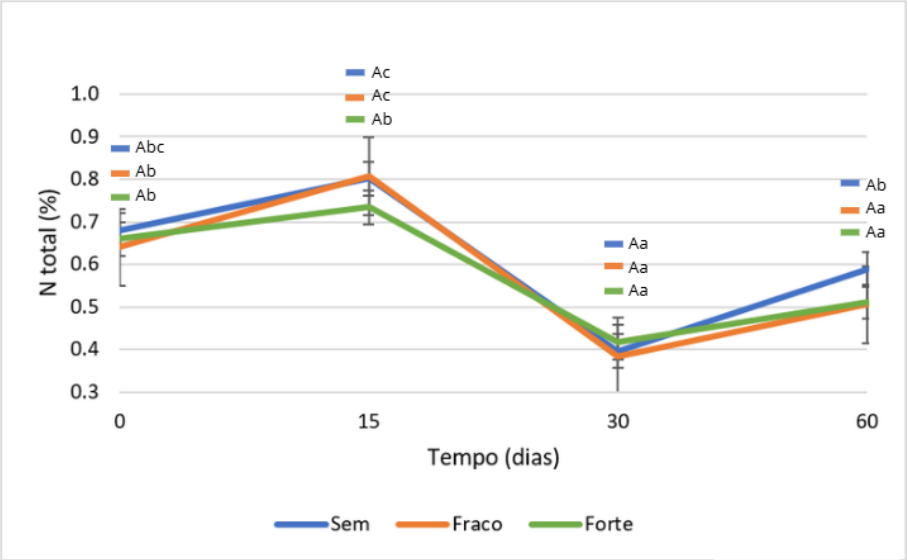


Figura 10: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,28) e interação tempoxdiluição (P=0,58); Erro padrão da média 0,0365.

Quando analisado o efeito do armazenamento dentro de cada nível de diluição, a concentração de N total (%) foi influenciada pelo tempo e pela interação tempo e armazenamento (p <0,01), sem efeito isolado do armazenamento dentro de cada tempo (figuras 11, 12 e 13). Esse resultado indica que as diferenças entre métodos de armazenamento são cumulativas ao longo do tempo, e não necessariamente detectáveis em avaliações pontuais, o que amplia a interação tradicional baseada apenas em comparações diretas entre tratamentos.

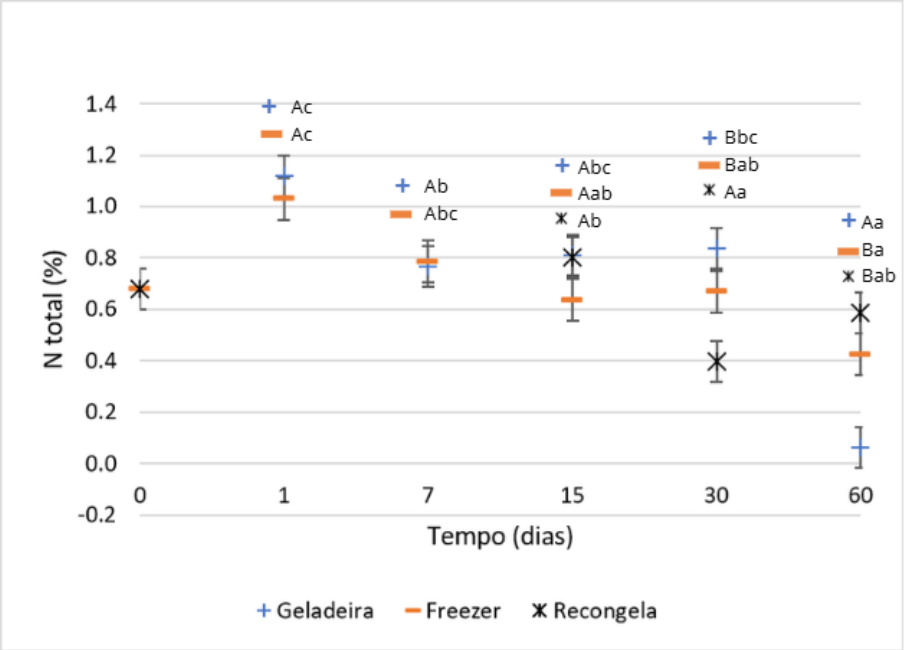


Figura 11: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,91) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0769.

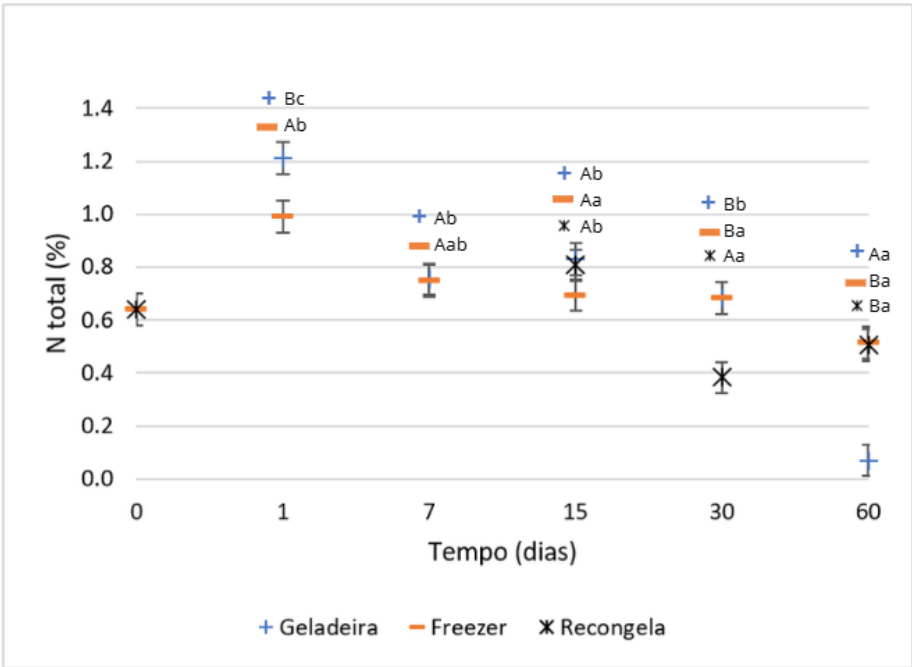


Figura 12: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,88) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0612.

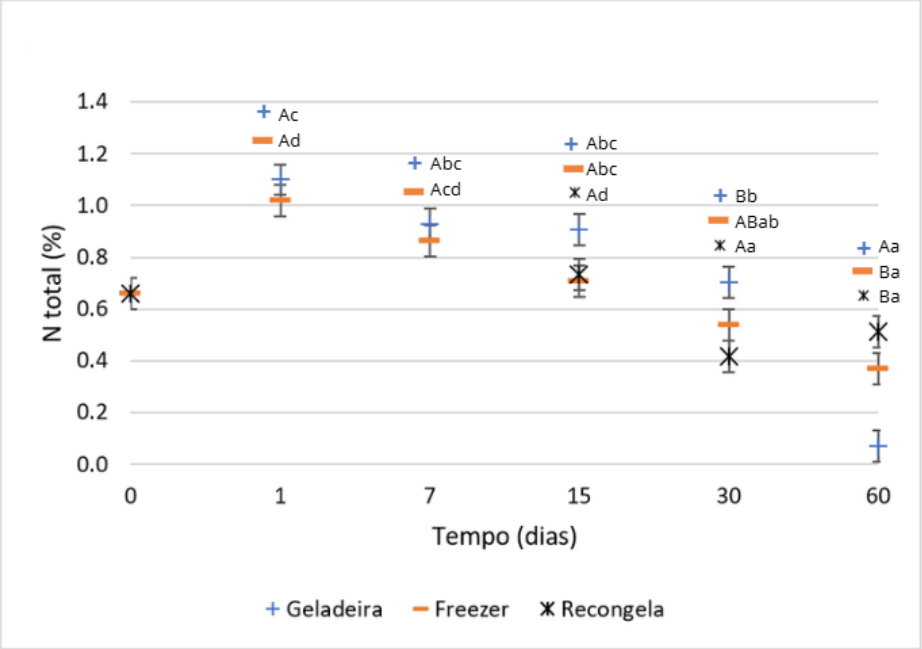


Figura 13: Respostas na concentração de N total (%) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P=0,52) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,0617.

Nesse contexto, foi observado um padrão consistente entre tratamentos, caracterizado por aumento inicial, estabilização e posterior redução, principalmente em períodos mais longos de armazenamento. Esse comportamento reforça o papel da volatilização de amônia como principal mecanismo de perda de N, particularmente em condições de pH elevado e armazenamento prolongado.

Além disso, os resultados ampliam a literatura ao demostrar que, embora a acidificação reduza parcialmente essas perdas, ela não é suficiente para garantir estabilidade completa ao longo do tempo (Silva Júnior et al., 2023 e Santos et al., 2019).

Por fim, os dados confirmam que o armazenamento em freezer é a estratégia mais eficiente para preservação de N urinário, enquanto a geladeira apresenta maior susceptibilidade a perdas em períodos prolongados, e o recongelamento promove maior instabilidade. Essa diferenciação contribui para o refinamento de protocolos experimentais, ao evidenciar não apenas qual método é mais adequado, mas também em quais condições cada método se torna limitante.

18.3 Ureia

A concentração média de ureia (mg/dL) na urina, foi significativamente influenciada pelo tempo de armazenamento (p <0,01), e em menor grau pela acidificação, com efeito dependente da condição de armazenamento. Na geladeira (figura 14) houve efeito do tempo, da diluição e da interação entre esses fatores (p <0,01), foi observado um padrão consistente entre os tratamentos.

Para amostras sem adição de ácido houve queda até o 7° dia (423,59; 376,80 e 254,68 mg/dL), um aumento acentuado até 15 dias (619,39 mg/dL) e queda até o dia 60 (578,43 e 199,43 mg/dL). As amostras com ácido fraco também apresentaram queda no tempo 7 dias (479,67; 373,61 e 243,16 mg/dL), seguido de aumento com 15 dias (631,17 mg/dL) e queda no dia 30 (620,39 mg/dL) sendo mais expressiva no dia 60 (235,83 mg/dL). O ácido forte seguiu o mesmo comportamento das amostras sem ácido e com ácido fraco, porém as amostras com ácido forte mantêm valores mais altos no dia 60 (441,15 mg/dL).

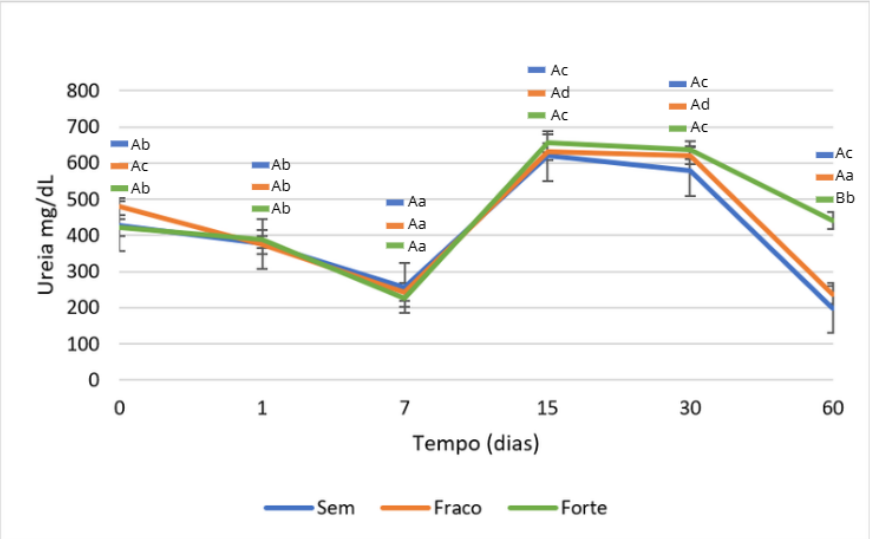


Figura 14: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 24,2007.

No freezer (figura 15), não teve efeito de acidificação (p=0,11), apresentou ser o armazenamento mais estável até 30 dias de analise para os tratamentos sem ácido, ácido fraco e ácido forte (537,95; 590,08 e 394,13 mg/dL). Além disso, foi observado um aumento

expressivo da concentração de ureia no tempo 60 dias em todos os tratamentos (5852,95; 9018,27 e 8278,22 mg/dL) independente da diluição da amostra, indicando forte efeito do congelamento na concentração de ureia, provavelmente devido à evaporação de água durante a formação de gelo e consequentemente concentração da fase líquida residual.

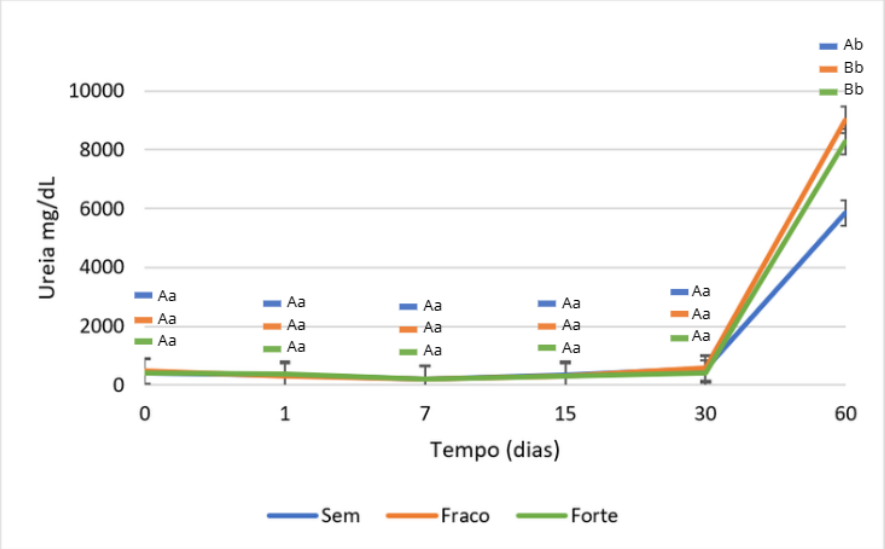


Figura 15: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,11) e interação tempoxdiluição (P<0,02); Erro padrão da média 441,0825.

No recongelamento (figura 16), assim como a geladeira as amostras apresentaram variação ao longo do tempo dentro de cada nível de ácido (p <0,03). Além disso, teve maior variação entre níveis de ácidos diferentes dentro de cada tempo, com aumento até 15 dias e redução até 60 dias, evidenciando que ciclos de congelamento e descongelamento promovem instabilidade na distribuição dos solutos. As amostras sem adição de ácido apresentaram ter mais instabilidade no tempo 60 dias, do que as amostras com ácido fraco. Já as amostras com ácido forte apresentaram um comportamento mais oscilatório, indicando que o recongelamento tem efeito sobre essa variável.

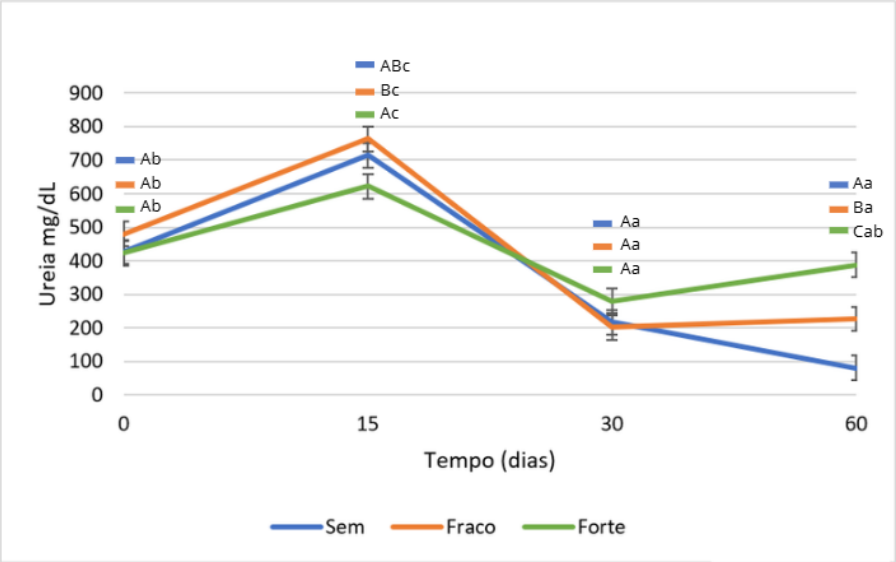


Figura 16: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,03) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 36,6319.

Nas figuras 17, 18 e 19 estão apresentas as respostas do efeito de armazenamento dentro de cada nível de diluição. Houve diferença para tempo, armazenamento e interação entre tempo e armazenamento (p <0,01).

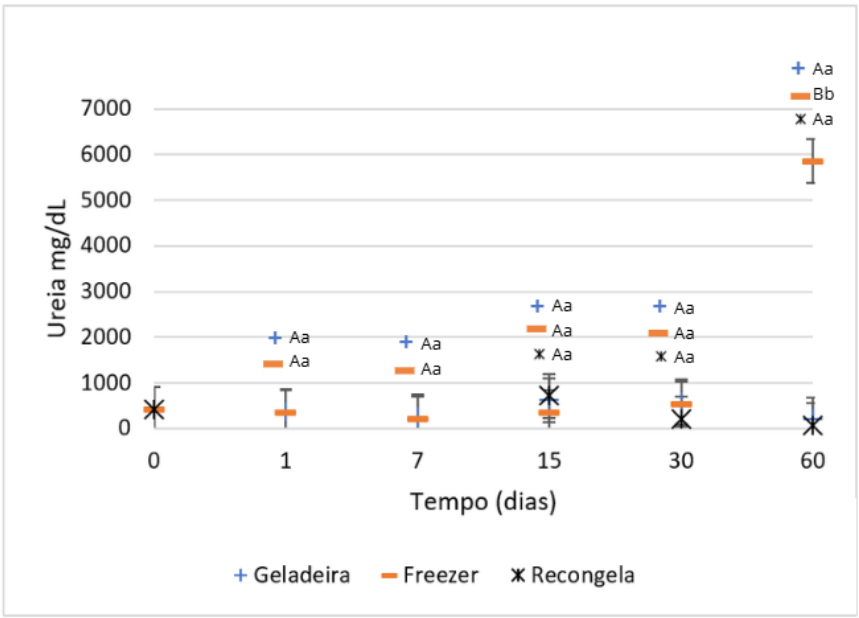


Figura 17: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de

ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 486,5927.

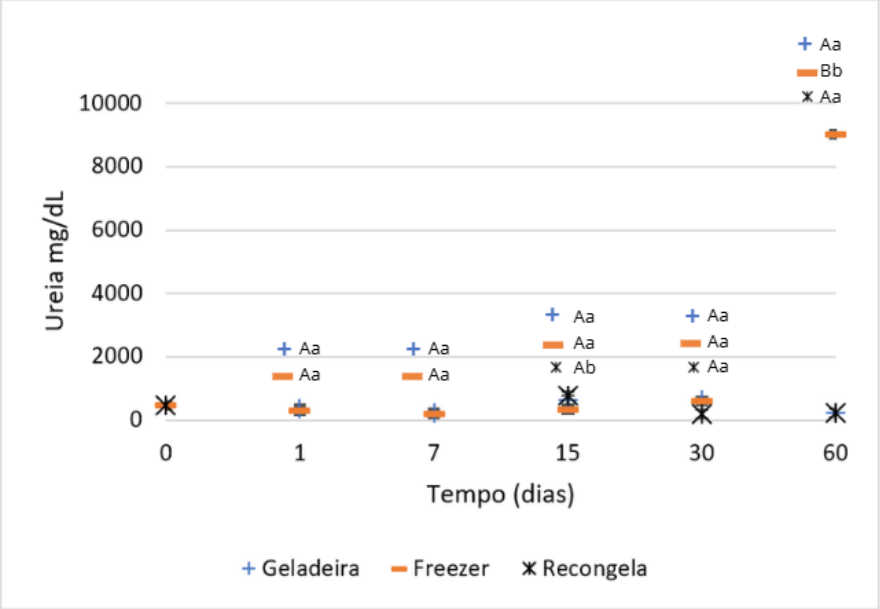


Figura 18: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 133,5572.

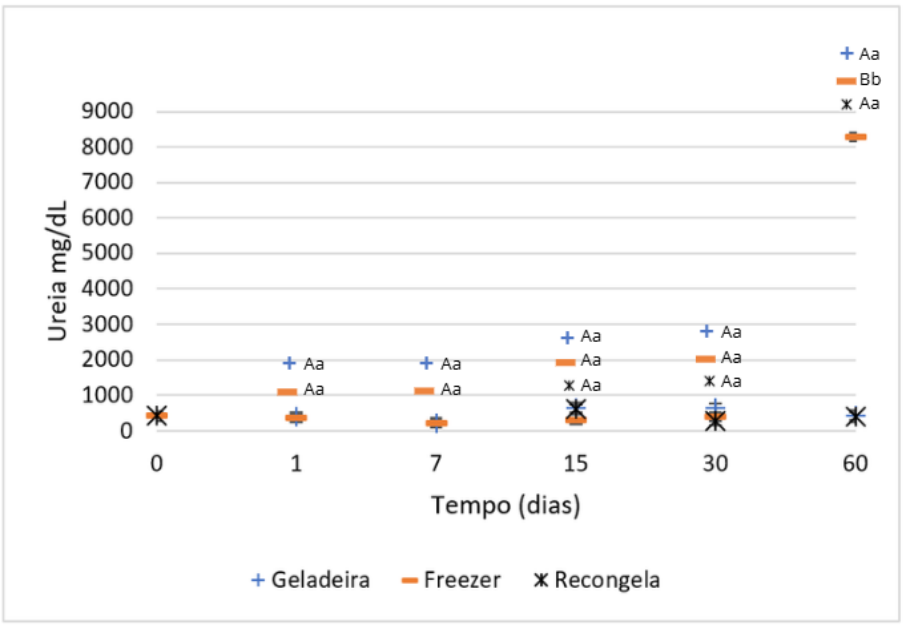


Figura 19: Respostas na concentração de ureia (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido

forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 129,0501.

As amostras armazenadas no freezer sem adição de ácido no dia 60 diferiram das demais tanto para diferenças entre níveis de armazenamento dentro de cada tempo, quanto para diferenças ao longo do tempo dentro de cada nível de diluição. O mesmo efeito foi observado para amostras com ácido fraco, porém no dia 15 teve diferença na comparação ao longo do tempo dentro de cada armazenamento. E as amostras com ácido forte apresentaram o mesmo comportamento das amostras sem adição de ácido. A principal forma de N na urina é a ureia, ela representa entre 50 e 90% do N total presente na urina de bovinos (Bristow et al., 1992), sendo o produto final do metabolismo do nitrogênio, sendo formada no fígado como parte do mecanismo de desintoxicação da amônia (NH3) presente na circulação sistêmica.

Em ruminantes, a amônia é produzida tanto pela atividade microbiana no rúmen e no intestino quanto pelo catabolismo de AA e outros CN no metabolismo intermediário ou pode ser parcialmente reutilizada pelos microrganismos (Dijkstra et al., 2013). Após sua síntese, ureia é transportada pelo sangue, podendo ser reciclada para o rúmen ou excretada pelos rins na urina, essa reciclagem torna a concentração urinaria de ureia sensível a alterações no balanço entre produção, reutilização e excreção. Por outro lado, a amônia está presente na urina apenas em pequenas quantidades e podendo resultar na hidrolise da ureia durante o armazenamento das amostras antes das análises (Bristow et al., 1992). Dessa forma, as variações observadas na concentração de ureia nas amostras do presente estudo, pode ser explicada devido ao fato dessas amostras não refletirem apenas processos metabólicos, mas também a possíveis alterações físicas e químicas ocorridas durante o armazenamento e análise das amostras.

Os resultados sugerem que diferentemente, do ácido úrico, a ureia não sofre precipitação, e suas oscilações estão associadas a efeitos da amostra, sendo o congelamento prolongado a principal fonte de variação dos valores analisados. Dessa forma, para análise de ureia sugere-se que ela seja armazenada o freezer a -20°C por até 30 dias, independente da forma de diluição da urina.

18.4 Creatinina

A concentração de creatinina (mg/dL) na urina foi significativamente influenciada pelo tempo de armazenamento e pela condição de acidificação (p <0,02), com respostas dependentes do tipo de armazenamento, especialmente em geladeira e freezer. Esses resultados indicam,

embora a creatinina seja frequentemente utilizada como marcador relativamente estável em estudos metabólicos (Valadares et al., 1999; Barbosa et al., 2006; Chizzotti et al., 2007; Silva Júnior et al., 2023), sua concentração pode ser alterada por condições físico-químicas da amostra ao longo do tempo.

Do ponto de vista fisiológico, a creatinina é formada pela degradação da creatina e da fosfocreatina no tecido muscular. Por ser um produto do metabolismo muscular, sua excreção está diretamente relacionada à massa muscular do animal e, de modo geral, apresenta baixa influência da dieta, sendo amplamente utilizada como marcador indireto do volume urinário (Chizzotti et al., 2007). No entanto, existe considerável variação entre animais, conforme descrito por Tas e Susenbeth (2007), o que deve ser considerado na interpretação dos resultados experimentais. Nesse contexto, as variações observadas neste estudo não podem ser atribuídas exclusivamente a diferenças metabólicas, indicando forte influência das condições de armazenamento e análise.

Em geladeira (figura 20), foi observado um padrão consistente entre tratamentos, com instabilidade na concentração até 7 dias, seguida de recuperação e estabilização após 15 dias. Esse comportamento sugere a ocorrência de ajustes na matriz da amostra nos primeiros dias de armazenamento, possivelmente relacionados à redistribuição de solutos ou a reações químicas iniciais.

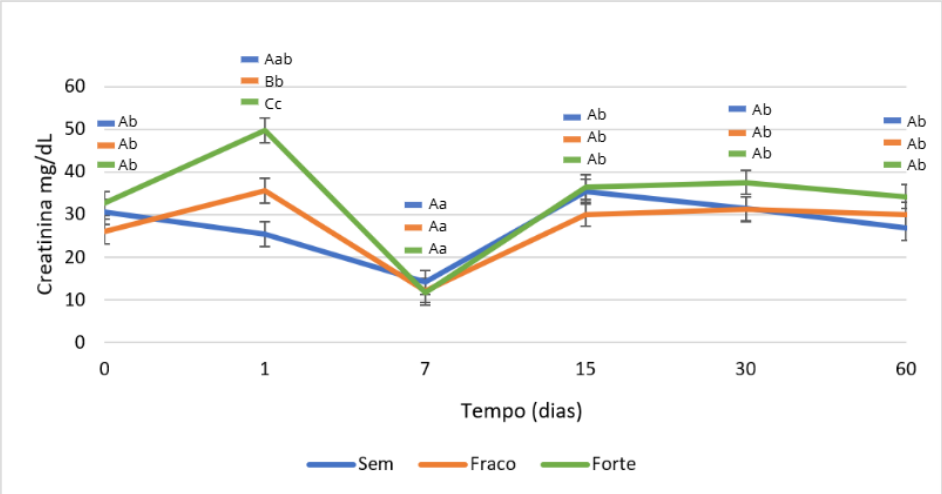


Figura 20: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 2,8711.

No armazenamento em freezer (figura 21), foi observado um padrão semelhante ao da geladeira nos primeiros dias, porém com maior variabilidade ao longo do tempo, principalmente nos tratamentos com ácido forte. Embora o congelamento seja amplamente descrito com a melhor estratégias para preservação de compostos urinários, os resultados demostraram que ainda ocorrem oscilações na concentração de creatinina. Esse comportamento sugere que o congelamento reduz, mas não elimina completamente alterações na amostra, possivelmente devido à formação de gelo e consequentemente redistribuição de solutos. Embora a literatura frequentemente considere o armazenamento sob congelamento como uma condição relativamente estável (Silva Júnior et al., 2023), os resultados deste estudo indicam que essa estabilidade é relativa e dependente do tempo de armazenamento.

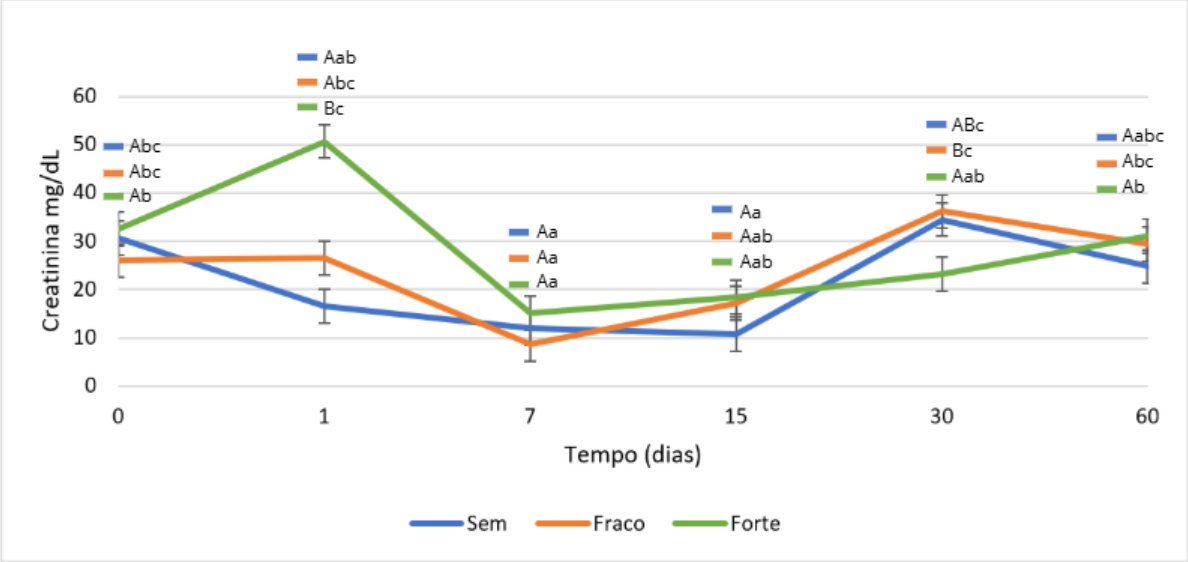


Figura 21: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 3,5045.

Para as amostras submetidas ao recongelamento (figura 22), foi observada maior instabilidade, com queda acentuada na concentração de creatinina até 15 dias, seguida de recuperação parcial. Esse padrão é compatível com o efeito de ciclos de congelamento e descongelamento, que promovem desorganização da matriz e redistribuição de solutos.

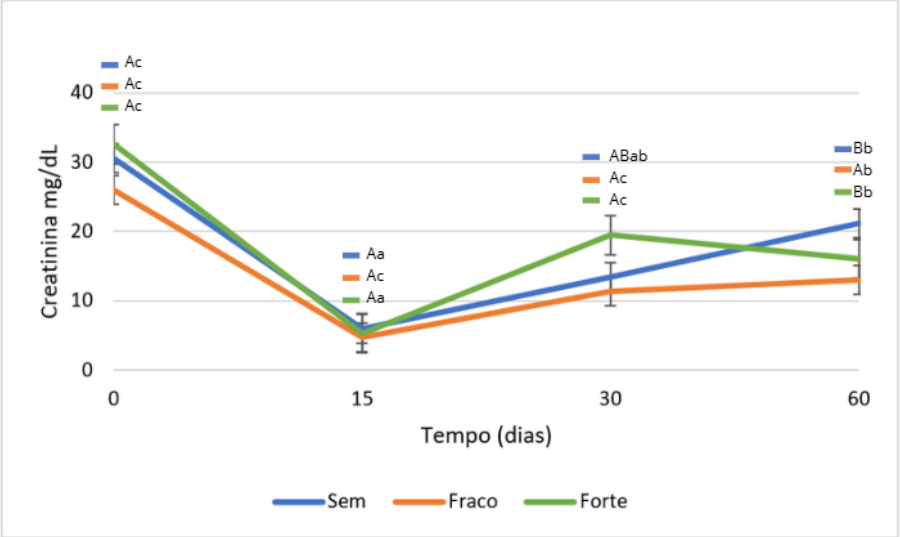


Figura 22: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P=0,15); Erro padrão da média 2,0802.

Quando avaliado o efeito do armazenamento dentro de cada nível de diluição (figuras 23, 24 e 25), verificou-se que a creatinina foi influenciada pelo tempo, pelo tipo de diluição e pela interação entre esses fatores na ausência de ácido (p <0,01).

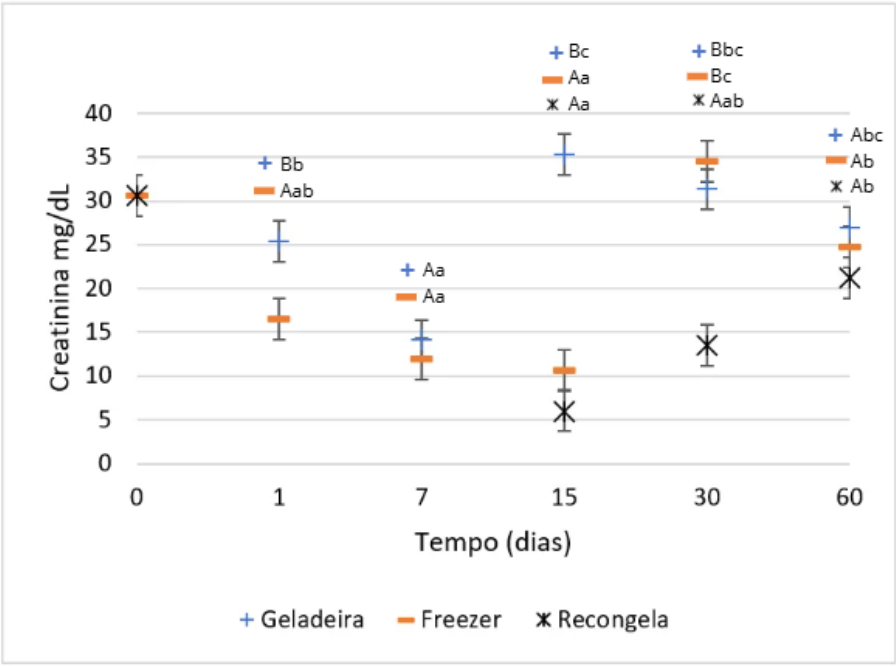


Figura 23: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de

ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 2,3306.

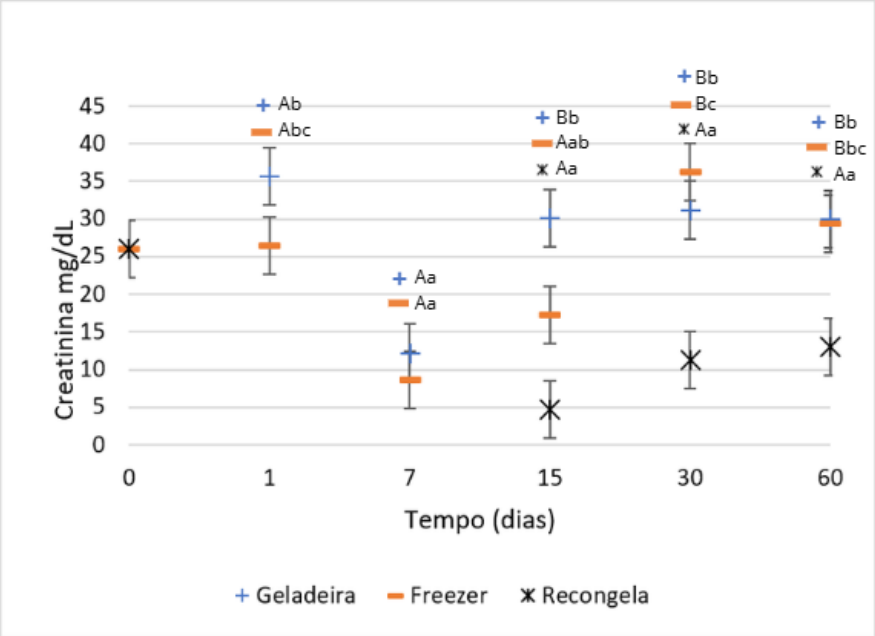


Figura 24: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P=0,27); Erro padrão da média 3,7693.

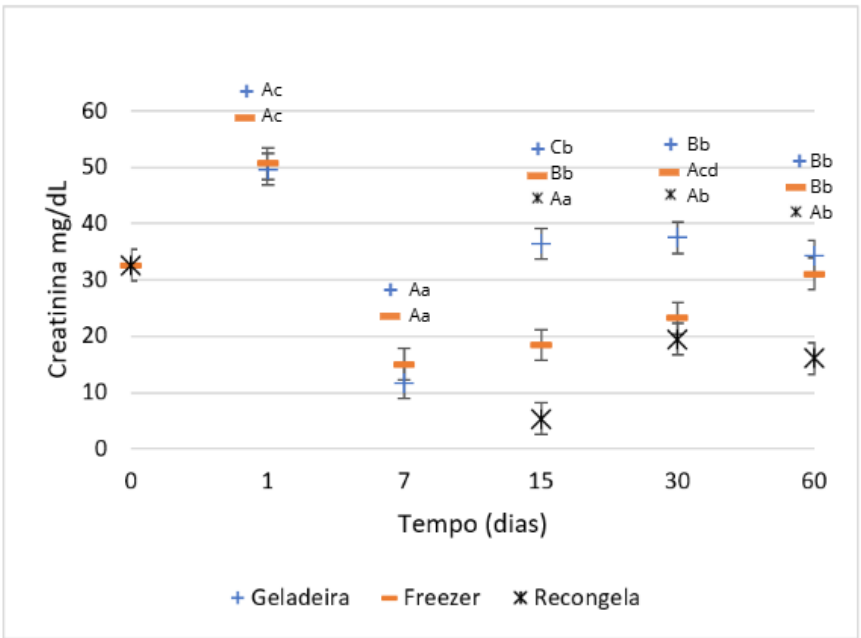


Figura 25: Respostas na concentração de creatinina (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido

forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 2,7920.

O armazenamento em geladeira apresentou maior estabilidade relativa, enquanto freezer e recongelamento mostraram maior variabilidade, especialmente nos tempos iniciais. Esses resultados reforçam que o comportamento da creatinina não depende apenas da temperatura, mas também da interação entre diluição e condições físicas e químicas da amostra.

A utilização de ácido fraco resultou em um padrão mais uniforme entre os métodos de armazenamento, sugerindo que a acidificação moderada contribui para reduzir variações na matriz urinária. Por outro lado, o uso de ácido forte promoveu maior variabilidade e intensificou as diferenças entre tratamentos, indicando que níveis elevados de acidificação podem alterar a dinâmica da amostra. Esse achado contrasta parcialmente com a exceptiva de que a acidificação promova estabilidade, sugerindo que o excesso de ácido pode induzir efeitos indesejáveis na quantificação da creatinina.

Adicionalmente, é importante considerar que a determinação da creatinina foi realizada por meio de kit químico baseado na reação colorimétrica de Jaffé, na qual a creatinina reage com ácido pícrico em meio alcalino, formando um composto de coloração alaranjado-avermelhada cuja intensidade é proporcional à sua concentração (Joris e Speeckaert, 2011). No entanto, esse método apresenta baixa especificidade, uma vez que outros compostos presentes na urina podem reagir com o reagente, formando cromógenos semelhantes. Dessa forma, alterações na composição da amostra ao longo do armazenamento, como degradação de CN ou mudanças de pH, podem interferir na resposta analítica, contribuindo para parte das variações observadas. Assim, os efeitos atribuídos ao armazenamento e à acidificação podem refletir não apenas alterações reais na concentração de creatinina, mas também interferências inerentes ao método analítico utilizado.

Outro composto relevante na matriz urinária é o ácido hipúrico, uma acilglicina formada no fígado pela conjugação de ácido benzoico com glicina. Os principais precursores de ácido benzoico são compostos fenólicos da dieta, que são convertidos em ácido 3-fenilpropiônico durante a fermentação microbiana no rúmen (Martin, 1992). A presença de metabólitos como o ácido hipúrico pode contribuir para a complexidade da matriz urinária, influenciando propriedades químicas da amostra e potencialmente interferindo em métodos analíticos baseados em reações colorimétricas. Assim, a variabilidade observada na creatinina pode também estar associada à dinâmica de outros compostos orgânicos presentes na urina.

Contudo, os resultados demonstram que a estabilidade da creatinina urinária é fortemente dependente do tempo de armazenamento, da temperatura e no nível de acidificação, contrariando a suposição de invariabilidade frequentemente adotada em estudos experimentais. Essa variabilidade tem implicações diretas para a utilização da creatinina como marcador, especialmente em analises que envolvem relações entre compostos, nas quais pequenas variações podem ser amplificadas. Assim, os dados deste estudo não apenas confirmam a sensibilidade da creatinina às condições de armazenamento, como também ampliam o entendimento ao demonstrar que diferentes estratégias de conservação podem afetar de forma distinta sua estabilidade, sendo a geladeira a condição mais estável no curto prazo, enquanto o recongelamento representa a condição de maior instabilidade.

18. 5 Ácido úrico

Os efeitos da acidificação (diluição) do ácido úrico (mg/dL) diferiram entre as condições de armazenamento e ao longo do tempo ($p < 0,01$). No dia 0 foi observado efeito consistente da acidificação, com menores valores para a condição de ácido forte (19,09 mg/dL) em comparação às demais, indicando impacto imediato do tratamento.

Para amostras armazenadas em geladeira (figura 26), o efeito de ácido foi mantido ao longo do tempo, porém de forma inconsistente entre os tempos, sem um padrão claro de resposta à intensidade de acidificação. A diluição com ácido fraco apresentou valores superiores ao tratamento sem ácido nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias, enquanto o ácido forte apresentou comportamento intermediário nos tempos 30 e 60 dias.

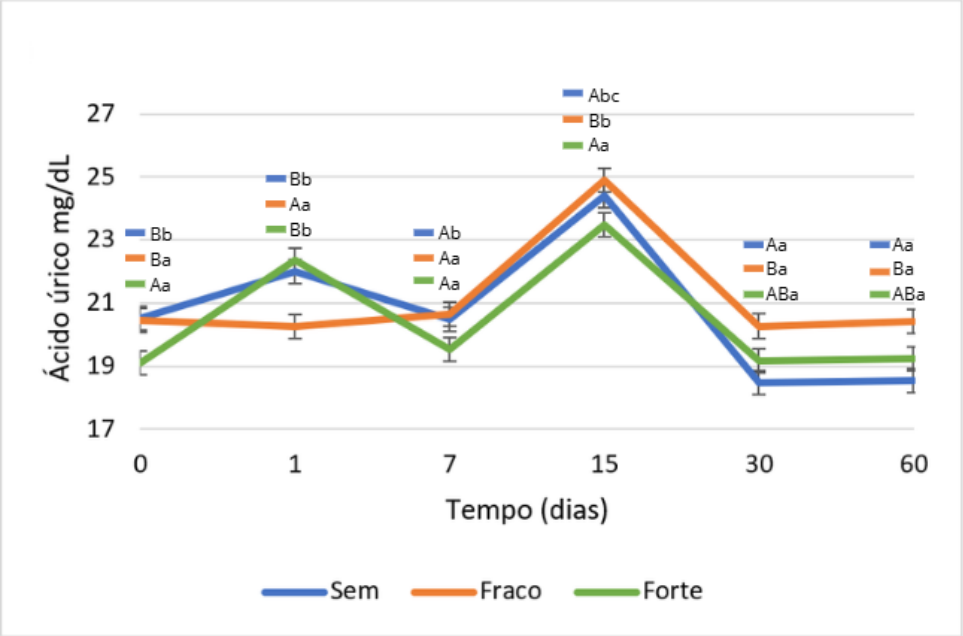


Figura 26: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 0,3834.

As amostras armazenadas no freezer (figura 27), não foram observadas diferenças entre os níveis de ácido em nenhum dos tempos avaliados (p=0,10) e não foram observadas diferenças na interação entre tempo e diluição (p=0,11), sugerindo estabilidade do ácido úrico independentemente da diluição da urina. A ausência de diferenças entre os níveis de acidificação em amostras armazenadas no freezer reforça o papel da baixa temperatura na estabilização do ácido úrico, indicando que o congelamento pode reduzir a necessidade de acidificação para esse analito específico. Esse achado amplia a interpretação da literatura, que frequentemente recomenda o uso combinado de acidificação e congelamento.

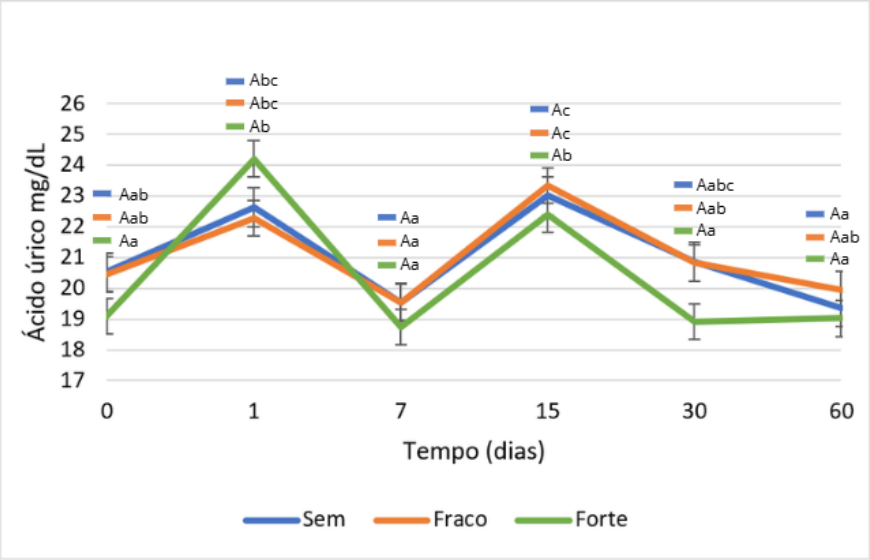


Figura 27: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P=0,10) e interação tempoxdiluição (P=0,11); Erro padrão da média 0,5787.

No caso de amostras sob recongelamento (figura 28), apesar do tempo 0 ter apresentado diferenças entre as diluições devido a diferenças na concentração de ácido, essas não persistiram ao longo do tempo, com ausência de efeito de ácido nos tempos 15, 30 e 60 dias. Por outro lado, não houve diferença na interação entre diluição e tempo (p=0,21).

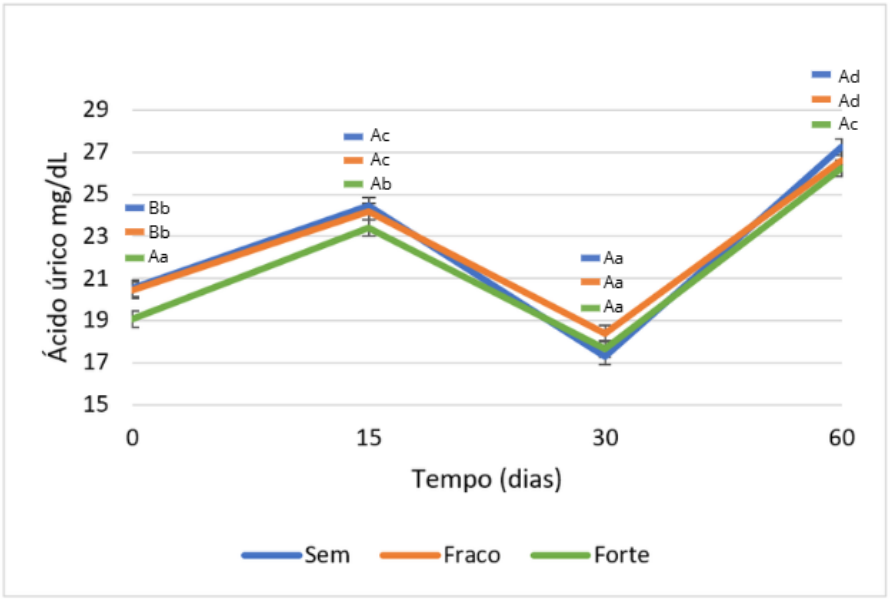


Figura 28: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos

estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P=0,21); Erro padrão da média 0,3924.

Esses resultados indicam que o efeito da acidificação sobre a estabilidade do ácido úrico não é consistente entre as condições de armazenamento. Embora a acidificação seja frequentemente recomendada para conservação de amostras urinárias, os dados demostram que seu efeito é mais evidente em condições de refrigeração e praticamente inexistente sob congelamento, sugerindo que a temperatura exerce papel mais determinante na estabilidade desse composto.

Nas figuras 29, 30 e 31, estão apresentadas as respostas do efeito de armazenamento dentro de cada tipo de diluição, considerando apenas os tempos (1, 7, 15, 30 e 60 dias), incluindo os valores do tempo 0 apenas para visualização do ponto de partida dos valores.

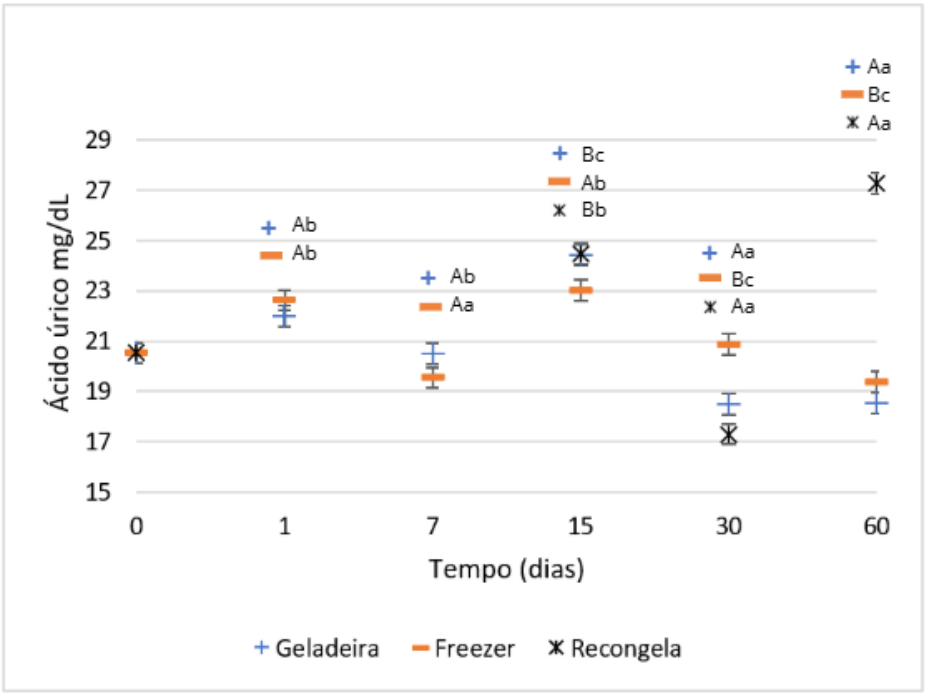


Figura 29: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,4055.

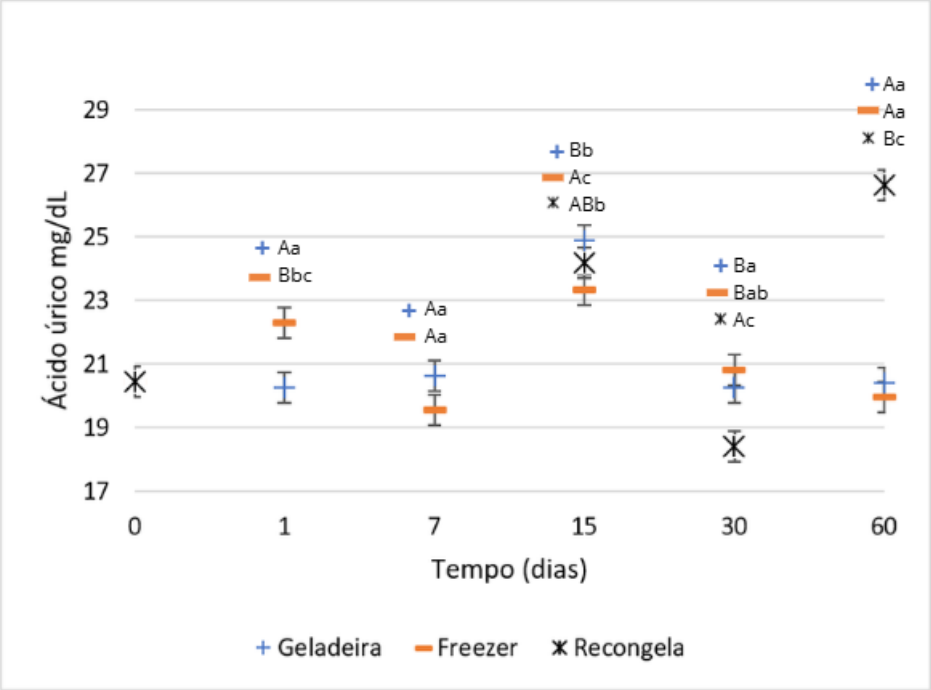


Figura 30: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,4759.

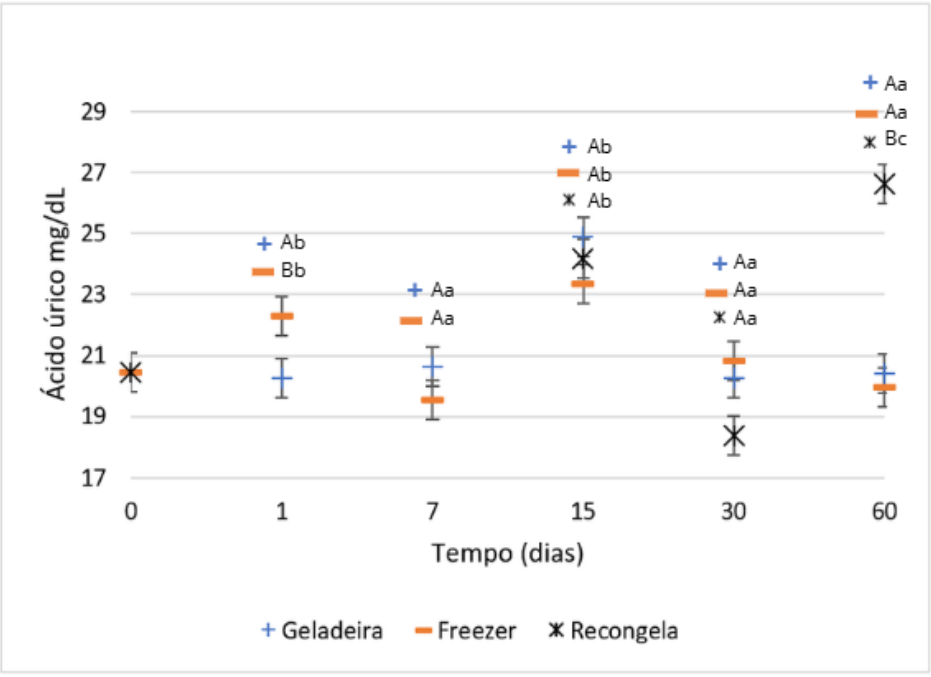


Figura 31: Respostas na concentração de ácido úrico (mg/dL) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido

forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 0,6393.

Houve efeito significativo do tempo de armazenamento (p <0,01), do tipo de armazenamento (p <0,01) e da interação entre esses fatores (p <0,01) para os três tipos de diluição sobre a variável ácido úrico (mg/dL). Foi observado efeito ao longo do tempo dentro de cada método de armazenamento, com diferenças detectadas a partir de 15 dias. Para amostras armazenadas sob refrigeração, teve um aumento aos 15 dias e redução nos tempos subsequentes 30 e 60 dias. O mesmo foi observado para as amostras armazenadas em freezer, teve menos variabilidade que as amostras armazenadas na geladeira, porém ainda teve efeito de tempo.

A amostras mantidas sob recongelamento apresentou maior instabilidade ao longo do tempo, com redução no dia 30 e aumento acentuado no dia 60, esse efeito foi observado para os três tipos de diluição. Além disso, foi observado diferenças entre métodos de armazenamento com evidencias em tempos específicos, principalmente em períodos prolongados, onde o recongelamento deferiu dos demais tratamentos. Dessa forma, os resultados indicam que tanto o tempo quanto a forma de armazenamento influenciam na resposta da concentração de ácido úrico, com comportamento dependente da interação entre esses fatores.

Esse comportamento indica que processos físicos e químicos associados à conservação das amostras, como degradação, transformação de compostos ou concentração por perda de água, podem influenciar os resultados ao longo do tempo. Por outro lado, o ácido úrico é suscetível à degradação oxidativa, podendo ser convertido em alantoína, principalmente em condições de armazenamento prolongado e na presença de oxigênio dissolvido.

No caso de amostras submetidas ao recongelamento, que apresentou maior variabilidade, sugere que ciclos de congelamento e descongelamento propicia uma redistribuição do ácido úrico entre as fases solúvel e precipitada e também intensifica os processos de oxidação. Yamakita et al. (2000), mostraram que a concentração de ácido úrico na urina pode reduzir de forma significativa após longos períodos de armazenamento, o que pode explicar a queda no dia 30. Entretanto, a variação na concentração de ácido úrico ao longo do armazenamento não deve ser atribuída exclusivamente à degradação química. Em condições de baixo pH e baixa temperatura, o ácido úrico apresenta baixa solubilidade, podendo precipitar na forma de cristais, o que reduz sua fração dissolvida na amostra. Como a maioria dos métodos analíticos quantifica predominantemente a fração solúvel, esse processo pode levar à subestimação da concentração real do composto.

A formação de cristais de ácido úrico durante o congelamento e sua dissolução incompleta após descongelamento também, pode contribuir para uma maior variação nos dados. Modificações nas condições da amostra, como alteração do pH, elevação da temperatura ou falhas na homogeneização das amostras, podem promover a redissolução de cristais. Essa redissolução aumenta a fração de ácido úrico presente na fase líquida, transformando novamente disponível para detecção, que leva a um aumento na concentração mensurada, que não reflete um aumento real na quantidade total de ácido úrico, mas sim uma redistribuição entre fase sólida e líquida da amostra.

Esses mecanismos indicam que o armazenamento prolongado, principalmente com recongelamento, compromete a confiabilidade da concentração de ácido úrico, reforçando a necessidade de padronização dos métodos de conservação da amostra. Portanto, as alterações na concentração de ácido úrico ao longo do tempo de armazenamento têm efeitos diretos na interpretação dos derivados de purinas como indicador da síntese de Pmic.

Porém, a instabilidade observada para o ácido úrico, principalmente em condições de armazenamento prolongado e recongelamento, pode comprometer essa estimativa. A possível oxidação de ácido úrico a alantoína durante o armazenamento pode superestimar a fração de alantoína e subestimar a de ácido úrico.

Contudo, os resultados deste estudo não apenas confirmam a sensibilidade do ácido úrico às condições de armazenamento, como também ampliam a compreensão dos mecanismos envolvidos, destacando o papel de processos físicos e químicos, além das transformações químicas tradicionais. Esses achados reforçam a necessidade de padronização rigorosa dos protocolos de conservação de amostras urinárias, principalmente em estudos que utilizam DP como indicadores metabólicos.

18.6 Alantoína

A concentração de alantoína (µmol/dL), foi significativamente influenciada pelo tempo de armazenamento, pela acidificação e pela interação entre esses fatores ($p < 0,01$), indicando elevada sensibilidade desse composto às condições de conservação. Embora a alantoína seja frequentemente considerada o DP mais estável, os resultados demonstram variações significativas ao longo do armazenamento, sugerindo que sua estabilidade pode ser superestimada em condições experimentais.

Nas amostras armazenadas em geladeira (figura 32), foi observado redução progressiva da concentração ao longo do tempo, com queda acentuada após 7 dias. Esse comportamento

está de acordo com estudos que indicam degradação de compostos urinários durante o armazenamento (Chen e Gome, 1995), porém os resultados ampliam esse entendimento ao demonstrar que a estabilidade da alantoína é limitada mesmo em condições refrigeradas. A acidificação com ácido fraco apresentou efeito parcial na manutenção da concentração, enquanto o uso de ácido forte promove maior oscilação, indicando que níveis elevados de acidez podem comprometer a estabilidade da amostra, ao invés de preservá-la.

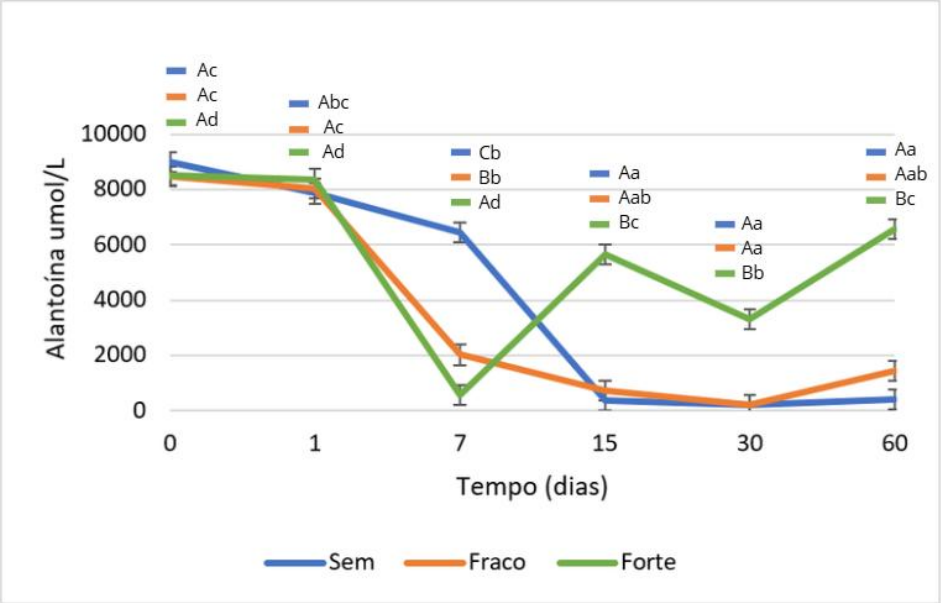


Figura 32: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em geladeira à 4°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 361,1588.

No armazenamento em freezer (figura 33), foi observada redução nas amostras sem ácido e com ácido fraco desde o primeiro dia, indicando que, embora o congelamento seja amplamente recomendado como estratégia de conservação, ele não impede completamente alterações na concentração de alantoína. Esse resultado refina a interpretação da literatura ao evidenciar que o congelamento reduz, mas não ilumina processos de degradação ou redistribuição de solutos. A ausência de efeito consistente da diluição dentro de cada tempo reforça que a variação observada está mais associada às condições de armazenamento do que à preparação da amostra.

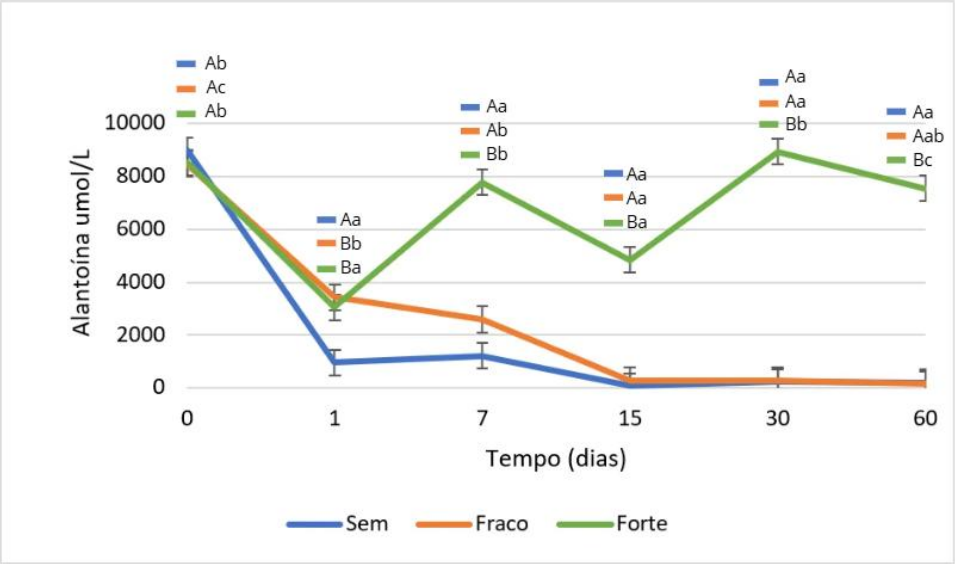


Figura 33: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas em freezer à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 485,4712.

Para as amostras submetidas ao recongelamento (figura 34), foi observado comportamento semelhante ao do freezer, porém com maior instabilidade. Esse padrão indica que ciclos repetidos de congelamento e descongelamento promovem alterações na distribuição dos compostos, contribuindo para oscilações na concentração mensurada. Esses resultados ampliam a compreensão da literatura ao evidenciar que a variabilidade não está relacionada apenas a degradação química, mas também a processos físicos e químicos, como redistribuição entre fases.

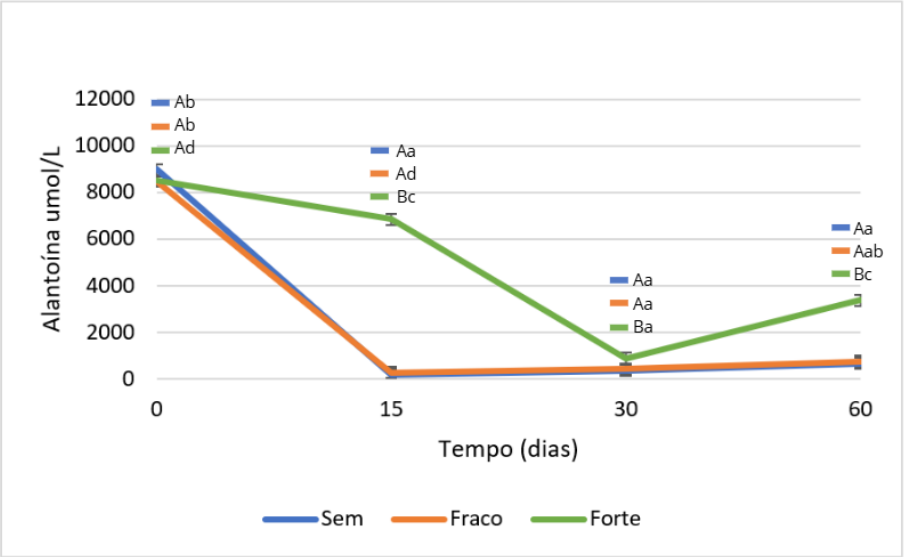


Figura 34: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes diluições de amostras de urina de vacas leiteiras, armazenadas sob recongelamento à -20°C. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), diluição (P<0,01) e interação tempoxdiluição (P<0,01); Erro padrão da média 263,0464.

A variação observada na alantoína pode estar diretamente relacionada à dinâmica do ácido úrico, uma vez que a alantoína é formada a partir de sua oxidação. Assim, processos como precipitação, redissolução e degradação do ácido úrico podem influenciar indiretamente a concentração de alantoína.

Quando avaliado o efeito do armazenamento dentro de cada nível de diluição (figuras 35, 36 e 37), foi observado que a concentração de alantoína foi influenciada pelo tempo, pelo tipo de armazenamento e pela interação entre esses fatores (p <0,01), independentemente da diluição.

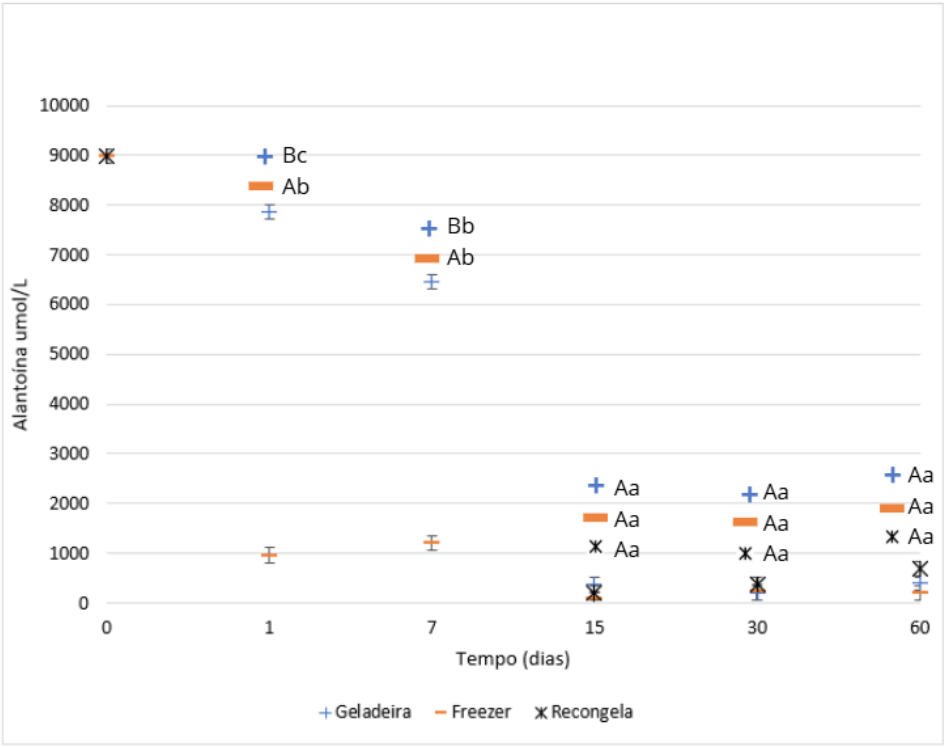


Figura 35: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, água destilada sem adição de ácido. Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 151,4889.

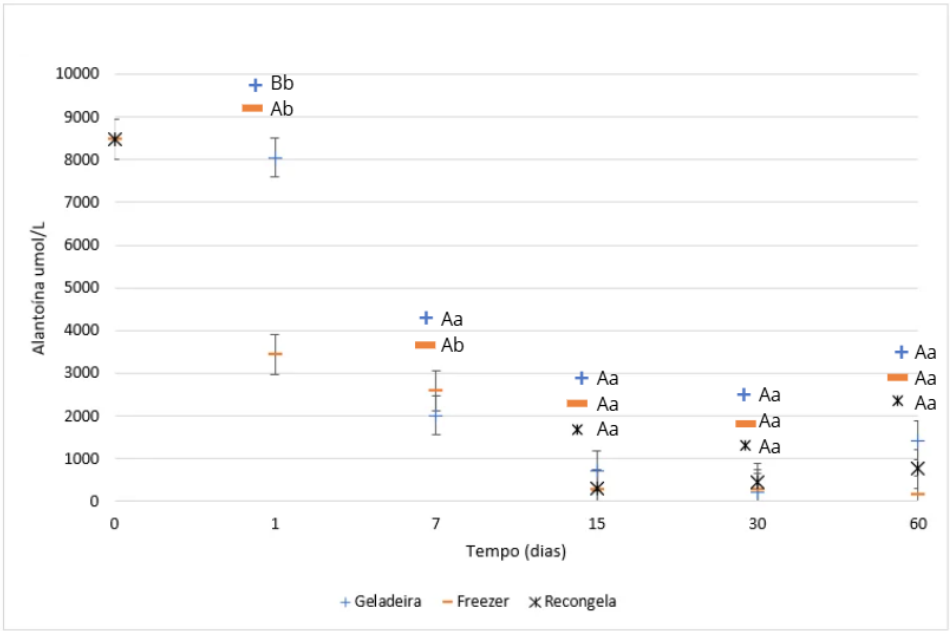


Figura 36: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,036 M de H2SO4 (ácido

fraco). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 458,0528.

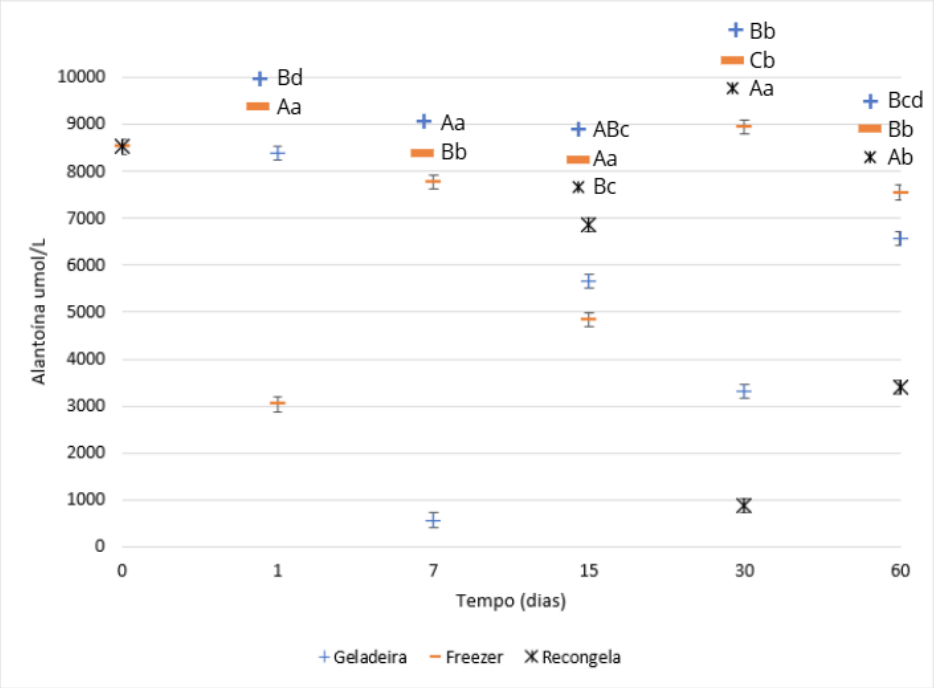


Figura 37: Respostas na concentração de alantoína (µmol/L) submetidas à diferentes armazenamentos de amostras de urina de vacas leiteiras, com solução 0,41 M de H2SO4 (ácido forte). Efeitos estatísticos: tempo (P<0,01), armazenamento (P<0,01) e interação tempoxamaz. (P<0,01); Erro padrão da média 556,5155.

O armazenamento em freezer apresentou maior estabilidade relativa, principalmente sob acidificação moderada, enquanto o recongelamento promoveu maior variabilidade. Por outro lado, o uso de ácido forte intensificou as oscilações em todas as condições avaliadas, indicando maior sensibilidade do sistema à acidificação intensa.

Portanto, os resultados demostram que a alantoína não apresenta estabilidade absoluta durante o armazenamento, sendo influenciada por fatores físico-químicos e pela dinâmica de outros compostos urinários, como o ácido úrico. Esses achados têm implicações diretas na utilização dos DP como indicadores da síntese de Pmic, uma vez que variações na concentração de alantoína podem não refletir alterações reais na produção de Pmic, mas sim instabilidade da amostra. Dessa forma, este estudo não apenas confirma a sensibilidade da alantoína às condições de armazenamento, como também amplia o entendimento dos mecanismos envolvidos, destacando a necessidade da padronização rigorosa dos protocolos de conservação de urina.

19. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demostram que a estabilidade dos compostos nitrogenados na urina de bovinos é fortemente dependente das condições de armazenamento, do tempo e do nível de diluição da amostra, evidenciando que esses fatores devem ser cuidadosamente controlados para garantir a confiabilidade das análises. De forma geral, o tempo de armazenamento foi o principal fator de variação para todas as variáveis avaliadas, enquanto a diluição da urina não exerceu influência significativa sobre a quantificação dos compostos quando devidamente considerada nos cálculos.

O armazenamento em freezer apresentou maior estabilidade relativa para a maioria dos compostos, especialmente quando associado à acidificação com ácido fraco, enquanto a geladeira mostrou maior variação ao longo do tempo e o recongelamento foi a condição mais crítica, promovendo instabilidade significativa em todas as variáveis avaliadas. Adicionalmente, a acidificação não apresentou efeito uniforme, sendo que níveis moderados contribuíram para maior padronização das amostras, enquanto acidificação com ácido forte aumentou a variabilidade, indicando que seu uso deve ser criterioso.

De forma integrada, os resultados deste estudo demonstram que alterações na composição da urina durante o armazenamento podem comprometer a interpretação de indicadores metabólicos amplamente utilizados, como a excreção de nitrogênio e a estimativa de síntese de Pmic a partir dos DP. Assim, este trabalho não apenas confirma a sensibilidade desses compostos às condições de conservação, como também amplia o entendimento dos mecanismos envolvidos, destacando o papel de processos físico-químicos, além das transformações químicas.

Portanto, recomenda-se que as amostras de urina destinadas à análise de CN sejam armazenadas preferencialmente sob congelamento contínuo, evitando ciclos de descongelamento, e que a acidificação seja realizada com adição de ácido sulfúrico à 0,036 M (ácido fraco), com padronização rigorosa dos protocolos experimentais. A adoção dessas práticas é essencial para reduzir variações analíticas e garantir maior precisão na interpretação dos resultados em estudos de metabolismo e nutrição de ruminantes.

20. REFERÊNCIAS

ANTONIEWICZ, A. M., W. W. HEINEMANN, AND E. M. HANKS. 1979. Factors affecting allantoin excretion in sheep urine. Ann. Rech. Vet. 10:300–302.

BLAXTER KL 1962. The energy metabolism of ruminants. Hutchinson Scientific and Technical, London, UK.

BARBOSA, ANA LÍVIA MARTINS et al. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore1. R. Bras. Zootec., v.35, n.3, p.870-877, 2006.

BRISTOW AW, WHITEHEAD DC AND COCKBURN JE 1992. Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep, and goats. Journal of the Science of Food and Agriculture 59, 387–394.

BRODERICK, G. A., AND N. R. MERCHEN. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. J. Dairy Sci. 75:2618– 2632.

BRODERICK, G. A., AND K. A. ALBRECHT. 1997. Ruminal in vitro degradation of protein in tannin-free and tannin- containing forage legume species. Crop Sci. 37:1884–1891.

BRODERICK, G. A., AND S. M. REYNAL. 2009. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 92:2822–2834.

BRODERICK, G.A., CLAYTON, M.K. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. J. Dairy Sci., 80:2964-2971.

CALSAMIGLIA, S., A. FERRET, C. K. REYNOLDS, N. B. KRISTENSEN, E A. M. VAN VUUREN. 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. Animal 4(7):1184-1196.

CHEN, X. B.; MATHIESON, J.; HOVELL, F. D. D.; AND REEDS, P. J. 1990. Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. Journal of Scientific Food Agriculture 53:23-33.

CHEN, X. B., AND M. J. GOMES. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK.

CHEN, X.B.; MEJIA, A.T.; ORSKOV, E.R. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. Journal of Agricultural Science, v.125, p.137-143, 1995.

CHIZZOTTI, M. L., S. C. VALADARES FILHO, R. F. D. VALADARES, F. H. M. CHIZZOTTI, AND L. O. TEDESCHI. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. Livest. Sci. 113:218–225.

DIJKSTRA, J., O. OENEMA, J. W. VAN GROENIGEN, J. W. SPEK, A. M. VAN VUUREN, AND A. BANNINK. 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N2O emissions. Animal 7(Suppl. 2):292–302. Eckard, R. J., C. Grainger, e C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. Livestock Sci. 130(1- 3):47-56.

FLEMING, S.A.; HUNT, E.L.; RIVIERE, J.E. et al. Renal clearance and fractional excretion of eletrolytes over four 6-hour periods in cattle. American Journal Veterinary Research, v.52, n.1, p.5-8, 1991.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. Journal of Agricultural Science, v.109, n.1, p.7-12, 1987.

FUJIHARA, T., AND M. N. SHEM. 2011. Metabolism of microbial nitrogen in ruminants with special reference to nucleic acids. Anim. Sci. J. 82:198–208.

HRISTOV, A.N.; BANNINK, A.; CROMPTON, L.A.; HUHTANEN, P.; KREUZER, M.; MCGEE, M.; NOZIÈRE, P.; REYNOLDS, C.K.; BAYAT, A.R.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. J. Dairy Sci. 2019, 102, 5811–5852.

JORIS R. DELANGHE, MARIJN M. SPEECKAERT, Creatinine determination according to Jaffe what does it stand for?, NDT Plus, Volume 4, Issue 2, April 2011, Pages 83–86.

LAPIERRE, H., AND G. E. LOBLEY. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. J. Dairy Sci. 84(E. Suppl.): E223–E236.

LEE, C., A. N. HRISTOV, T. W. CASSIDY, K. S. HEYLER, H. LAPIERRE, G. A. VARGA, M. J. DE VETH, R. A. PATTON, AND C. PARYS. 2012. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. J. Dairy Sci. 95:6042–6056.

MARTIN BC, WARRAM JH, KROLEWSKI AS, BERGMAN RN, SOELDNER JS, et al. (1992) Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. Lancet 340: 925–929.

MAYES, R.W., DOVE, H., CHEN, X.B. et al. Advances in the use of faecal and urinary markers for measuring diet composition, herbage intake and nutrient utilization in herbivores. In: international symposium of the nutrition of herbivores, 4, 1995, Paris. Proceedings... Paris: INRA, 1995. p.381-406.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.5, p.1621-1629. 2001.

ØRSKOV, E. R. & MCDONALD, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92, 499-503.

PEREIRA, M. N., N. N. MORAIS JÚNIOR, R. CAPUTO OLIVEIRA, G. G. S. SALVATI, AND R. A. N. PEREIRA. 2021. Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated soybeans. J. Dairy Sci. 104:2996–3007.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; LEÃO, M.I. et al. Estimativa da Produção de Proteína pelos Derivados de Purinas na Urina em Novilhos. Revista Brasileira de Zootecnia, v.29, n.4, p.1223-1234, 2000.

RENNÓ, L. N. Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhas alimentadas com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois níveis de proteína. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 252p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

REYNOLDS CK, KRISTENSEN NB. Reciclagem de nitrogênio pelo intestino e a economia de nitrogênio em ruminantes: uma simbiose assíncrona. J. Anim. Sci. 2008;86: E293–E305.

SANTOS, F. T.; KOZLOSKI, G. V. et al. Santos. 2019. Avaliação de métodos de conservação e processamento de amostras de urina de bovinos e ovinos para analisar creatinina, ureia e derivados de purina. 43p.; 30cm.

SCHWABCGBRODERICKGA. A 100-year review: protein and amino acid nutrition in dairy cows. J Dairy Sci. (2017) 100:10094–112. 10.3168/jds.2017-13320.

SILVA, R.M.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Uréia para vacas em lactação. 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de uréia. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.6, p.1948-1957, 2001.

SILVA JÚNIOR JMD, RENNÓ LN, DETMANN E, VALADARES FILHO SDC, RODRIGUES JPP (2023) Creatinine recovery from bovine urine under the effect of different times and temperatures of storage. PLoS ONE 18(3): e0282145.

SPEK, J. W., A. BANNINK, G. GORT, W. H. HENDRIKS, AND J. DIJKSTRA. 2012. Effect of sodium chloride intake on urine volume, urinary urea excretion, and milk urea concentration in lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 95:7288–7298.

SUSMEL, P.; STEFANON, B.; PLAZZOTA, E. et al. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. Journal of Agricultural Science, v.123, p.257-266, 1994.

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

TOPPS, J.H., ELLIOT, R.C. 1967. Partition of nitrogen in the urine of African sheep given a variety of low-protein diets. Anim. Prod., 9(1):219-227.

VAGNONI, D.B.; BRODERICK, G.A. Effects of supplementation of energy or ruminally undegraded protein to lactating cows fed alfafa hay or silage. Journal of Dairy Science, v.80, p.1703-1712, 1997.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. et al. Níveis de proteína em dietas de bovino. 4. Concentrações de amônia ruminal e uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. Revista Brasileira de Zootecnia, v.26, n.6, p.1270-1278, 1997.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfalfa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. Journal of Dairy Science, v.8, p.2686- 2696, 1999.

VAN NIEKERK, B.D.; BENSANDOUN, A.; PALADINES, O.L.; REID, J.T. A Study of Some of the Conditions Affecting the Rate of Excretion and Stability of Creatinine in Sheep Urine. J. Nutr. 1963, 79, 373–380.

VERBIC, J., X. B. CHEN, N. A. MACLEOD, AND E. R. ØRSKOV. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. J. Agric. Sci. Camb. 114:243–248.

WACHTA, I.; BALASUBRAMANIAN, K. Electroanalytical Strategies for Local pH Sensing at Solid–Liquid Interfaces and Biointerfaces. ACS Sens. 2024, 9, 4450–4468.

YAMAKITA, J., YAMAMOTO, T., MORIWAKI, Y., TAKAHASHI, S., TSUTSUMI, Z., HADA, T. Effect of urine storage on urinary uric acid concentrations. From the Third Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Mukogawa-cho 1-1, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan. Ann Clin Biochem 2000; 37: 355-359.

21. PROTOCOLO RECOMENDADO PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE URINA

21.1 Recomendação geral de coleta

21.1.1 Materiais de coleta

- Balde para coleta de urina
- Luvas descartáveis
- Papel toalha
- Gaze para filtração da urina
- Solução ácida previamente preparada (quando aplicável ao tratamento)
- Tubos tipo eppendorf devidamente identificados
- Recomenda-se armazenar no mínimo 5 alíquotas (eppendorf) por amostra.

21.1.2 Procedimento de coleta (spot sample)

A coleta de urina deve ser realizada por micção espontânea (spot), seguindo os seguintes cuidados:

- A vulva e a região perineal devem ser limpas com papel toalha, com o objetivo de remover resíduos fecais e evitar contaminação da amostra.
- Os primeiros mililitros de urina devem ser descartados, reduzindo a presença de contaminantes.
- A urina deve ser coletada diretamente no balde limpo.
- Após a coleta, a amostra deve ser imediatamente filtrada em gaze para remoção de partículas sólidas.

21.1.3 Preparação da solução ácida

O método de acidificação da urina utilizado foi baseado no protocolo descrito por Valadares et al. (1999).

- Utilizar ácido sulfúrico (H2SO4) na concentração de 0,036 M.
- Para o preparo da solução:
    - Medir 1,92 mL de H2SO4 p.a.
    - Adicionar a um balão volumétrico de 1 litro contendo aproximadamente 500 mL de água destilada
    - Completar o volume até 1 litro com água destilada
    - Homogeneizar cuidadosamente a solução

Essa solução deve ser preparada previamente à coleta e armazenada em recipiente adequado.

21.1.4 Procedimento imediato da amostra

- Homogeneizar cuidadosamente a urina coletada
- Realizar a diluição conforme o protocolo experimental
- Adicionar ácido (quando aplicável), previamente preparado
- Distribuir a amostra em alíquotas (mínimo de 5 eppendorfs por animal)
- Identificar corretamente cada alíquota (animal, tratamento, data)

21.1.5 Cuidados adicionais

- Evitar exposição prolongada da amostra ao ambiente
- Minimizar o tempo entre coleta e armazenamento
- Evitar múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento
- Padronizar rigorosamente diluição e acidificação entre amostras

21.2 Recomendação por composto

Para compostos mais sensíveis ao pH e à oxidação, como ácido úrico e alantoína, recomenda-se armazenamento em freezer à -20°C contínuo, associado à acidificação com H2SO4 0,036M (Valadares et al., 1999). Para ureia e N total, o controle do pH é o mais importante para reduzir perdas por volatilização de amônia. Para creatinina recomenda-se

armazenamento em geladeira (4°C) por períodos de até 15 dias, associado a acidificação com H2SO4 0,036M.

21.3 Advertências metodológicas

O recongelamento deve ser evitado para todos os compostos, pois promove a redistribuição de solutos, alteração da matriz urinária e maior instabilidade dos valores quantificados.

19. 4 Recomendação para cada composto

Tabela 1: Recomendações práticas para armazenamento, acidificação e estabilidade de compostos nitrogenados e derivados de purina na urina de bovinos.

Composto	Melhor armazenamento	Diluição/acidificação recomendada	Tempo máximo sugerido	Evitar	Justificativa
N total	Freezer (-20°C)	H_2SO_4 0,036M	Até 30 dias	Recongelamento	Redução por volatilização de NH3 ao longo do tempo
Ureia	Geladeira (4°C) ou Freezer (-20°C)	Sem ácido ou H2SO4 0,036M	Até 30 dias	Recongelamento	Relativamente estável, mas senspivel a condições extremas
Creatinina	Geladeira (4°C)	Sem ácido ou H2SO4 0,036M	Até 15 dias	Recongelamento	Varia com armazenamento
Ácido úrico	Freezer (-20°C)	H_2SO_4 0,036M	Até 30 dias	Recongelamento	Melhor estabilidade relativa, mas ainda variável
Alantoína	Freezer (-20°C)	H_2SO_4 0,036M	Até 15 dias	Recongelamento	Depende da estabilidade conjunta dos compostos