

DEGRADAÇÃO RUMINAL DA PROTEÍNA DOS ALIMENTOS E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Douglas dos Santos Pina¹, Rilene Ferreira Diniz Valadares², Sebastião de Campos Valadares Filho³ e Mario Luiz Chizzotti⁴,

¹Professor UFMT-MT; ²Professora do DVT-UFV, Membro do INCT-CA; ³Professor do DZO-UFV (scvfilho@ufv.br), Coordenador do INCT-CA; ⁴Professor do DZO – UFLA

INTRODUÇÃO

Na composição dos alimentos verifica-se uma variedade de proteínas e de compostos nitrogenados não protéicos. As proteínas são grandes moléculas que diferem no tamanho, forma, solubilidade e composição de aminoácidos, estando presentes na parede e no conteúdo celular de todos os vegetais e no tecido animal, onde desempenham diversas funções (catalítica, estrutural, transporte, estoque, contrátil, etc.). Os compostos nitrogenados não protéicos são moléculas menores, que incluem peptídeos, aminas, amidas, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, nitratos e amônia (Schwab et al., 2003).

A proteína dos alimentos é, em grande extensão, degradada no rúmen. A degradabilidade é, dessa forma, um dos mais importantes fatores quantitativos determinando o valor nutricional da proteína dos alimentos, o suprimento para os microrganismos ruminais de amônia, peptídeos, ácidos graxos de cadeia ramificada e a passagem de proteína não degradada para o intestino (Hvelplund & Weisbjerg, 2000).

A degradação ruminal da proteína é descrita freqüentemente por um modelo de ação de massas de primeira ordem. Uma importante característica desse modelo é que ele considera que a proteína bruta (PB) dos alimentos é constituída de múltiplas frações, que diferem grandemente entre si em relação às taxas de degradação, e que o desaparecimento ruminal da proteína é o resultado de duas atividades simultâneas: degradação e passagem (NRC, 2001).

Vários métodos têm sido utilizados para a partição da PB em proteína degradada (PDR) e não degradada (PNDR) no rúmen. Esses métodos incluem avaliações *in vivo*, *in situ* e uma variedade de métodos *in vitro* (Schwab et al., 2003). Em teoria, métodos *in vivo* devem ser preferidos para medir a digestibilidade dos nutrientes. Contudo, técnicas *in vivo* requerem grandes quantidades de alimentos e um grande número de repetições para serem contornadas as variações referentes ao animal e a outros fatores. Assim, o ônus para obter número adequado de repetições aliado ao custo de manutenção e ao número de amostras em grandes animais, pode tornar os estudos *in vivo* caros e inviáveis. Além disso, o conceito de bem estar animal está provavelmente contribuindo para uma redução nas experimentações *in vivo*. Isso tem levado ao crescente interesse no uso de técnicas *in vitro* e *in situ* (Broderick & Cochran, 2000).

Os ruminantes com expressiva atividade fermentativa pré-gástrica evoluíram há 14 milhões de anos e seu sucesso no processo evolutivo tem sido atribuído à existência da relação simbiótica com os microrganismos ruminais, onde os animais contribuem com o alimento e o *habitat*, enquanto os microrganismos fornecem ácidos graxos voláteis e aminoácidos formados a partir de substratos que não seriam aproveitados (fibra e nitrogênio não-protéico) pelo animal hospedeiro (Kozloski, 2002).

A maior parte dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é proveniente da proteína microbiana sintetizada no rúmen, sendo as exigências dietéticas de proteína metabolizável para ruminantes, atendidas mediante a absorção intestinal de aminoácidos provenientes da proteína dietética não degradada no rúmen e da

proteína microbiana verdadeira digestíveis. Dessa forma, tem sido objetivo da nutrição dos ruminantes, maximizar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, aumentando assim a eficiência produtiva. Para tanto, é necessário quantificar a contribuição da síntese ruminal de proteína microbiana para um melhor entendimento do processo de conversão dos nutrientes dietéticos em proteína microbiana e dos fatores que a afetam.

As técnicas de mensuração da síntese e/ou fluxo de proteína microbiana podem ser divididas em três categorias principais: a determinação direta, através da contagem de microrganismos, a determinação indireta com o uso de indicadores presentes nos microrganismos, como o RNA e algumas substâncias próprias destes organismos, e a determinação indireta, através da incorporação pelos microrganismos de substâncias externas, como os elementos ^{15}N e ^{35}S .

São objetivos desse capítulo abordar algumas técnicas para avaliação da proteína dos alimentos, bem como, abordar alguns métodos para determinação da proteína bruta microbiana sintetizada no rúmen e fatores que afetam a síntese ruminal de proteína bruta microbiana.

MÉTODOS *in situ*

A técnica para estimar a fermentação ruminal através da incubação de pequenas amostras de alimentos dentro do rúmen foi primeiramente usada por Quin e colaboradores em 1938, contudo, foi depois da introdução de ferramentas matemáticas capazes de transformar os dados de taxas de desaparecimento ruminal em valores denominados de degradabilidade efetiva (Ørskov & McDonald, 1979), que o método passou a ser difundido (Hvelplund & Weisbjerg, 2000). Hoje, o método *in situ* é o mais amplamente utilizado em pesquisas para determinação de estimativas da degradabilidade ruminal da proteína, sendo adotado em vários países (Schwab et al., 2003), como também pelo NRC (2001).

O procedimento *in situ* consiste em colocar amostras de um alimento dentro de sacos de náilon, com tamanho de poros definido (40 – 60 μm), e a infusão dos mesmos dentro do rúmen de animais canulados (bovinos, ovinos ou caprinos). Os poros devem ser pequenos o bastante para impedir a perda de partículas e grande o suficiente para permitirem o acesso dos microrganismos ao material. Devido à pequena quantidade de amostras incubadas, estas não interferem na fermentação ruminal, e admite-se que as condições no interior dos sacos são semelhantes às ruminais. As amostras são removidas em intervalos de tempos variados e a PB é quantificada no material não degradado.

Pelo menos três frações (A, B e C) da PB podem ser determinadas. Assume-se que fração A é completamente degradada no rúmen e consiste da fração que escapa dos poros durante o processo de lavagem com água ($\pm 39^\circ\text{C}$), estando incluídos nessa fração os compostos nitrogenados não protéicos (NNP), a proteína rapidamente solubilizada e a proteína contida nas pequenas partículas do alimento que passam pelos poros. A fração B é a proteína insolúvel potencialmente degradável associada com as partículas de maior tamanho. Ou seja, a porcentagem da PB inicial que desaparece da amostra durante o tempo de exposição ruminal. Por último, assume-se que fração C não é degradada no rúmen, independentemente do tempo de exposição da amostra ao ambiente ruminal.

A degradabilidade efetiva dos alimentos é determinada utilizando-se o modelo de Ørskov & McDonald (1979), por intermédio da seguinte equação: $DE = A + B [Kd/(Kd + Kp)]$, onde as frações A e B e a taxa de digestão (kd) são estimadas através da degradabilidade potencial $Dg(t) = A + B \times (1 - e^{-kd \cdot t})$, onde kd é a taxa de digestão da fração B, kp é a taxa de passagem da fração B e t é o tempo de

incubação. A PDR pode ser calculada como: $PDR = A + B [Kd/(Kd + Kp)]$ e a PNDR = $PB - PDR$ ou $PNDR = C + B [Kp/(Kd + Kp)]$.

Alguns ajustes têm sido feitos no modelo original de Ørskov & McDonald (1979), sendo que McDonald (1981) introduziu um valor de *lag time* ao modelo, a fim de aumentar a precisão na determinação da degradabilidade efetiva. O *lag time* é definido como o tempo no qual a derivada da equação para o conjunto de dados iguala-se à verdadeira fração potencialmente degradável no tempo zero (Mertens, 1993). Assim, as novas equações seriam: $Dg(t) = A + B \times [1 - e^{-kd(t-lag)}]$ e $DE = A + [B \cdot Kd \cdot e^{-Kp \cdot lag} / (Kd + Kp)]$. Segundo Petit et al. (1995), a adição do *lag time* no modelo tem pouco efeito na degradabilidade efetiva. Contudo, os valores das frações A e B e do Kd são um pouco diferentes com a utilização ou não do *lag time* no modelo.

Como afirmado anteriormente, o desaparecimento ruminal da PB é uma função das taxas de digestão e passagem. Dessa forma, o Kp deve ser medido ou estimado através de equações. O NRC (2001) propõe três equações para estimar as taxas de passagem, sendo, para volumosos úmidos $Kp_{vu} = 3,054 + 0,614X_1$ (1); para volumosos secos $Kp_{vs} = 3,362 + 0,479X_1 - 0,007X_2 - 0,017X_3$ (2) e para concentrados $Kp_c = 2,904 + 1,375X_1 - 0,020X_2$ (3), onde X_1 = consumo de MS (% do peso vivo); X_2 = % de concentrado na dieta (base da MS) e X_3 = % de FDN do alimento (base da MS). De forma análoga ao NRC (2001), Seo et al. (2006) propuseram três equações para estimar o Kp_f para forragem = $(2,365 + 0,0214IFpPC + 0,0734ICpPC + 0,069IF)/100$; Kp_c para concentrado = $(1,169 + 0,1375IFpPC + 0,1721ICpPC)/100$ e Kp_l para a fração líquida = $(4,524 + 0,0223IFpPC + 0,2046ICpPC + 0,344IF)/100$, onde Kp é a taxa de passagem (h^{-1}), IFpPC a ingestão de matéria seca de forragem como proporção do peso corporal (g/kg), ICpPC a ingestão de matéria seca de concentrado como proporção do peso corporal (g/kg) e IF é a ingestão de matéria seca de forragem (kg).

Torna-se claro, a partir dessas equações, que a ingestão de matéria seca (NRC, 2001) e de componentes específicos das dietas, como concentrado e forragens (Seo et al., 2006) são importantes fatores afetando a taxa de passagem e, conseqüentemente, o conteúdo de PDR e PNDR dos alimentos. Mas, devido à complexidade de se modelar alguns fatores que exercem efeito sobre a taxa de passagem (tamanho, densidade e taxa de hidratação de partículas), os modelos de predição da kp ainda não contemplam esses fatores.

Segundo Broderick & Cochran (2000), apesar da grande amplitude de utilização do método *in situ* para determinação da degradabilidade ruminal da PB, existe ainda uma grande variação nos resultados obtidos em diferentes laboratórios, sendo que, as principais fontes de variação são: dieta basal, tipo de amostras e animal, replicação, condições de incubação, técnica de lavagem e correção para a contaminação microbiana. Dessa forma, a padronização da técnica é de suma importância para permitir uma avaliação adequada dos alimentos e uma comparação dos resultados obtidos. A Tabela 1 apresenta recomendações para procedimento de avaliação da degradabilidade ruminal da PB, sugeridas por Broderick & Cochran (2000) para padronizar as condições de avaliação.

Dentre os principais problemas encontrados na utilização do método *in situ* para a avaliação da degradação da proteína em forragens, ressalta-se a elevada proporção de material solúvel em água contida nas forragens, o que a técnica erroneamente considera degradável. Adicionalmente, o efeito da contaminação microbiana pode ser mais importante em forragens devido ao seu elevado teor de fibra e baixo teor protéico, (Calsamiglia et al., 2000). O trabalho intenso e a necessidade de animais fistulados no rúmen, também contribui para elevação dos custos para a determinação da PDR e PNDR, através da técnica *in situ* (Schwab et al., 2003).

Tabela 1 - Recomendações para experimentos *in situ*

Itens	Recomendações
Dieta basal	Relação volumoso/concentrado 60:40
Nível de alimentação	Mantença ou voluntário
Material dos sacos	Poliéster ou Náilon
Tamanho de poros	40 – 60 µm
Relação amostra / área de superfície	10 – 15 mg/ cm ²
Peso da amostra (sacos medindo 10 x 15 cm)	4,5 g
Moagem (concentrado, volumoso)	2 mm
Espécie animal	Bovino, ovino, etc.
Número de animais	2
Número de dias	2 - 3
Número de sacos	2-3
Posição dos sacos no rúmen	Saco ventral com movimento livre
Ordem de entrada / remoção	Entrada seqüencial e remoção conjunta
Tempos de incubação	0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 h (72 p/ forragem)
Correção para contaminação microbiana	Sim, para volumosos com baixo teor protéico

Adaptada de Broderick & Cochran (2000) e Vanzant et al. (1998).

Tentativas têm sido feitas para considerar como erros as perdas de partículas, a contaminação microbiana e o escape de proteína solúvel (Hvelplund & Weisbjerg, 2000). Quando as amostras são moídas, as pequenas partículas produzidas podem escapar através dos poros durante o processo de incubação, sem que nenhuma degradação tenha ocorrido, sendo erroneamente considerada como degradadas. A extensão da perda de pequenas partículas pode ser estimada pela diferença entre a perda de partículas dos sacos, quando estes são lavados (P) e a solubilidade medida em papel de filtro (SOL), sendo esta determinada pela pesagem de 0,5 g de amostra em copo, adicionando-se 40 ml de água e deixando em solução durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois, o material é filtrado em papel de filtro e o N é determinado no mesmo, sendo o valor de N solúvel em água determinado por diferença (Hvelplund & Weisbjerg, 2000). Assumindo que as partículas perdidas têm uma mesma taxa de degradação das remanescentes, a correção pode ser efetuada: $a_{cor} = a - P$; $b_{cor} = b + [b / (1 - (P + Sol))]$; $c_{cor} = c$.

O princípio do método *in situ* é que os microrganismos devem entrar nos sacos que contêm as amostras e degradá-las de maneira similar ao processo que ocorre no exterior dos sacos. Desse modo, as amostras serão colonizadas pelos microrganismos. O procedimento de lavagem após a incubação remove o material degradado e parte dos microrganismos, mas alguns permanecem aderidos à amostra, não sendo removidos durante o processo. A contaminação microbiana influencia pouco o valor de degradabilidade da matéria seca, mas, devido ao elevado teor de N nos microrganismos, a degradabilidade da PB pode ser subestimada, principalmente para as forragens. Dessa forma, correções devem ser feitas nos valores de degradabilidade obtidos, através da adição a esses valores de um ΔDE , sendo que, tais correções são baseadas no teor de PB e ou FDN das amostras. Assim, $\Delta DE = 20,2 - 0,674 * PB$ (% MS) ou $\Delta DE = 6,4 - 0,353 * PB$ (% MS) + 0,170 * FDN (% MS), (Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992). Contudo, apesar da correção sugerida ser facilmente aplicável, pois são baseadas em equações lineares e nos conteúdos de PB e FDN da amostra, as mesmas podem não ser eficientes para todos os tipos de alimentos analisados (Vanzant et al., 1998).

De acordo com a equação utilizada para estimar a degradabilidade efetiva, a proteína solúvel é totalmente degradada no rúmen. Mas, para alimentos com alta proporção de proteína solúvel, como silagens, a degradabilidade dessa fração é

semelhante às demais. A taxa de passagem da fase fluída é mais alta ($12-15\% \cdot h^{-1}$), comparada com a taxa para partículas, significando que a taxa de degradação para essa fração deve ser extremamente elevada ou ocorreria um escape dessa fração, acarretando em valores superestimados da DE da PB (Hvelplund & Weisbjerg, 2000). Para a estimativa adequada da DE da PB em alimentos que contenham uma elevada proporção da fração A, é necessário que essa seja ponderada em relação às suas taxas de passagem e digestão, como: $DE = A [Kd_A / (Kd_A + Kp_{fluído})] + B [Kd / (Kd + Kp)]$. Porém, tal correção torna-se difícil devido à necessidade de estimativas para as taxas de digestão da fração A.

MÉTODOS QUÍMICOS *in vitro*

O método mais amplamente usado para determinar as frações de nitrogênio do alimento é o protocolo de fracionamento utilizado no CNCPS (Sniffen et al., 1992; Fox et al., 2000). O CNCPS divide a PB dos alimentos em 5 frações, usando 3 solventes e um agente precipitante. As cinco frações são: A, solúvel em tampão borato fosfato (TBF), mas não precipitada por ácido tricloroacético (TCA), constituída pelos compostos nitrogenados não protéicos (NNP); B₁, proteína verdadeira rapidamente degradada no rúmen, solúvel em TBF, mas precipitada pelo TCA; B₂, proteína verdadeira e grandes peptídeos, moderadamente degradada no rúmen, calculada como sendo a diferença entre o total de PB do alimento menos as outras frações; B₃, proteína verdadeira lentamente degradada no rúmen, calculada pela diferença entre o conteúdo protéico da fibra insolúvel em detergente neutro (PIDIN) e o conteúdo protéico da fibra insolúvel em detergente ácido (PIDA) e C, ou a proteína não degradada no rúmen, equivalente ao PIDA.

O PIDIN é obtido pela determinação da PB no resíduo insolúvel após o tratamento com detergente neutro, sem a utilização de sulfito de sódio; e o PIDA determinado após a extração seqüencial, no resíduo obtido após o tratamento com detergente ácido. A fração A é considerada 100% degradada no rúmen e a fração C 100% não degradada.

O CNCPS também reconhece que o desaparecimento da PB no rúmen é uma função simultânea da Kd e Kp e que o Kp, varia com o consumo, o alimento e as características da dieta. Dessa forma, duas equações são utilizadas para prever o Kp dos alimentos não degradados, uma para forragem ($Kp = 0,388 + 22,0 * [IMS/PV^{0,75}] + 0,0002 * [\% \text{ forragem na MS da dieta}]$) e outra para concentrado ($Kp = -0,424 + [1,45 * Kp \text{ para forragem}]$). As taxas de passagem são ajustadas para alimentos individuais, utilizando-se um fator de ajuste multiplicativo para tamanho de partículas, usando a fibra insolúvel em detergente neutro fisicamente efetiva (FDNfe) proposta por Mertens. Duas equações são usadas para determinação do fator de ajuste (FA), uma para forragens ($FA = 100/[FDNfe + 70]$) e outra para concentrados ($FA = 100/[FDNfe + 90]$).

Os valores de PDR e PNDR podem ser calculados diretamente através da associação das frações da PB obtidas, com as suas respectivas taxas de passagem e digestão. Dessa forma, a PDR (%PB) pode ser calculada como: $A + B1 (KdB1 / [KdB1 + Kp]) + B2 (KdB2 / [KdB2 + Kp]) + B3 (KdB3 / [KdB3 + Kp])$ e a PNDR = 1 - PDR.

Um aspecto interessante dessa aproximação utilizada no CNCPS é que as análises (NNP, PIDIN, PIDA e proteína verdadeira solúvel) feitas para a determinação das frações da PB são procedimentos de rotina em laboratórios, o que facilita a adoção do método para a utilização em condições de campo (Schwab et al., 2003). Um aspecto negativo do método, no entanto, é que as taxas de digestão às quais são submetidas as três frações da proteína verdadeira (B) variam bastante ($B_1 = 120$ a

400% / h, $B_2 = 3$ a 16% / h e $B_3 = 0,06$ a 0,55% / h), para as principais classes de alimentos e podem ser encontradas em Sniffen et al. (1992).

MÉTODOS ENZIMÁTICOS *in vitro*

As duas aproximações básicas para fazer estimativas da digestão ruminal *in vitro* envolvem a incubação com microrganismos ruminais (métodos *in vitro* ruminais) ou enzimas livres de células (métodos *in vitro* não ruminais). A primeira técnica utiliza digesta ruminal, geralmente obtida a partir de animais canulados, e a segunda é baseada no uso de enzimas disponíveis comercialmente, com a intenção de se obter resultado semelhante ao encontrado com o líquido ruminal (Broderick & Cochran, 2000). Em ambos os casos, a taxa de degradação protéica é mensurada a partir da taxa de acúmulo de aminoácidos e amônia, que representam os produtos da degradação protéica (Schwab et al., 2003).

Os “métodos *in vitro* ruminais” são complicados pela utilização microbiana de aminoácidos e amônia liberados, causando uma subestimação da degradação. Além disso, ocorre liberação de aminoácidos e amônia a partir do catabolismo microbiano e da proteína residual presente no inóculo, o que levaria a uma superestimação da degradação. A subestimação pode ser controlada pela utilização de um “branco”. Contudo, a utilização de aminoácidos e amônia não pode ser controlada por essa mesma técnica (Schwab et al., 2003). Para contornar esse problema, Broderick (1987) desenvolveu um método denominado de “inibidor *in vitro* (IIV)” utilizando hidrazina e cloranfenicol como inibidores do metabolismo de nitrogênio dos microrganismos, impedindo, assim, a absorção e utilização de aminoácidos e/ou amônia pelos mesmos. Dessa forma, o uso do sistema IIV, juntamente com o “branco”, permitiu melhor ajuste e a obtenção de dados mais condizentes com a degradação da proteína. Contudo, como revisado por Broderick & Cochran (2000), o sistema IIV não é adequado para analisar silagens de gramíneas ou leguminosas que contenham altos níveis de compostos nitrogenados não protéicos.

O uso de enzimas livres de células tem a vantagem de eliminar a necessidade de animais canulados e a interferência microbiana sobre o resultado final da análise. Muitos trabalhos têm sido realizados com o uso de “métodos *in vitro* não ruminais” (Assoumani et al., 1992; Licitra et al., 1998, 1999), sendo o objetivo desses trabalhos identificar uma protease ou misturas de proteases que produzam estimativas de degradação semelhantes às obtidas com os “métodos *in vitro* ruminais” (Schwab et al., 2003).

Segundo Calsamiglia et al. (2000), devido à complexidade das interações existentes dentro do ambiente ruminal, a atividade proteolítica necessária para a degradação protéica pode necessitar da presença de outras enzimas não-proteolíticas. Assoumani et al. (1992) demonstraram a interferência do amido sobre a degradação protéica de grãos de cereais, a qual foi aumentada em até 20 unidades percentuais pela adição de amilase ao meio. Kohn & Allen (1995) também registraram um aumento na degradação da proteína ligada ao FDN quando a celulase foi adicionada ao meio. Dessa forma, parece que a degradação protéica ruminal requer a atividade de enzimas proteolíticas e não-proteolíticas.

Aufrère et al. (1991) avaliaram a degradabilidade de 97 alimentos concentrados, utilizando a técnica *in vitro* com incubações (1 a 24 horas) e protease originada do *S. griseus*, e encontraram uma alta correlação com os resultados *in situ* ($r^2 = 0,89$). Contudo, Roe et al. (1991) e Tománková & Kopency (1995) encontraram baixa ou moderada ($r^2 = 0,21$ e $r^2 = 0,39$, respectivamente) correlação entre os valores *in vitro* e *in situ*, sugerindo que essas enzimas podem não ser específicas

para a simulação de degradação ruminal numa grande variedade de alimentos (Calsamiglia et al., 2000).

O uso de métodos enzimáticos *in vitro* para prever a taxa de degradação ruminal da proteína oferece uma praticidade laboratorial e uma maior precisão analítica. Contudo, nenhum método exclusivo foi cientificamente aceito para todos os alimentos e desafios associados à interferência de alguns compostos (fibra, amido, NNP) à identificação apropriada da relação enzima: substrato, ainda permanecem (Schwab et al., 2003).

SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Os ruminantes com expressiva atividade fermentativa pré-gástrica evoluíram há 14 milhões de anos e seu sucesso no processo evolutivo tem sido atribuído à existência da relação simbiótica com os microrganismos ruminais, onde os animais contribuem com o alimento e o *habitat*, enquanto os microrganismos fornecem ácidos graxos voláteis e aminoácidos formados a partir de substratos que não seriam aproveitados (fibra e nitrogênio não-protéico) pelo animal hospedeiro (Kozloski, 2002).

Observações qualitativas da presença de microrganismos e de ácidos graxos voláteis no rúmen já eram realizadas ao longo do século 19, mas apenas no início da década de 40, pesquisadores da Universidade de Cambridge realizaram os primeiros estudos quantitativos da produção de ácidos graxos voláteis. Após identificada sua importância para o hospedeiro, iniciaram-se estudos relacionados aos microrganismos ruminais (Hobson & Stewart, 1997).

A maior parte dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é proveniente da proteína microbiana sintetizada no rúmen. As exigências dietéticas de proteína metabolizável para ruminantes são atendidas mediante a absorção no intestino delgado da proteína microbiana verdadeira e da proteína dietética não degradada no rúmen digestíveis. A proteína microbiana pode suprir de 50 a 100% da proteína metabolizável exigida para bovinos de corte, sendo considerada fonte de boa qualidade, em relação à sua digestibilidade intestinal (em torno de 80%) e ao seu perfil em aminoácidos (NRC, 2000).

A composição aminoacídica da proteína microbiana é similar à da proteína dos tecidos do próprio animal, bem como da proteína encontrada no leite. Em comparação à composição da proteína de concentrados protéicos de origem vegetal, a proteína microbiana contém maior proporção de metionina e lisina e, após a proibição da utilização de alimentos de origem animal em dietas destinadas a ruminantes no Brasil, não existem fontes que atendam melhor aos requerimentos aminoacídicos do animal que a proteína microbiana (Verbic, 2002).

Diante de tais qualidades, tem sido objetivo da nutrição dos ruminantes, maximizar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, aumentando assim a eficiência produtiva. Para tanto, é necessário quantificar a contribuição da síntese ruminal de proteína microbiana para um melhor entendimento do processo de conversão dos componentes dietéticos em proteína microbiana e dos fatores que a afetam. Contudo, a mensuração da produção de proteína microbiana é dificultada pelo fato de envolver três populações distintas (bactérias, protozoários e fungos) que, constantemente, são expostas à pressão de seleção em seu *habitat*, sendo freqüentemente alteradas.

Devido à importância da proteína microbiana para o metabolismo protéico dos ruminantes, a quantificação do seu fluxo sob diferentes condições dietéticas e fisiológicas é fundamental para o atendimento dos requisitos em aminoácidos absorvidos. Com este propósito, vários indicadores microbianos têm sido utilizados,

cada um com suas vantagens e limitações. Broderick & Merchen (1992) afirmaram que nenhum indicador é totalmente adequado, conseqüentemente, as estimativas obtidas são relativas e não absolutas. Muitas técnicas requerem animais fistulados e a estimativa do fluxo abomasal. Atualmente, há crescente interesse na substituição das implantações cirúrgicas de fistulas, em diferentes partes do trato gastrointestinal, por técnicas não-invasivas.

As técnicas de mensuração da síntese e/ou fluxo de proteína microbiana podem ser divididas em três categorias principais: a determinação direta, através da contagem de microrganismos, a determinação indireta com o uso de indicadores presentes nos microrganismos, como o RNA e algumas substâncias próprias destes organismos, e a determinação indireta, através da incorporação pelos microrganismos de substâncias externas, como os elementos ^{15}N e ^{35}S .

CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

Esta técnica consiste na contagem direta de bactérias, protozoários e fungos em amostras da digesta ruminal, após sucessivas diluições que permitam a identificação do número de organismos em um determinado volume, observado com o auxílio de um microscópio. A contagem pode ser realizada para determinar a quantidade de indivíduos viáveis ou simplesmente a quantidade dos indivíduos fixados. As bactérias e protozoários podem ser quantificados em uma câmara de contagem apropriada. A concentração de bactérias pode ser obtida, utilizando-se o procedimento do número mais provável, descrito por Dehority et al. (1989). Os fungos podem ser determinados a partir do número de zoósporos no fluido ruminal, embora esta técnica seja altamente questionável.

Algumas dificuldades desta técnica são a incapacidade de distinção entre pequenas partículas alimentares e bactérias, a incapacidade de identificação dos microrganismos aderidos às partículas, a sobreposição de bactérias, a distribuição dos indivíduos na câmara de contagem, a viscosidade do diluente, além do erro de amostragem do conteúdo ruminal.

A identificação da concentração de microrganismos no fluido ruminal coletado antes e em diversos horários após a alimentação indica a taxa e a extensão do crescimento microbiano no rúmen e pode ser útil na comparação de dietas. Porém, a concentração de microrganismos é resultado do equilíbrio entre o crescimento, a lise e a passagem de microrganismos a um determinado volume ruminal, e, portanto, tem pouca utilidade na determinação da proteína microbiana como fonte de aminoácidos absorvíveis. Os microrganismos variam consideravelmente sua biomassa por célula, desta forma, contagens de microrganismos devem ser convertidas em biomassa microbiana para avaliações com fins nutricionais.

DAPA

A descoberta de um aminoácido, o ácido diaminopimélico (DAPA), foi relatada em 1950. Posteriormente, este aminoácido, presente somente em bactérias, foi identificado em oligopeptídeos ligados aos peptídeoglucanos da parede celular bacteriana (Broderick & Merchen, 1992). Além do DAPA, o aminoácido D-alanina e o ácido murâmico, também constituintes da parede celular bacteriana, são compostos microbianos utilizados como indicadores.

O DAPA foi sugerido como indicador microbiano em 1953 por Syngé e desde então foi utilizado em diversos experimentos para estimar a síntese de proteína microbiana (Broderick & Merchen, 1992). A concentração de DAPA presente na

digesta duodenal pode ser obtida conforme Czerkawski (1974) e, com a mensuração do fluxo duodenal, o fluxo de proteína microbiana pode ser estimado a partir da relação DAPA: N microbiano.

Entretanto, a proporção de DAPA em relação à proteína microbiana é variável entre espécies de bactérias e protozoários. As relações DAPA:N (mg/g de N) encontradas por Czerkawski (1974) em bactérias pequenas, bactérias grandes e protozoários foram de 7,3; 4,7 e 0,9, respectivamente. Protozoários são menos numerosos no conteúdo ruminal, mas devido ao seu maior tamanho, podem representar parcela significativa da biomassa microbiana do rúmen. Geralmente, menos de 10% (mas em alguns casos, mais de 40%) do fluxo duodenal de N microbiano é proveniente do N contido em protozoários e, se ignorada a relação DAPA:N protozoário, a acurácia deste indicador na determinação da síntese de proteína microbiana passa a ser reduzida (Sylvester et al., 2005).

Por ser um constituinte da parede celular, condições que favoreçam o aumento médio da célula bacteriana podem ocasionar em redução da relação parede celular:protoplasma e, assim, diminuir a relação DAPA:proteína bacteriana, subestimando a síntese de proteína microbiana. Além disso, foi identificada a ocorrência natural de DAPA em alimentos e também se demonstrou a presença de resíduos de DAPA bacteriano aderido a partículas alimentares não degradadas no rúmen. Assim, estas formas de DAPA podem alterar a estimativa do fluxo de proteína microbiana, tornando necessária sua quantificação para aumentar a eficiência deste método.

D-Alanina

Outro constituinte da parede celular microbiana, a D-alanina foi sugerida como indicador microbiano por Garrett et al. (1982) por não ser detectada nos alimentos e estar presente em maior concentração nas bactérias que o DAPA. Porém, os mesmos problemas relacionados a fatores que afetam a relação parede celular:protoplasma microbiano podem limitar a utilização deste indicador.

AGCI

O leite bovino contém quantidades mensuráveis de ácidos graxos de cadeia ímpar (AGCI), como o ácido pentadecanóico (C15:0), ácido heptadecanóico (C17:0) e ácido heptadecenóico, bem como de seus isômeros de cadeia ramificada (AGCIR). Os ácidos graxos de cadeia ímpar são sintetizados em quantidades desprezíveis por bovinos e também não estão presentes em alimentos vegetais, mas constituem a maior parte dos ácidos graxos da membrana lipídica microbiana. Os AGCIR podem ser determinados conforme técnica descrita por Vlaeminck et al. (2005).

Os AGCI, C15:0 e C17:0, são sintetizados pelos microrganismos através da elongação do propionato ou valerato, enquanto seus isômeros de cadeia ramificada, AGCIR, são sintetizados utilizando como precursores os aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina, e isoleucina) e os correspondentes ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato), (Kaneda, 1991).

Keeney et al. (1962), citados por Vlaeminck et al. (2005), sugeriram a utilização dos AGCI e seus isômeros ramificados como indicadores da síntese microbiana, mas devido à diferença no perfil de AGCI entre microrganismos, estes só descreveriam qualitativamente a síntese microbiana ruminal (Dewhurst et al., 2000b).

Os diferentes grupos de microrganismos possuem quantidade e perfis de AGCI distintos. Cabrita et al. (2003) demonstraram que o perfil de ácidos graxos no

leite foi afetado pelos teores de N e carboidratos dietéticos, e que através desse perfil é possível identificar os ácidos graxos que são sintetizados na glândula mamária (ácidos graxos de cadeia curta e média), os que foram modificados na glândula mamária pela enzima Δ^9 -dessaturase (ácidos graxos monoenoícos), os provenientes da absorção dos ácidos graxos dietéticos (ácidos graxos de cadeia longa) e os sintetizados pelos microrganismos ruminais (AGCI). Os mesmos autores relataram que o ácido graxo anteiso C15:0 correlaciona-se positivamente com o teor de açúcar dietético e que o ácido heptadecanóico (C17:0) seria um indicador de deficiência protéica.

Vlaeminck et al. (2005) demonstraram que o teor de AGCIR foi fortemente relacionado à biomassa microbiana presente no rúmen e que a secreção de AGCIR no leite, particularmente o C17:0, poderia ser utilizada para predição do fluxo duodenal de microrganismos.

PCR

Como já discutido, os protozoários acarretam erros na determinação da proteína microbiana. Nos métodos atuais, tanto os indicadores internos quanto os externos, não distinguem bactérias de protozoários, limitando a mensuração da síntese microbiana e a reciclagem intra-ruminal de N. Técnicas moleculares, utilizando o 18S rDNA como marcador da quantidade de N oriundo de protozoários estão em evolução, o que permitirá, num futuro próximo, distinguir os protozoários das bactérias no *pool* total da proteína microbiana sintetizada no rúmen.

³⁵S

Após a infusão de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, o ³⁵S é incorporado durante a síntese de novo dos aminoácidos sulfurados, cistina e metionina. O ³⁵S apresenta baixo risco ambiental e de perigo à saúde humana, entretanto é acumulado nos tecidos e secretado no leite; logo estes não podem ser consumidos e devem ser adequadamente descartados. Beever et al. (1974) propuseram técnica para estimar a síntese microbiana, utilizando o ³⁵S.

¹⁵N

O ¹⁵N tem sido amplamente utilizado como indicador para determinar a produção microbiana, já que é um isótopo estável, de baixo risco ambiental, de baixo custo em relação a outros isótopos, por marcar todos os *pools* de N microbiano, por não ser encontrado naturalmente na proteína dos alimentos e por não marcar a proteína do animal até que os aminoácidos microbianos marcados sejam incorporados aos seus tecidos (Broderick & Merchen, 1992). O ¹⁵N é bem distribuído na célula microbiana, logo, no caso de lise celular durante o isolamento, as perdas de protoplasma, que subestimam a quantidade de ácidos nucléicos, são menos prejudiciais na determinação da concentração de ¹⁵N.

Com a infusão de sais de amônia, $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no rúmen, gradativamente ocorre a síntese de aminoácidos microbianos utilizando como precursores a ¹⁵NH₃ e, com isso, o isótopo passa a ser um constituinte da proteína microbiana. Já os protozoários são marcados principalmente após a incorporação do ¹⁵N contido nas bactérias predadas.

Broderick & Merchen (1992) recomendaram a infusão contínua, via fístula ruminal, de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 48 horas e determinação do teor de ¹⁵N, segundo o método de Siddons et al. (1985).

Normalmente, a relação indicador:N microbiano tem sido obtida em bactérias isoladas da fase líquida da digesta ruminal, considerando que esta é similar à relação da microbiota ruminal mista, embora diferenças entre bactérias das fases líquida e sólida bem como entre bactérias e protozoários sejam amplamente relatadas. A fração de bactérias associadas à fase sólida é superior à das associadas à fase líquida, podendo representar mais de 90% (Faichney, 1980) das bactérias isoladas de animais recebendo dietas volumosas. Assim, os procedimentos de isolamento bacteriano deveriam considerar as bactérias associadas às partículas para determinação de uma relação indicador:N total mais representativa.

Martín et al. (1994) observaram diferentes teores de ^{15}N e DAPA entre bactérias da fase líquida (0,164% e 2,25% do N total) e da fase sólida (0,111% e 11,6% do N total), possivelmente devido à maior taxa de crescimento e síntese protéica das bactérias presentes no líquido ruminal. Embora a contribuição das bactérias associadas a partículas seja pouco estudada, sua presença na determinação da relação indicador:N total microbiano pode ter grande impacto na estimativa do fluxo de proteína microbiana. Carro & Miller (2002) encontraram maiores teores de ^{15}N e bases purinas em relação ao N total nas bactérias da fase líquida do que nas bactérias associadas às partículas e teores intermediários nos *pellets* mistos, contendo ambas bactérias. Desta forma, métodos capazes de isolar bactérias mistas são recomendáveis.

RNA

Organismos unicelulares possuem alta concentração de ácidos nucléicos, especialmente RNA e bases purinas, o que torna atraente a utilização destes como indicadores microbianos. Em torno de 18 % do nitrogênio total dos microrganismos ruminais encontra-se nos ácidos nucléicos e aproximadamente 11% do N total está presente nas bases purínicas (Chen & Ørskov, 2003). Segundo Broderick & Merchen (1992), a utilização de ácidos nucléicos como indicador está bem estabelecida. O RNA pode ser quantificado segundo o método proposto por Ling & Buttery (1978), e as bases purínicas conforme Ushida et al. (1985).

A maioria dos alimentos apresenta baixa concentração de RNA e, segundo McAllan & Smith (1973), no rúmen ocorre extensiva degradação do RNA exógeno. Assim, o fluxo duodenal de RNA é predominantemente de origem microbiana. Entretanto, nas farinhas de origem animal a concentração de RNA é similar à dos microrganismos e, desta forma, não é apropriada a utilização do RNA como indicador em animais recebendo este tipo de alimento.

O grande empecilho desta técnica é a diferença existente na relação RNA:proteína microbiana entre bactérias e protozoários e até mesmo entre bactérias presentes na fase líquida e bactérias associadas a partículas da digesta ruminal (Cecava et al., 1990).

Derivados urinários de purinas

O uso dos derivados de purinas (DP) como indicador para estimar a síntese microbiana no rúmen foi primeiramente proposto por Blaxter & Martin em 1962, citados por Fujihara et al. (1987). Topps & Elliott (1965) foram os primeiros a demonstrar que a excreção urinária de alantoína estava relacionada com a concentração de ácidos nucléicos no rúmen de carneiros alimentados com diferentes níveis de energia e também foram os primeiros a utilizar o termo “derivados de purinas”.

Neste método, assume-se que o fluxo duodenal de ácidos nucleicos é essencialmente de origem microbiana e, após digestão intestinal, as bases purinas (adenina e guanina) microbianas são catabolizadas e excretadas na urina como DP, proporcionalmente à quantidade de bases purinas absorvidas.

A alantoína é o DP mais abundante, sendo o ácido úrico, xantina e hipoxantina os demais componentes denominados coletivamente como DP. Em bovinos, devido à alta atividade da enzima xantina oxidase, que converte xantina e hipoxantina a ácido úrico, a excreção de alantoína e ácido úrico constitui cerca de 98% dos derivados urinários de purinas. Portanto, a contribuição da xantina e hipoxantina é não significativa para determinação da excreção total dos DP (Rennó et al., 2000). Em vacas lactantes, ocorre também a excreção de derivados de purinas no leite, constituídos em sua maior parte de alantoína, mas com alguma contribuição de ácido úrico, e, caso a excreção de DP no leite seja desconsiderada, a absorção de purinas pode ser subestimada. A razão DP absorvidos no intestino delgado:DP recuperados na urina pode ser modificada se a secreção de DP pela glândula mamária for alterada pela produção de leite (Gonzalez-Ronquillo et al., 2003).

Diversos autores (Chen et al., 1990; Balcells et al., 1991; Giesecke et al., 1994; Orellana Boero et al., 2001 e Gonzalez-Ronquillo et al., 2003) confirmaram a relação entre o fluxo duodenal de bases purinas e a excreção urinária de DP. Assim, o fluxo de N microbiano pode ser calculado a partir das quantidades de purinas absorvidas, que são estimadas a partir da excreção dos DP (Chen & Gomes, 1992).

Tradicionalmente, por este método, o fluxo intestinal de compostos nitrogenados microbianos (Nmic, g N/dia) é calculado em função das purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia), utilizando-se a equação: $Nmic = (70 \times PA) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116 a relação N purina: N total dos microrganismos ruminais (Chen & Gomes, 1992). As purinas microbianas absorvidas (PA, mmol/dia) são calculadas a partir da excreção total de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por intermédio da equação: $PA = (DP - 0,385 \times PV^{0,75}) / 0,85$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e $0,385 \times PV^{0,75}$, a contribuição endógena na excreção urinária de DP (Verbic et al., 1990).

Entretanto, alguns parâmetros usados no modelo não estão completamente definidos, entre eles a relação N purínico: N total nos microrganismos ruminais, a recuperação de purinas absorvidas, a excreção de derivados de purinas de origem endógena e a digestibilidade intestinal das bases purinas (RNA). Cecava et al. (1990) e Reynal & Broderick (2005) avaliaram a relação N purínico: N total microbiano e observaram diferenças nesta relação entre os *pellets* isolados de bactérias associadas às partículas, de bactérias presentes no líquido ruminal e de protozoários.

Clark et al. (1992), Chen & Gomes (1992), Valadares Filho (1995), Carvalho et al. (1997), Valadares et al. (1999), Dias et al. (2000), Rennó et al. (2000), Leão et al. (2002), Rennó et al. (2003) e Pina et al. (2009) obtiveram relações N purínico: N total, na base seca do *pellet* bacteriano, de 13,7; 11,6; 17,6; 15,3; 13,4; 11,3; 11,7; 24,0; 19,5 e 10,0%, respectivamente.

A incompleta recuperação das purinas absorvidas tem sido descrita, sendo a saliva e o leite as principais rotas não-renais para excreção de DP. A recuperação das purinas absorvidas em novilhos foi de 0,87 (Beckers & Théwis, 1994) e de 0,85 (Chen & Gomes, 1992). Em vacas secas, Orellana Boero et al. (2001) relataram recuperação de 0,84, enquanto Vagnoni et al. (1997) encontraram recuperações de 0,83 a 0,86. Em vacas lactantes, Gonzalez-Ronquillo et al. (2003) relataram recuperação de 0,56 a 0,70. Segundo Chen & Ørskov (2003), a recuperação das purinas absorvidas como DP urinários é similar entre os grupos genéticos *BosTaurus*

e *Bos Indicus*. Pimpa et al. (2001) realizaram infusões duodenais de bases purinas em bovinos *Bos indicus* e encontraram recuperações urinárias de DP de 0,85.

No tecido animal, ocorre um processo cíclico e contínuo de degradação e síntese de novo de ácidos nucleicos, onde uma pequena fração das purinas é degradada a DP, que posteriormente são excretados na urina. A existência de uma fração endógena nos DP excretados foi confirmada em diversos experimentos, utilizando diferentes técnicas, e mostrou-se variável. Valores, em mmol/kg PV^{0,75}, de 0,259 a 0,530 para vacas lactantes foram citados por Gonzalez-Ronquillo et al. (2003), que encontraram média de 0,512 em vacas em diferentes estágios de lactação. Orellana Boero et al. (2001) estimaram menores excreções endógenas em vacas secas (0,236 mmol/kg PV^{0,75}) em relação aos citados para vacas em lactação. Em novilhos ou novilhas, Verbic et al. (1990), Fujihara et al. (1987) e Giesecke et al. (1994), citados por Orellana Boero et al. (2001), encontraram médias de 0,365; 0,455 e 0,489 mmol/kg PV^{0,75}, respectivamente. Beckers & Théwis (1994) relataram média de 0,531 mmol/kg PV^{0,75} em touros Belgian Blue. As diferenças entre as observações encontradas na literatura são atribuídas à utilização de diferentes técnicas e a possíveis variações no metabolismo dos ácidos nucleicos em animais em diferentes estádios fisiológicos (crescimento, lactação, gestação e manutenção).

Com relação ao grupo genético, têm sido reportadas diferenças na excreção urinária endógena de DP entre *Bos Taurus* e *Bos Indicus*. Pimpa et al. (2001), extrapolando o consumo de bases purinas ao nível zero de ingestão, encontraram excreção de DP endógena de 0,147 mmol/kg PV^{0,75} em bovinos Kedah-Kelantan (*Bos indicus*), enquanto Osuji et al. (1996) relataram excreção endógena de DP de 0,17 mmol/kg PV^{0,75} em bovinos Zebu (*Bos indicus*) mantidos em jejum. Segundo Chen & Ørskov (2003), para animais zebuínos devem ser considerados valores de DP endógeno inferiores (0,147 mmol/kg PV^{0,75}) aos 0,385 mmol/kg PV^{0,75} sugeridos por estes autores para animais taurinos.

Com a finalidade de determinar a contribuição endógena dos DP, a porcentagem de recuperação das purinas absorvidas excretadas como DP na urina e a digestibilidade intestinal do RNA em animais zebuínos, Barbosa (2009) conduziu dois experimentos com novilhas Nelore, fistuladas no rúmen, abomaso e íleo. No primeiro experimento, as novilhas (258 ± 20 kg) foram alimentadas com dieta única em quatro níveis de oferta de matéria seca (OMS) :1,2; 1,6; 2,0 e 2;4% do peso vivo (PV). As perdas endógenas e a recuperação de bases purinas como DP foram estimadas pela regressão entre a excreção diária de DP na urina (Y) e as bases purinas no abomaso (X), ambos expressas em mmol/kg PV^{0,75}, ou pela regressão entre a excreção de DP (Y), em mmol/kg PV^{0,75}, e o consumo de MS (X), em g/kg PV^{0,75}. No segundo experimento, utilizaram-se as mesmas novilhas Nelore (296 ± 15 kg), as quais foram alimentadas com a mesma dieta do primeiro experimento ao nível de manutenção (1,4% do peso vivo de MS). Os tratamentos foram constituídos por infusões de RNA no abomaso nas dosagens de 0; 33; 66 e 100 mmol/dia.

No primeiro experimento, a digestibilidade aparente do RNA no intestino delgado não foi afetada ($P > 0,05$) pela OMS, obtendo-se valor médio de 75,63%. A digestibilidade verdadeira de 92,78% foi obtida pela regressão entre a quantidade de RNA absorvida (\hat{Y}) em função do fluxo de RNA no abomaso (X), expressos em mmol/kg de PV^{0,75}. A relação média de N purinas: N-total nas bactérias isoladas no rúmen foi de 0,137. A excreção de DP em mmol/kg PV^{0,75} (\hat{Y}) = 0,0196CMS + 0,242, sendo 0,242 mmol/kg PV^{0,75}, a excreção endógena de DP. A excreção diária de DP (mmol/kg PV^{0,75}), em função do fluxo de RNA no abomaso (mmol/kg PV^{0,75}), se ajustou à regressão $\hat{Y} = 0,860X + 0,460$, sendo 0,86 a recuperação das purinas na urina e 0,460 mmol/kg PV^{0,75}, a fração de DP endógena.

No experimento 2, a excreção diária de derivados de purinas (\hat{Y} , mmol/kg PV^{0,75}), em função do fluxo de RNA no abomaso (X, mmol/kg PV^{0,75}), se ajustou à regressão: $\hat{Y} =$

$0,741X + 0,301$, sendo $0,301 \text{ mmol/kg PV}^{0,75}$ as perdas endógenas e $0,74$ a recuperação das purinas infundidas no abomaso como DP na urina. Dividindo-se o valor de $0,74143$ pela digestibilidade verdadeira no intestino delgado de $0,9278$, obtém-se a recuperação das purinas absorvidas como DP na urina de $0,80$.

Utilizando 116 observações em 24 bovinos não castrados, fistulados no rúmen, abomaso e íleo, em cinco experimentos, Rennó et al. (2000) verificaram que a produção de proteína microbiana obtida pelos DP na urina ou pelas bases purinas no abomaso não diferiu, e concluíram que o método de excreção urinária de DP pode ser utilizado para estimar a produção de proteína microbiana (Figura 1).

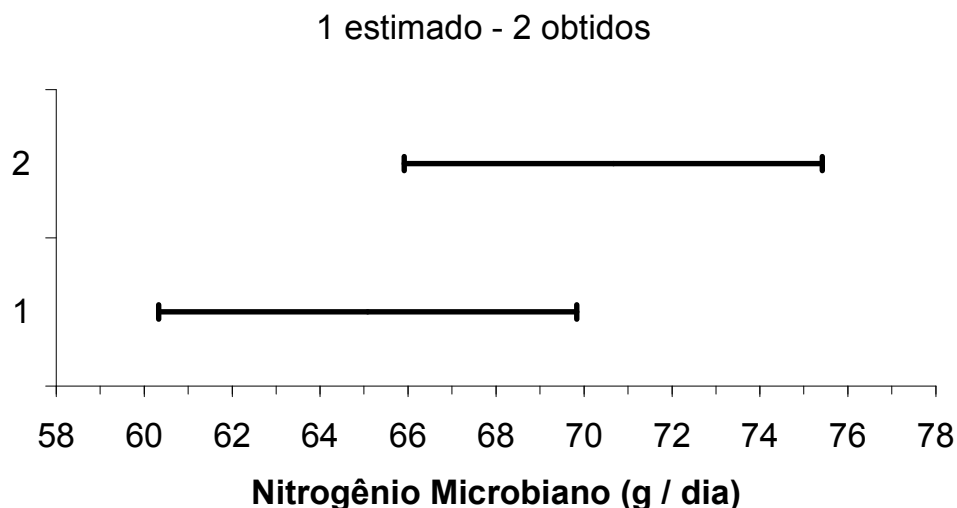


Figura 1 - Intervalo de confiança (95%) estimado para as observações do fluxo de nitrogênio microbiano estimado, utilizando a excreção urinária de DP (1) e obtido pelas bases purinas no abomaso. Valores obtidos com bovinos machos, provenientes de 106 observações.

O método baseado na excreção de DP requer coleta total de urina para quantificação da excreção diária dos DP na urina. O volume urinário tem sido obtido através de coletas com sondas por períodos de 24 a 120h, porém pesquisas têm sido realizadas para estimar o volume de excreção diária de urina e de DP a partir de uma única amostra coletada ao longo do dia (coleta *spot* de urina), possibilitando a utilização deste método em situações a campo e facilitando as coletas (Valadares et al., 1999; Oliveira et al., 2001).

A creatinina (C) é formada no músculo pela remoção de água da creatina-fosfato, originada do metabolismo do tecido muscular (Harper et al., 1982). A molécula de creatina-fosfato é degradada espontaneamente a taxas relativamente constantes formando a creatinina. A creatinina é um metabólito do qual o organismo já não necessita, não sendo utilizada para formação de novas moléculas, sendo, portanto, excretada pelos rins. A produção diária de creatina, e, por conseguinte, a excreção de creatinina é dependente da massa muscular e, portanto, proporcional ao peso do animal (Koren, 2000). Assim, uma vez determinada a excreção diária de creatinina em função do peso do animal e considerando a concentração urinária desta constante ao longo do dia, pode-se estimar o volume urinário excretado diariamente a partir da concentração de creatinina em uma amostra de urina coletada de um animal de peso conhecido.

A excreção de creatinina é pouco afetada pelo teor de proteína, carboidratos não fibrosos ou nitrogênio não protéico da dieta (Susmel et al., 1994; Vagnoni et al., 1997;

Valadares et al., 1997; Oliveira et al., 2001; Rennó et al., 2003), portanto não são esperadas variações devido à dieta. Dessa forma, se coletada uma única amostra diária de urina, denominada de amostra *spot*, e determinada a concentração de creatinina, o volume urinário e a excreção de outros compostos urinários podem ser estimados, eliminando-se o desconforto causado por funis ou cateteres utilizados na coleta total e simplificando a obtenção de dados experimentais.

Entretanto, como a creatinina é sintetizada no tecido muscular e a proporção de tecidos em animais em desenvolvimento é variável, a excreção diária de creatinina, expressa em função do peso vivo do animal, pode ser diferente em animais de idade ou peso vivo distintos. Chizzotti et al. (2008), trabalhando com novilhas Holandêsas, desenvolveram equações para estimar a excreção diária de creatinina (EC) em função do peso vivo e do peso vivo metabólico, em que $EC \text{ (mg/kg PV)} = 32,2 \pm 0,59 - 0,0109 \pm 0,0016 \times PV$ ($R^2 = 0,70$, RMSE = 1,07, n=22) e a $EC \text{ (mmol/kg PV}^{0,75}) = 0,83 \pm 0,04 + 0,0029 \pm 0,0004 \times PV^{0,75}$ ($R^2 = 0,68$, RMSE = 0,05, n=22).

Trabalhando com novilhas da raça Nelore de diferentes idades e tamanho corporal (quatro com peso médio de aproximadamente 127kg \pm 24, três de 221kg \pm 22 e oito de 434kg \pm 29), confinadas em baias individuais, Pereira (2009) avaliou o efeito de 6 períodos de coleta total de urina (4 horas cada) sobre a relação DP:C, verificando ausência de efeito do tempo de coleta sobre a relação DP:C, a qual foi em média de 2,05 (Tabela 2). Essas observações indicam que a coleta de uma única amostra *spot* de urina, em qualquer horário do dia, pode ser utilizada para determinar a excreção urinária de derivados de purina. Corroborando com as observações de Valadares et al. (1999), de que a coleta *spot* de urina para quantificar o volume de urina e a produção de N microbiano, baseado na excreção de creatinina, apresentou-se semelhante à coleta total de urina.

A excreção média de creatinina foi de 26,35 mg/kgPV ou 0,95 mmol/kgPV^{0,75}, com intervalo de confiança de IC(μ)0,95= [25,56 \leq μ \leq 27,14] e IC(μ)0,95= [0,89 \leq μ \leq 1,02] para a excreção de creatinina expressa em mg/PV e mmol/PV^{0,75}, respectivamente. Esse valor (26,35 mg/PV) encontra-se próximo ao encontrado por Barbosa et al. (2006) de 27,11 mg/PV para novilhas da raça Nelore, valor este incluído dentro do IC obtido por Pereira (2009).

Tabela 2 - Variação na excreção de compostos urinários em novilhas Nelore

Item	Período de Coletas (horas)						Valor-P	EPM
	24-4	4-8	8-12	12-16	16-20	20-24		
Creatinina								
g	1,29	1,23	1,31	1,27	1,24	1,22	0,1430	0,0403
mg/PV	4,30	4,12	4,35	4,28	4,14	4,10	0,1802	0,0939
mmol/PV ^{0,75}	0,155	0,148	0,157	0,154	0,149	0,147	0,1469	0,0035
Derivados de Purina								
g	2,95	3,07	3,29	3,12	3,26	3,11	0,1242	0,1008
mg/PV	11,14	11,50	12,49	11,63	12,02	11,55	0,1257	0,5008
mmol/PV ^{0,75}	0,27	0,28	0,31	0,29	0,30	0,29	0,1102	0,0101
mmol/dia	118,98	119,97	132,92	133,76	126,17	119,82	0,4329	7,5715
Relação								
DP:C ¹	1,99	2,01	2,21	2,15	1,99	1,97	0,5443	0,1403

Adaptada de Pereira (2009).

¹ - Relações calculadas a partir da concentração em mmol/L.

EPM = erro padrão da média.

Considerando os resultados de experimentos conduzidos com animais Nelore (Barbosa et al., 2006; Barbosa, 2009; Pereira, 2009), sugere-se que a estimativa da síntese de proteína microbiana ruminal pode ser feita a partir da coleta de uma única

amostra *spot* de urina obtida em qualquer hora do dia, que as purinas absorvidas (PA) podem ser estimadas a partir da excreção dos derivados de purinas (DP) na urina pela equação: $PA = [DP - (0,301 \text{ mmol/kg PV}^{0,75})] / 0,80$, e que a produção de compostos nitrogenados microbianos (Nmic) pode ser estimada a partir das purinas absorvidas, pela equação: $Nmic = (70 \times PA) / (0,93 \times 1000 \times 0,137)$, sendo 70 o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,93 a digestibilidade verdadeira das purinas e 0,137 a relação N purinas:N-total média nas bactérias isoladas no rúmen (Barbosa, 2009).

EFICIÊNCIA MICROBIANA

Para maximizar a eficiência de produção animal e reduzir a necessidade de proteína verdadeira na dieta, aumentos na produção e na passagem de proteína microbiana ruminal para o trato gastrointestinal são desejados. A saída de matéria orgânica microbiana do rúmen é uma função da quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen (ATP produzido) e da eficiência com a qual os microrganismos ruminais utilizam a energia disponível para seu crescimento (Owens & Goetsch, 1993). Segundo Russell (1984), os microrganismos ruminais derivam a maior parte da sua energia da fermentação de carboidratos, sendo que as bactérias ruminais podem ser divididas em dois grupos de acordo com o tipo de carboidrato utilizado: microrganismos (BFCF) que fermentam celulose e hemicelulose (carboidratos fibrosos), crescem mais lentamente e utilizam amônia para sintetizarem proteína, enquanto os microrganismos (BFCNF) que fermentam açúcares, amido e pectina (carboidratos não fibrosos), crescem mais rapidamente em relação aos anteriores e utilizam amônia, peptídeos e aminoácidos para sintetizarem proteína (Russell et al., 1992).

A eficiência de crescimento microbiano (EFMic) pode ser expressa em termos de MS de células microbianas produzidas por mol de substrato fermentado (Y_{SUB}) ou mol de ATP disponível (Y_{ATP}). A produção microbiana total no rúmen, geralmente aumenta com o aumento da quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen, sendo que a EFMic independe da produção microbiana e esses dois termos não devem ser confundidos (Owens & Goetsch, 1993).

A produção microbiana normalmente é medida em sistemas de cultivo em batelada ou em sistemas contínuos, os quais assemelham-se mais às condições ruminais, sendo que no “steady state” em condições de sistemas contínuos, as bactérias possuem uma taxa de crescimento específica (taxa de replicação menos a taxa de lise) igual à taxa de passagem. Nesse sistema, as bactérias crescem até o limite da disponibilidade de nutrientes e energia, sendo que a energia (ATP) normalmente é o fator limitante.

A EFMic varia de acordo com a composição iônica do meio, com a composição da célula e com a taxa de crescimento microbiano. A composição média das bactérias ruminais é de aproximadamente 62,5% de PB, 21,1% de carboidratos, 12% de gordura e 4,4% de cinzas na base da MS (Russell et al., 1992). Similar aos animais, as bactérias requerem energia para manutenção e são mais eficientes quando crescem ou se multiplicam mais rapidamente. Nos custos de manutenção estão incluídos os nutrientes e a energia gasta para motilidade, *turnover* dos constituintes celulares, transporte ativo, etc. Espécies de bactérias diferem nos seus custos de manutenção, sendo que BFCF e BFCNF requerem 0,050 e 0,150 g de carboidrato por grama de bactéria por hora, respectivamente (Russell et al., 1992).

Duas diferentes bases têm sido utilizadas para calcular a EFMic, a qual pode ser expressa em relação à matéria orgânica verdadeira (MOVDR) ou aparente digerida no rúmen (MOADR). O desaparecimento do alimento no rúmen difere da

quantidade de alimento verdadeiramente digerido no rúmen, uma vez que de 24 a 50% do peso da digesta é incorporado às células microbianas. A fermentação verdadeira excede a aparente pela quantidade de MO incorporada dentro das células microbianas, sendo a MO verdadeiramente fermentada calculada pela adição da MO microbiana à MO desaparecendo do rúmen pela digestão, o que aumenta a MO fermentada e diminui a EFMic.

A expressão da EFMic em termos de gramas de N microbiano / unidade energia disponível no rúmen é justificada devido a energia ser o fator mais limitante ao crescimento microbiano. Desse modo, maximizando a quantidade de PBMic sintetizada por unidade de energia fermentada, resulta em um máximo crescimento microbiano. Contudo, segundo Bach et al.(2005), apesar da EFMic medida em relação à disponibilidade de energia ser uma medida eficiente da utilização da energia pelos microrganismos (Figura 2), esta não é um bom indicador da eficiência de utilização do nitrogênio disponível (Figura 3).

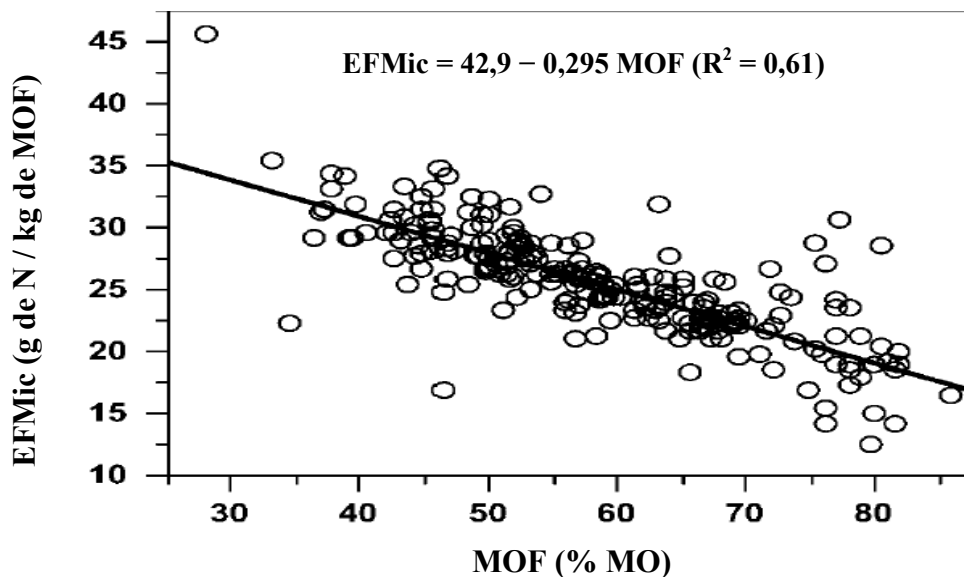


Figura 2 - Relação entre a eficiência microbiana e a matéria orgânica fermentada no rúmen.

Adaptada de Bach et al. (2005).

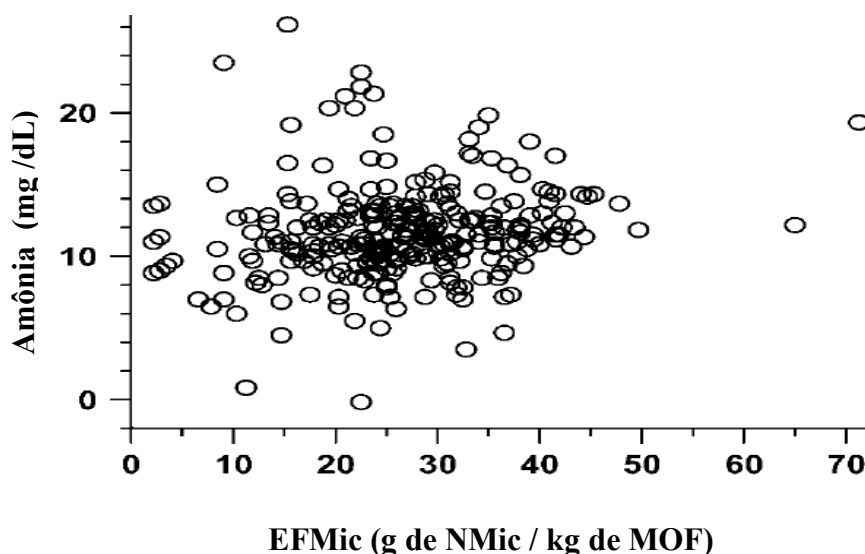


Figura 3 - Relação entre a a concentração ruminal de amônia e a eficiência microbiana.

Adaptada de Bach et al. (2005).

A falta de correlação existente entre a EFMic estimada através da energia disponível e a concentração ruminal de amônia, indica a incapacidade desta em prever a eficiência com que os microrganismos capturam o N disponível no rúmen. Dessa forma, uma eficiência de utilização de N pelos microrganismos deveria ser calculada como: $EUN = (g \text{ de NMic} / g \text{ de N disponível}) \times 100$. Bach et al. (2005) encontraram uma relação entre a EUN e a concentração ruminal de amônia, descrita pela equação: $NH_3 \text{ (mg / dL)} = 43,6 - 0,469EUN$ ($R^2 = 0,78$). Dessa forma, a EFMic e a EUN parecem ser mensurações complementares da eficiência de uso de nutrientes pelos microrganismos.

Bach et al. (2005) relataram uma relação quadrática entre EFMic e EUN ($\hat{Y}_{EUN} = 15,31 + 3,724 * EFMic - 0,0643 * EFMic^2$), sendo que, o ótimo para EFMic de 29 g de NMic / kg de MOF ocorreu com uma EUN de 69 g de NMic / 100 g de nitrogênio disponível. Isso implica que os microrganismos capturam 69 % do nitrogênio disponível e sintetizam 29 g de NMic / kg de MOF, sob condições ideais de crescimento. Dessa forma, parece ser uma meta razoável assegurar o suprimento de 42 (29 / 0,69) g de compostos nitrogenados disponíveis a nível de rúmen por kg de MOVDR.

FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA MICROBIANA

A literatura a respeito da síntese de proteína microbiana é confusa e, freqüentemente contraditória, já que complexos fatores estão envolvidos, com o complicador de que há grandes dificuldades para mensurá-los de maneira adequada (Dewhurst et al., 2000a). Dos fatores que afetam a síntese de proteína microbiana, a disponibilidade e a sincronização entre energia e compostos nitrogenados (N) no rúmen, têm sido reconhecidos como os mais importantes (Russell et al., 1992). E, considerando que as proteínas são rápida e extensivamente degradadas no rúmen, provavelmente, a taxa na qual a energia é disponibilizada seja o fator mais limitante à síntese de proteína microbiana, uma vez que os carboidratos fibrosos apresentam

lenta taxa de digestão. Desta forma, o fornecimento de quantidades moderadas de carboidratos não fibrosos, geralmente aumenta o fluxo de N microbiano para o abomaso, desde que não haja limitação da disponibilidade N no rúmen. Concordando com Stern et al. (1994), os quais afirmaram que os principais compostos necessários para o crescimento microbiano ruminal são a proteína bruta e os carboidratos, os quais podem ser fermentados para proporcionar nitrogênio amoniacal, aminoácidos, esqueletos de carbono e energia na forma de ATP, para a síntese microbiana.

Fontes de energia

O fornecimento de energia, usualmente, é o primeiro fator limitando o crescimento microbiano ruminal. Dessa forma, a maioria dos sistemas nutricionais utiliza direta ou indiretamente estimativas do suprimento de energia para o animal, a fim de predizerem a síntese microbiana. Assim, a produção de proteína microbiana pode ser estimada com base na energia metabolizável (EM), na energia líquida de lactação (EL_L), nos carboidratos digestíveis (CHOD), na matéria orgânica fermentável (MOF) ou no total de nutrientes digestíveis (NDT) (INRA 1988; AFRC, 1992; Tamminga et al., 1994; Madsen et al. 1995; e NRC, 2001). Segundo o NRC (1985), a produção de PBMic é relacionada à energia fermentada no rúmen, mais comumente expressa como uma função da matéria orgânica aparentemente degradada (MOADR). Em todos esses sistemas, a síntese de PBMic por unidade de energia é considerada fixa, embora em alguns deles já se considere o fato de que nem todos os nutrientes disponíveis para os animais ruminantes podem ser utilizados pela microbiota ruminal.

Tem sido demonstrado que, em dietas contendo altos níveis de concentrado, a eficiência de síntese microbiana ruminal é menor do que em dietas com uma relação volumoso:concentrado adequada (AFRC, 1992). Contudo, segundo Clark et al. (1992), em experimentos nos quais observaram-se variação de 24 a 81% de forragem na dieta, não se detectou alteração significativa no fluxo de nitrogênio não amoniacal (NAN) e de aminoácidos para o intestino delgado de vacas de leite, o que inviabilizou o estabelecimento de uma relação concentrado:volumoso adequada.

Segundo Clark et al. (1992), a matéria orgânica ingerida (MOI) é um fator importante que contribui para determinar a quantidade de N microbiano passando para o intestino delgado ($N_{Mic} (g/dia) = 14,69MOI + 21,94, r^2 = 0,62$), sendo a matéria orgânica verdadeiramente degradada no rúmen ($N_{Mic} (g/dia) = 79,29MOVDR - 3,38MOVDR^2 - 152,89, R^2 = 0,49$) um preditor mais acurado em relação à matéria orgânica aparentemente degradada no rúmen ($N_{Mic} (g/dia) = 121,09MOADR - 8,87MOADR^2 - 131,92, R^2 = 0,25$).

Contudo, a ingestão de matéria orgânica foi mais altamente correlacionada com a passagem de N microbiano para o intestino delgado em relação a MOVDR e a MOADR, sugerindo que fatores outros que a MODR contribuem para a quantidade de PBMic sintetizada no rúmen. O baixo coeficiente de determinação obtido para a relação entre a MOVDR e a eficiência de síntese microbiana (EFMic), expressa em g de N microbiano / kg de MOVDR ($N_{Mic} = 6,58MOVDR - 0,41MOVDR^2 + 7,30, R^2 = 0,16$), indica que outros fatores afetam a EFMic, sendo esses fatores, provavelmente, a quantidade e proporção de outros nutrientes providos na dieta, a sincronização da degradação dos ingredientes da dieta de maneira a disponibilizar nutrientes durante todo o tempo para atender aos requerimentos microbianos, e condições do ambiente ruminal (Clark et al., 1992).

A fermentação dos vários componentes dos CNF, tais como amido, açúcares, ou fibra solúvel difere nas características de digestão e no perfil dos ácidos orgânicos produzidos. Diferenças entre carboidratos purificados na produção de células

microbianas em culturas mistas têm sido registradas (Strobel & Russell, 1986), mas, geralmente, diferenças entre CNF na produção de massa microbiana ou PBMic em culturas mistas de microrganismos não têm sido consideradas (Hall & Herejk, 2001).

Avaliando o efeito de diferentes frações (pectina, sacarose e amido) dos CNF e da FDN sobre a produção de PBMic em sistemas de fermentação *in vitro*, com o pH sendo mantido acima de 6,49 nos tubos de fermentação, Hall & Herejk (2001) observaram maior produção para o amido, a pectina, a sacarose e a FDN, respectivamente. Também foi observado que os picos de produção de PBMic foram atingidos com 15,6; 13,5; 12,6 e 19,3 horas após o início da fermentação, respectivamente, para amido, pectina, sacarose e FDN.

Um aspecto interessante da utilização de açúcares em dietas de ruminantes está relacionado ao seu efeito sobre o metabolismo de nitrogênio e crescimento microbiano. Uma redução na concentração de amônia ruminal tem sido notada em quase todos os estudos em que açúcares foram adicionados às dietas. Essa redução sugere um aumento no crescimento microbiano e na eficiência de utilização dos compostos protéicos de rápida degradação ruminal.

Chamberlain et al. (1993) demonstraram que os açúcares solúveis (sacarose, lactose e frutose) são superiores ao amido como fonte de energia para a fixação de nitrogênio microbiano no rúmen. Essas observações sugerem a existência de uma relação ótima entre açúcares disponíveis e nitrogênio solúvel, sendo que Hoover & Miller-Webster (1998) citaram um aumento médio de 25% no crescimento microbiano, quando a relação proteína / açúcar solúvel passou de 1:1 para 2 ou 3:1.

Uma vez que os açúcares representam, normalmente, menos de 10% do total de CNF, o amido torna-se a principal fonte de carboidratos para o crescimento microbiano (Hoover & Miller-Webster, 1998). A taxa de fermentação de todos os carboidratos determina seu destino no trato digestivo e a eficiência com a qual os microrganismos podem utilizá-los (Van Soest et al., 1991). O conhecimento da variação na degradabilidade efetiva (DE) das várias fontes de amido, as quais podem ser utilizadas como ingredientes, para sincronizar a disponibilidade de energia e proteína para maximizar a fermentação ruminal é uma estratégia interessante na formulação de dietas para ruminantes.

A variabilidade na DE pode ser originada por vários fatores, como por exemplo, a proporção entre as moléculas constituintes do amido (amilose e amilopectina), a estrutura [presença ou não de pericarpo, presença ou não e proporção dos endospermas (aleurona, periférico, córneo, vítreo e farináceo)], processamentos como a moagem, trituração, floculação, peletização, etc.

Segundo Dewhurst et al. (2000a), a inclusão de amido em dietas para ruminantes pode afetar os microrganismos ruminais de várias maneiras, dificultando uma predição do resultado final. Entretanto, uma inclusão moderada beneficia os microrganismos ruminais, através do aumento no substrato e na taxa de crescimento das bactérias associadas à fase líquida.

Hristov et al. (2005), avaliando o efeito da dextrose, amido, FDN e uma mistura de carboidratos sobre o fluxo de N microbiano para o duodeno, observaram que o mesmo foi deprimido pela FDN em relação às outras fontes de CHO e o fluxo de N microbiano formado a partir da amônia foi maior para o amido de milho em relação às outras fontes de CHO. A concentração e o tamanho do *pool* de NH₃ também foram reduzidos pela infusão ruminal de dextrose e amido de milho. A proporção de N bacteriano sintetizado a partir de NH₃ ruminal foi maior para a dieta a base de amido de milho e, conseqüentemente, a perda e o efluxo foram menores, demonstrando que o fornecimento de carboidratos prontamente fermentáveis pode diminuir a concentração de amônia ruminal por meio do decréscimo na produção de amônia ou pelo aumento na retenção de amônia como matéria microbiana.

Revisando alguns experimentos sobre o efeito das fontes de amido sobre o metabolismo microbiano ruminal, Clark et al. (1992) sugeriram que, proporcionalmente, uma maior quantidade de PBMic e uma menor quantidade de nitrogênio não amoniacal e não microbiano passaram para o intestino delgado, quando a fermentação da MO foi aumentada no rúmen. Dessa forma, a utilização de fontes de carboidratos prontamente degradadas, tais como, a cevada, na alimentação de vacas de leite foi associada com um aumento da síntese de proteína microbiana ruminal, o que se deve, possivelmente, a uma maior disponibilidade de energia. Dietas a base de milho aumentaram a quantidade de compostos nitrogenados não amoniacais e não microbianos passando para o intestino delgado, resultando em pequenas mudanças na passagem de nitrogênio não amoniacal, quando diferentes grãos de cereais foram fornecidos em dietas para vacas de leite.

pH ruminal

Um fator que pode alterar a produção de PBMic ruminal é o valor de pH. Baixos valores de pH podem ser deletérios aos microrganismos e também estão relacionados com a redução na digestibilidade dos componentes fibrosos das plantas (Verbic, 2002). Segundo Strobel & Russell (1986), em baixos valores de pH ruminal, a energia disponível para o crescimento microbiano é desviada para a manutenção do pH interno dos microrganismos, reduzindo, dessa forma, a eficiência de utilização da energia para síntese microbiana.

Uma generalização é que o pH abaixo de 6 inibe a degradação da celulose. Sob condições normais, os microrganismos celulolíticos crescem bem em pH 6,7 e desvios substanciais para elevar ou diminuir esse valor são inibitórios. Uma variação de pH em que a atividade mantém-se próxima do normal seria de 0,5 unidades. Valores de pH inferiores a 6,2 inibem a taxa de digestão e aumentam o *lag time* para a degradação da parede celular (Van Soest, 1994).

O rúmen é bem tamponado pela secreção salivar, mas se a quantidade de FDN dietética for restrita e a taxa de fermentação de carboidratos for rápida, o pH pode declinar. Estudos indicam que, quando as dietas contêm menos de 40 % de forragem (20 % FDN), um baixo crescimento microbiano é observado. Uma mistura de bactérias ruminais que foi incubada *in vitro*, produziu 50 % menos proteína microbiana em pH 5,7 em relação ao pH de 6,7 (Strobel & Russell, 1986). O CNCPS ajusta a produção de proteína microbiana utilizando o pH, sendo este predito a partir do conteúdo de FDN dietético. Quando o conteúdo de FDN da dieta é menor ou igual a 20% da matéria seca, a produção de proteína microbiana decresce 2,5 % para cada 1% de decréscimo na FDN (Russell et al., 1992).

Apesar do pH exercer um pronunciado efeito sobre a síntese de proteína microbiana, esse não é correlacionado com a eficiência de síntese microbiana. A correlação negativa entre o fluxo ruminal de N microbiano e o pH é o resultado da maior disponibilidade de MO degradada no rúmen, implicando em uma maior disponibilidade de energia e, conseqüentemente, de síntese microbiana (Bach et al., 2005).

Durante a adaptação a dietas com altos teores de concentrado, o pH exerce uma pressão seletiva sobre os microrganismos sensíveis. Quando o pH cai, bactérias amilolíticas e resistentes à acidez aumentam, enquanto microrganismos celulolíticos diminuem. Assim, a atividade relativa da amilase em relação a celulase aumenta. Tem sido sugerido que o pH ótimo para a amilase ruminal está em torno de 5,6 (Kaufmann et al. 1980, citados por Owens & Goetsch, 1993).

A inibição da digestão da fibra pode se tornar um problema na adaptação dos animais à dieta concentrada, devido ao possível acúmulo desta no rúmen. Pouca

fibra está presente em dietas com altos teores de concentrado e, sendo a forragem freqüentemente processada, a taxa de passagem pode ser aumentada, a não ser que a retenção ruminal seletiva prolongue o tempo de permanência ruminal da fibra para a sua digestão nesse compartimento. Dependendo desse balanço, mesmo que a taxa de digestão da fibra possa ser deprimida, a extensão da sua digestão ruminal pode não ser reduzida substancialmente até que o pH caia e permaneça abaixo de 6,0.

Quando o pH decresce de 6, ficando entre 5,0 e 5,5, muitos microrganismos ruminais cessam o seu crescimento, apesar de conseguirem sobreviver mesmo em altas concentrações de H^+ . A membrana celular desses microrganismos não permite a entrada de H^+ ou OH^- , mas outros nutrientes tais como ácido láctico entram e alteram a força próton-motriz, que é responsável pela geração de ATP, a partir do gradiente iônico entre membranas. Quando o pH é alterado, a concentração de íons e a permeabilidade celular podem mudar, reduzindo o potencial para a geração de ATP. Certos ácidos lipofílicos, tais como o láctico, atuam como condutores de prótons, equilibrando as concentrações internas e externas de H^+ e reduzindo a força próton-motriz (Bergen & Bates, 1984). O crescimento microbiano por unidade de energia fermentada é menor quando o pH é baixo, possivelmente devido à redução na geração de ATP através da força próton-motriz. Também a maioria dos ácidos semelhantes ao láctico, que inibe os microrganismos em altas concentrações, sendo esta inibição mais efetiva quando o pH é baixo; isto possivelmente se deve a maior facilidade de penetração na membrana celular da forma não ionizada desses ácidos (Owens & Goetsch, 1993).

Fontes de N

A degradação ruminal da proteína é uma das principais razões para a ineficiente utilização da mesma em ruminantes. Por outro lado, os compostos nitrogenados que são liberados no rúmen durante a degradação protéica são indispensáveis para o crescimento microbiano ruminal (Verbic, 2002). A degradação ruminal da proteína dos alimentos é um fator importante que afeta o aporte de aminoácidos para o intestino delgado. A velocidade e a quantidade de proteína degradada no rúmen pode condicionar a quantidade de PBMic sintetizada no rúmen e determinar a quantidade total de proteína não degradada no rúmen que chega ao duodeno (Stern et al., 1994).

As exigências dos microrganismos ruminais para compostos nitrogenados são atendidas pela proteína dietética degradada (PDR) e pelo nitrogênio metabólico endógeno proveniente da oxidação de aminoácidos nos tecidos e órgãos, que é reciclado para o rúmen através do sangue ou da saliva. Alguns sistemas nutricionais (INRA, 1988; AFRC, 1992 e NRC, 2001) propõem que a captura da proteína degradada no rúmen não é completa, sendo necessário um excesso de PDR.

Segundo Hoover & Stokes (1991), existe uma forte correlação entre o nível de proteína degradada (PDR) da dieta e a síntese de PBMic. A máxima eficiência e o maior aporte de PBMic para o duodeno é obtido em dietas contendo 10 a 13% de PDR na MS para vacas em lactação. Contudo, esses níveis podem ser alterados de acordo com o nível de produção, estágio fisiológico, categoria animal, etc. Assim sendo, não devem ser tomados como verdade absoluta.

A quantidade de proteína bruta ingerida por vacas, influencia significativamente a passagem de nitrogênio não amoniacal para o intestino delgado. Mas diferenças na passagem de PBMic para o intestino delgado não foram significativamente influenciadas pelo nível de PB da dieta, quando este variou de 11 a 25%. Segundo Clark et al. (1992), a passagem de PBMic para o duodeno foi mais influenciada pela ingestão de MS e outros fatores dietéticos do que pelo nível de PB.

O efeito do nível de PB dietético foi avaliado por Stern et al. (1986), alimentando vacas com quantidades crescentes de glúten de milho, a fim de alterar o nível de PB da dieta (13,1 a 22,9% MS), sem alterar a matéria orgânica verdadeira degradada no rúmen (MODR). Verificaram que houve um aumento na concentração de amônia no fluido ruminal (9,6 a 14,4 mg/dL), mas que a MOVDR e o fluxo de aminoácidos provenientes dos microrganismos ruminais não foram alterados, sugerindo que a disponibilidade de energia foi mais limitante para a síntese microbiana do que a concentração de NH_3 ruminal.

Outra consideração importante obtida é que, quando a disponibilidade de nitrogênio aumenta em relação à MOVDR, a eficiência de síntese microbiana diminui, ou seja, se a disponibilidade de N ruminal é relativamente alta em relação à MODR, a quantidade de N microbiano sintetizado por unidade de MODR diminui, indicando que a utilização de energia para a síntese de PBMic torna-se menos eficiente porque o excesso de N não é usado pelos microrganismos ruminais.

Um fator importante influenciando a síntese e o fluxo de PBMic para o duodeno, é sem dúvida, a fonte de nitrogênio dietético. Santos et al. (1998), revisando dados publicados na literatura, onde fontes de PNDR substituíram o farelo de soja, concluíram que o aumento da PNDR dietética não melhorou consistentemente o desempenho de vacas em lactação, sugerindo que a inclusão de fontes de PNDR pode ter resultado em redução da síntese microbiana ruminal. Ipharraguerre & Clark (2005), avaliando o efeito de diferentes fontes de proteína dietética sobre o fluxo de PBMic para o duodeno de vacas observaram uma redução de 7% no fluxo de PBMic, quando o farelo de soja foi substituído por fontes de PNDR, suportando as conclusões de Hoover & Stokes (1991), Clark et al. (1992) e Firkins (1996) de que a deficiência de energia, aminoácidos, peptídeos ou amônia no rúmen pode deprimir o crescimento microbiano ruminal, quando fontes de PDR são substituídas por PNDR.

Devido à capacidade dos microrganismos ruminais em utilizar eficientemente fontes de nitrogênio não protéico como substrato para crescimento, essas se tornam um fator importante na formulação de dietas. Russell et al. (1992) indicaram que os microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos requerem somente amônia como fonte de N, enquanto espécies que degradam CNF requerem aminoácidos pré-formados.

Wallace (1996) observou que a proporção de nitrogênio derivado da amônia varia de acordo com a fonte de N disponível, postulando que a contribuição mínima para N microbiano a partir do NH_3 era de 26 %, quando altas concentrações de peptídeos e aminoácidos estavam presentes; com um potencial máximo de 100 %, quando NH_3 foi a única fonte de N. Griswold et al. (1996) demonstraram que outras formas de N que não NH_3 são necessárias não somente para maximizar o crescimento microbiano, mas também, para uma adequada digestão ruminal da fibra.

Taxa de passagem

A taxa de passagem é outro fator que afeta a eficiência de síntese microbiana ruminal. Em condições onde a taxa de passagem é elevada, espera-se uma redução nos custos de manutenção dos microrganismos, devido a uma redução no tempo de permanência ruminal dos mesmos. Do ponto de vista teórico, espera-se que o máximo de produção microbiana possa ocorrer quando a taxa de diluição for igual à taxa de replicação microbiana (Ørskov, 1992). Essa teoria tem sido confirmada experimentalmente, (Harrison et al., 1975; Kennedy & Milligan, 1978; Dewhurst & Webster, 1992 e Murphy et al., 1994).

O AFRC (1992) propõe que a eficiência de síntese microbiana seja aumentada aproximadamente 20%, caso a taxa de passagem ruminal for elevada de 0,02 para 0,08 h⁻¹. A taxa de passagem é função da ingestão de matéria seca. Dessa forma, pode-se assumir que a eficiência de síntese microbiana ruminal pode ser aumentada pelo aumento no consumo de matéria seca (Verbic, 2002).

A taxa de passagem também influencia os padrões de fermentação ruminal e, conseqüentemente, a síntese microbiana. Taxas de passagem rápidas do líquido ruminal, geralmente estão associadas com altas concentrações de acetato. A duração e intensidade da ruminação são grandemente determinadas pelo nível e forma da fibra ingerida. Quando ruminantes aumentam a produção de saliva, aumentam também, o tamponamento e a diluição do conteúdo ruminal. A diluição faz com que a concentração de ácidos ruminais seja menor em dietas à base de forragens em relação ao concentrado (50 a 100 versus 80 a 150 mmol/L).

O crescimento microbiano e a eficiência são melhorados em altas taxas de passagem. Sabe-se que a taxa de passagem é dependente da ingestão de alimentos (Evans, 1981), sendo a melhora do crescimento e eficiência microbiana atribuídos a uma redução nos requerimentos de manutenção dos microrganismos (Meng et al., 1999). Dessa forma, assegurar uma ingestão adequada de matéria seca é uma forma de aumentar a produção de PBmic e reduzir a necessidade de PNDR nas dietas (Evans, 2003).

PREDIÇÃO DO FLUXO DE PROTEÍNA MICROBIANA

Os modelos mais recentes de nutrição de ruminantes reconhecem a necessidade biológica do balanço entre carboidratos fermentados e PDR para satisfazer as exigências dos microrganismos para aminoácidos pré-formados e amônia. Esses modelos podem variar, desde empíricos (melhor ajuste estatístico) a mecanicistas (tentam descrever quantitativamente processos biológicos) e são usados para a predição de eventos a partir dos quais as recomendações de alimentação são baseadas (Firkins, 2002).

Equações matemáticas que descrevem a relação entre a entrada de alimentos e a síntese de PBmic são necessárias para quantificar e otimizar a síntese microbiana. Várias equações para a predição da síntese microbiana têm sido formuladas e aplicadas com relativo sucesso em sistemas de avaliação de proteína de alimentos e em grandes modelos mecanicistas de processos de fermentação ruminal, como o CNCPS, (Dijkstra et al., 1998).

Nos atuais sistemas de avaliação de proteína para ruminantes, a produção de PBmic é predita principalmente através de equações empíricas. Embora a terminologia e detalhes sejam diferentes nesses sistemas, eles são conceitualmente similares em seus objetivos de predizer a quantidade de N microbiano disponível para o metabolismo do animal hospedeiro (Beever & Cottrill, 1994). A síntese de PBmic é calculada a partir da quantidade de energia ou matéria orgânica degradável, aplicando-se fatores fixos ou variáveis para a produção microbiana por unidade de energia ou matéria orgânica degradada. Nenhum desses sistemas considera explicitamente o efeito das interações entre os microrganismos no rúmen e as variáveis da atividade microbiana na degradação da MO (Dijkstra et al., 1998).

A síntese de PBmic tem sido estimada a partir do suprimento de energia para os microrganismos através do consumo de NDT, energia líquida, matéria orgânica ou carboidratos fermentados no rúmen. No NRC (1985), o suprimento de proteína microbiana foi predito a partir do consumo de energia líquida para lactação (CEL_l) através da equação: 6,25(30,93 + 11,45CEL_l). Nas publicações mais recentes deste conselho (NRC, 2000 e 2001) foi utilizado um fator de eficiência microbiana fixo de

13%, em relação ao consumo de NDT, quando o fornecimento de proteína degradada no rúmen não é limitante. Assim a PBMic (g/dia) nestas publicações é estimada por: consumo de NDT (kg/dia) \times 130, sendo que desta quantidade, aproximadamente 64% é metabolizável (80% de proteína microbiana verdadeira e 80% de digestibilidade intestinal da proteína microbiana).

Esse tipo de cálculo mecanicista ignora o local de digestão (rúmen x intestino), o que influencia a disponibilidade de energia para o crescimento microbiano ruminal. Contudo, essa variável resultante do local de digestão parece ter, relativamente, baixo impacto na predição da energia para o crescimento microbiano, comparado com a ingestão de matéria seca (Firkins, 2002). A utilização de modelos empíricos para a predição da síntese microbiana pode ser uma forma de sumarizar os dados de pesquisa, e uma importante ferramenta utilizada na formulação de dietas (Dijkstra et al., 1998).

Em modelos mecanicistas, como o CNCPS, a predição é mais complexa. Neste, os microrganismos do rúmen são classificados de acordo com os tipos de carboidratos que eles fermentam. Os microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos e não-fibrosos têm diferentes requerimentos de manutenção (o CNCPS utiliza 0,05 e 0,15 g de carboidrato por g de microrganismo por hora, respectivamente), e a eficiência de crescimento das bactérias que digerem os CNF é otimizada na presença de 14% de peptídeos como porcentagem de CNF. Assim, o requerimento de proteína degradável é considerado para atender a utilização de carboidratos não-fibrosos e fibrosos. A taxa de crescimento microbiano de cada categoria é diretamente proporcional à taxa de digestão de carboidratos, desde que uma adequada fonte de nitrogênio esteja disponível. A extensão de digestão no rúmen depende da digestão das frações dos carboidratos do alimento e da taxa de passagem no rúmen. Portanto, a extensão da digestão depende de fatores como nível de consumo, tamanho de partículas, taxa de hidratação, lignificação, além das características de cada fração de carboidrato e de proteína.

No Brasil, informações completas, obtidas a partir de 42 pesquisas (incluindo dissertações de mestrado e teses de doutorado) conduzidas no DZO da UFV, nas quais foram utilizados animais para a produção de carne e leite, submetidos a diferentes condições de alimentação, foram sumarizadas e os respectivos valores de síntese e eficiência de utilização de NDT para a produção de PBMic estão resumidos na Tabela 3.

A partir desses dados se realizou uma meta-análise (St-Pierre, 2001), que tem sido o procedimento mais adequado para se avaliar os dados provenientes de vários estudos com a finalidade de construção de modelos quantitativos os quais possam explicar o efeito de uma ou mais variáveis independentes sobre a variável dependente de interesse. Como normalmente existem diferenças entre estudos, e se as mesmas não forem consideradas durante a análise dos dados, elas podem incorrer em estimativas viesadas para os parâmetros estimados. Dessa forma, durante o procedimento de análise, o efeito de experimento e a sua interação com as variáveis independentes foi considerado como componente aleatório em um modelo linear mixto (St-Pierre, 2001), sendo a solução para o modelo determinada através do PROC MIXED SAS (version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

Na Tabela 3, pode-se observar a influência da categoria animal ($P = 0,0016$) e do consumo de NDT ($P < 0,0001$) sobre a eficiência microbiana (g de PBMic / kg de NDT consumido). Contudo, não foi observado um efeito da interação entre categoria animal e consumo de NDT ($P = 0,6949$), dessa forma, pode-se concluir que a inclinação do modelo linear obtido pela relação entre a síntese PBMic (g/dia) e o consumo de NDT (kg/dia), a qual representa a eficiência de síntese de PBMic (g de PBMic / kg de NDT consumido) não difere em relação à categoria animal.

O valor médio obtido para a eficiência de síntese de PBMic foi de 115,58 g de PBMic / kg de NDT. A partir do intervalo de confiança ($\alpha = 95\%$) estabelecido para o parâmetro β_1 do modelo analisado ($115,58 \pm 6,26$), pode-se concluir que o mesmo não difere da eficiência proposta anteriormente. Portanto, recomenda-se usar o mesmo valor de 120g de PBMic / kg de NDT obtido na publicação anterior, como referência para condições tropicais.

Tabela 3 - Estatística descritiva para os valores referentes à eficiência de síntese de proteína bruta microbiana (g de PBMic / kg de NDT), obtidos em experimentos realizados no DZO / UFV

Variables	Catégorie	N	Média (μ)	Minímo	Maxímo	DP	EP	IC
CMS (kg/dia)	Leite	316	17,31	8,28	27,07	3,40	0,19	$\mu \pm 0,38$
	Corte	585	5,31	1,58	12,71	1,88	0,078	$\mu \pm 0,16$
	Todos	901	9,52	1,58	27,07	6,26	0,21	$\mu \pm 0,41$
CNDT (kg/dia)	Leite	412	11,56	5,50	16,84	2,19	0,11	$\mu \pm 0,21$
	Corte	585	3,45	9,02	0,905	1,43	0,059	$\mu \pm 0,12$
	Todos	997	6,80	0,905	16,84	4,38	0,14	$\mu \pm 0,27$
PBMic (g/dia)	Leite	412	1426,25	364,73	3007,94	468,34	23,07	$\mu \pm 45,36$
	Corte	585	394,99	51,13	1173,03	178,70	7,39	$\mu \pm 14,51$
	Todos	997	821,15	51,13	3007,94	606,11	19,20	$\mu \pm 37,67$
EFMic (g/kg NDT)	Leite	412	125,16	29,71	274,01	39,07	1,92	$\mu \pm 3,78$
	Corte	585	117,02	30,73	273,63	35,97	1,49	$\mu \pm 2,92$
	Todos	997	120,38	29,71	274,01	37,48	1,19	$\mu \pm 2,33$

Meta-análise

Variável Independente	F	Valor - P
Consumo de NDT	44,31	<0,0001
Categoria	9,97	0,0016
Consumo de NDT x Categoria	0,15	0,6949
Equação (PBmic g/dia = β_1 *CNDT kg/dia)		
Variável	β_1 (\pm EP)	Valor - P
CNDT	115,58 (\pm 3,1939)	<0,0001

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOUMANI, M.B.; VEDEAU, F.; JACQUOT, L. et al. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**. 39: 357–368, 1992.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL – AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK: CAB international. 159p. 1992.
- AUFRÈRE, J.; GRAVIOU, D.; DEMARQUILLY, C. Predicting in situ degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). **Animal Feed Science and Technology**. 33: 97–116, 1991.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. and STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. 88, Suppl. E: 9 – 21, 2005.
- BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; CASTRILLO, C.; GASA, J. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. **Journal of Agricultural Science**. 116: 309-317, 1991.

- BARBOSA, A. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C. VERAS, R. M. L. DETMANN, E. PAULINO, M. F. MARCONDES, M. I. SOUZA, M. A. Effect of urinary collection days, concentrate levels and protein sources on creatinine, urea and purine derivatives excretions and microbial protein synthesis in Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 35: 870-877, 2006.
- BARBOSA, A. M. **Fração endógena e recuperação de derivados de purinas obtidas por diferentes métodos em bovinos nelore**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 44 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- BECKERS, Y., and THÉWIS, A. Excretion of purine derivatives in urine of Belgian blue bulls following duodenal infusion from Torula yeast. **Proceedings of Society of Nutrition and Physiology**. 3: 235, 1994.
- BEEVER, D. E. and COTTRILL, B. R. Protein systems for feeding ruminant livestock: a European assessment. **Journal of Dairy Science**. 77: 2031–2043, 1994.
- BEEVER, D. E., HARRISON, D. G.; THOMPSON, D. J. A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. **British Journal of Nutrition**. 32: 99, 1974.
- BERGEN, W.G; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**. 58: 1465-1483, 1984
- BRODERICK, G. A. and COCHRAN, R. C. In vitro and In situ methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. In: THEODOROU, M. K. and FRANCE, J. **Feeding Systems and Feed Evaluation Models**. CAB International. p. 53-85, 2000.
- BRODERICK, G.A. Determination of protein degradation rates using a rumen in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. **British Journal of Nutrition**. 58: 463–476, 1987.
- BRODERICK, G.A. and MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**. 75: 2618 - 2632, 1992.
- CABRITA, A. R. J., FONSECA, A. J. M.; DEWHURST, R. J. et al. Nitrogen supplementation of corn silages. 2. Assessing rumen function using fatty acid profiles of bovine milk. **Journal of Dairy Science**. 86: 4020 – 4032, 2003.
- CALSAMIGLIA, S., STERN, M.D. and BACH, A. Enzymatic and microbial-cell preparation techniques for predicting rumen degradation and post-ruminal availability of protein. In: GIVENS, D.I., OWEN, E., AXFORD, R.F.E. and OMED H.M. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. CAB International. p. 259-279, 2000.
- CARRO, M. D.; MILLER, E. L. Comparison of microbial markers (15N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**. 75: 315–321, 2002.
- CARVALHO, A.U.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO da SILVA, J.F. et al. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 3. Eficiência microbiana e população de protozoários ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 26: 1007-1015, 1997.
- CECAVA, M. J., MERCHEN, N. R., GAY, L. C. ; BERGER, L. L. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**. 73: 2480-2488, 1990.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 75: 2304, 1992.
- CHAMBERLAIN, D.G., ROBERTSON, S., CHOUNG, J.-J. Sugars vs. starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives, in sheep. **Journal of Science and Food Agriculture**. 63: 189 -194, 1993.

- CHEN, X.B.; HOVELL,D.F.D.; ØRSKOV, F.R. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. **British Journal of Nutrition**. 63: 131-142, 1990.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details. (Occasional publication) INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute. 21p. 1992.
- CHEN,X.B.;ØRSKOV, E.R. Research on urinary excretion of purine derivatives on ruminants: past, present and future. International Feed Research Unit, United Kingdom. p. 1 – 34, 2003.
- CHIZZOTTI, M. L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 142p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- CHIZZOTTI, M. L.;VALADARES FILHO,S. C.;VALADARES, R. F. D., CHIZZOTTI F. H.M.; TEDESCHI,L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**. 113: 218-225, 2008.
- CZERKAWSKI, J. W. Methods for determining 2,6-diaminopirnelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. **Journal of Science and Food Agriculture**. 25: 45, 1974.
- DIAS, H.L.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Eficiência de síntese microbiana, pH e concentrações ruminais de amônia em novilhos F1 Limousin x Nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 29: 555-563, 2000.
- DEHORITY,B.A.;TIRABASSO,P.A.;GRIFO,A.P. Most provable number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. **Appl. Environ. Microbiol**. V.55,p.2789-2792,1989
- DEWHURST, R.J. and WEBSTER, A.J.F. A note on the effect of plane of nutrition on fractional outflow rates from the rumen and urinary allantoin excretion by wether sheep. **Animal Production**. 54: 445-448, 1992.
- DEWHURST, R. J., D. R. DAVIES, and R. J. MERRY. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**. 85: 1–21, 2000a.
- DEWHURST, R. J., J. K. S. TWEED, and G. B. WILLIAMS. Variation in the concentrations of odd-chain fatty acids in milk. Page 29 in Proc. 25th **Conference on Rumen Function**, Chicago, IL. 2000b.
- DIJKSTRA, J., FRANCE, J. and DAVIES, D.R. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. **Journal of Dairy Science**. 81:3370–3384, 1998.
- EVANS, E. An evaluation of the relationships between dietary parameters and rumen solid turnover rate. **Canadian Journal of Animal Science**. 61: 91-96, 1981.
- EVANS, E. Practicalities of Balancing Diets for Amino Acids In: **PROCEEDINGS TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE**. In: Proceedings: Ohio State University April 8 and 9, p. 133 - 140, 2003.
- FAICHNEY, G. J. Measurements in sheep of the quantity and composition of rumen digesta and the fractional outflow rates of digesta constituents. **Australian Journal of Agricultural Research**. 31: 1129-1137, 1980.
- FIRKINS, J. L. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Nutrition**. 126: 1347S–1354S, 1996.
- FIRKINS, J.L. Optimizing Rumen Fermentation In: **PROCEEDINGS TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE**. In: Proceedings: Ohio State University April 16 and 17, p. 39 - 53, 2002.

- FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; ST-PIERRE, N. R. et al. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**. 79 (E Suppl.): 218–238, 2001.
- FOX, D. G.; TYLUTKI, T.P.; VAN AMBURGH, M. E. et al. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion (AnSci Mimeo 213 Ed.). Anim. Science Department, Cornell University, Ithaca, NY. 2000.
- 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**. 109:7-12, 1987.
- GARRETT, J. E.. R. D. GOODRICH. AND J. C. MEISKE. Measurement of bacterial nitrogen using D-alanine. Page 23 in Protein Requirements for Cattle: Symposium. F. N. Owens, ed. Oklahoma State Univ. Stillwater. 1982.
- GIESECKE, D.; EHRENTREICH, L.; STANGASSINGER, M. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 77: 2376–2381, 1994.
- GONDA, H.L.; LINDBERG, J.E. Effect of diet on milk allantoin and its relationship with urinary allantoin in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 80: 364-373, 1997.
- GONZALEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A. et al. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**. 86: 1282-1291, 2003.
- GRISWOLD, K. E.; HOOVER, W. H.; MILLER, T. K. et al. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. **Journal of Animal Science**. 74: 483–491, 1996.
- HALL, M.B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**. 84: 2486–2493, 2001.
- HARRISON, D.G.; BEEVER, D.E.; THOMSON, D.J. et al. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. **Journal of Agricultural Science**. 85: 93-101, 1975.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de Química Fisiológica**. 5° ed. São Paulo: Atheneu. 1982. 736p.
- HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2° edition, 1997, 719 p.
- HOOVER, W.H.; MILLER-WEBSTER, T.K.; 1998. Role of sugars and starch in ruminal fermentation. In: **PROCEEDINGS TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE**. In: Proceedings: Ohio State University April 21 and 22, p. 1-16, 1998.
- HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**. 74: 3630-3644, 1991.
- HRISTOV, A. N.; ROPP, J. K.; GRANDEEN, K. L. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**. 83: 408–421, 2005.
- HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M.R. In Situ techniques for the estimation of protein degradability and post-ruminal availability. In: GIVENS, D. I., OWEN, E., AXFORD, R.F.E. and OMED H.M. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. CAB International. p. 233-257, 2000.
- INRA (1988) **Alimentation des bovins, ovins et caprins**. INRA Editions, Paris.
- IPHARRAGUERRE, I. R. ;CLARK, J. H. Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. II. Effects on Performance and Nitrogen Utilization for Milk Production. **Journal of Dairy Science**. 88: 2556–2570, 2005.
- KANEDA, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiology Review**. 55: 288–302, 1991.

- KENNEDY, P.M.;MILLIGAN, L.P. Effects of cold exposure on digestion, microbial synthesis and nitrogen transformations in sheep. **British Journal of Nutrition**. 39: 105-117, 1978.
- KOHN, R.A. and ALLEN, M.S. In vitro protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. **Animal Feed Science and Technology**. 52: 15–20, 1995.
- KOREN, A. Creatinine–urine. Medical encyclopedia. 2000. www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003610.htm. (18/11/2003).
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 140p.
- LEÃO, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; AZEVEDO, J.A.G. et al. Técnica de coleta de digesta omasal para estudos de digestão parcial em bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife, PE. **Anais...CD-ROM**. Nutrição de ruminantes.
- LICITRA, G.; LAURIA, F.; CARPINO, S. et al. Improvement of the Streptomyces griseus method for degradable protein in ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**. 72: 1–10, 1998.
- LICITRA, G.; VAN SOEST, P. J.; SCHADT, I. et al. Influence of the concentration of the protease from Streptomyces griseus relative to ruminal protein degradability. **Animal Feed Science and Technology**. 77: 99–113, 1999.
- LING, J. R.; BUTTERY, P. J. The simultaneous use of ribonucleic acid, 35S, 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. **British Journal of Nutrition**. 39: 165, 1978.
- MADSEN, J; HVELPLUND, T., WEISBJERG, M.R. et. al. The AAT/PBV protein evolution system for ruminants. A revision, Norwegian. **Journal Agricultural Science**. Suppl. 19, 1-37.
- MARTIN, C., WILLIAMST, A. G. and MICHALET-DOREAU, B. Isolation and Characteristics of the Protozoal and Bacterial Fractions from Bovine Ruminal Contents. **Journal of Animal Science**. 72: 2962-2968, 1994.
- McALLAN, A.B. ; SMITH, R.H. Degradation of nucleic acids in the rumen. **British Journal of Nutrition**. 29: 331 – 345, 1973.
- McDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**. 96: 251–252, 1981.
- MENG, Q.; KERLEY, M.S.; LUDDEN, P.A. and BELYEA, R.L. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. **Journal of Animal Science**. 77: 206-214, 1999.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M. AND FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. CAB International. 1993.
- MICHALET-DOREAU, B.; OULD-BAH, M.Y. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. **Animal Feed Science and Technology**. 40: 57 – 86, 1992.
- MURPHY, T.A., S.C. LOERCH and B.A. DEHORITY, .The influence of restricted feeding on site and extent of digestion and flow of nitrogenous compounds to the duodenum in steers. **Journal of Animal Science**. 72: 2487-2496, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Whashington, D.C. National Academic Press, 2001. 381 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.:National Academy, 2000. 242p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Ruminant Nitrogen Usage**. Whashington, D.C. National Academic Press, 1985. 148 p.

- OH, Y. G.; KIM, K. H.; KIM, J. H. et al. The effect of the form of nitrogen in the diet on ruminal fermentation and the yield of microbial protein in sheep consuming diets of grass silage supplemented with starch or sucrose. **Animal Feed Science and Technology**. 78: 227–237, 1999.
- 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 contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30: 1621-1629, 2001.
- ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M. et al. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**. 68: 243-250, 2001.
- ØRSKOV, E.R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**. 92: 499–503, 1979.
- ØRSKOV, E.R. **Protein nutrition of ruminants**. 2nd Ed., Academic Press, London, 175 p. 1992:
- OSUJI, P.O. NSAHLAI, I.V., KHALILI, H. Effect of fasting on the urinary excretion of nitrogen and purine derivatives by zebu (*Bos Indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. **Journal of Applied Animal Research**. 10: 39-47, 1996.
- OWENS, F.N. & GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. **The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition**. p. 145-171, 1993.
- PETIT, H.V.; RIOUX, R.; TREMBLAY, G.F. Evaluation of forages and concentrates by the “in situ” degradability technique. In : SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. Maringá, 17 – 21 de julho de 1995, p. 119 – 133.
- PEREIRA, V. S. A. **Influência do peso corporal e das características de carcaça sobre a excreção de creatinina e utilização de coleta spot de urina para estimar a excreção de derivados de purinas e de compostos nitrogenados em novilhas nelore** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 41p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- PIMPA, O.; LIANG, J.B.; JELAN, Z.A. et al. Urinary excretion of duodenal purine derivatives in Kedah-Kelantan cattle. **Animal Feed Science and Technology**. 92: 203-214, 2001.
- PINA, D. S., S. C. VALADARES FILHO, L. O. TEDESCHI, A. M. BARBOSA, AND R. F. D. VALADARES. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on digestive variables in beef heifers. **Journal of Animal Science**. 87: 1058-1067, 2009.
- QUINN, J.I. ; WATH, J.G. Van der ; MYBURGH, S. Studies on the alimentary tract of merino sheep in Shouth Africa: description of experimental technique. **Journal of Veterinary Science Animal Indian**, Ondersteport, v.11, n.2, p.341-360, 1938.
- RENNÓ, L.N.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de proteína na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: estimativa da produção de proteína microbiana por intermédio dos derivados de purinas na urina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria, 2003. CD-ROM. Nutrição de ruminantes.
- RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; LEÃO, M.I. et al. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 29: 1223-1234, 2000.
- REYNAL, S. M. and BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 88: 4045-4064, 2005.
- ROE, M.B.; CHASE, L.E. and SNIFFEN, C.J. Comparison of in vitro techniques to the in situ technique for estimation of ruminal degradation of protein. **Journal of Dairy Science**. 74: 1632–1640, 1991.

- RUSSELL, J. P., O'CONNOR, C.D., FOX, D. G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**. 70: 3562-3577, 1992.
- RUSSELL, J.P. Factors influencing competitions and compositions of rumen bacterial flora. Proc. Symp. **Herbivore Nutrition in Sub-Tropics and Tropics**. The Science Press, Graighall, South Africa. P 313. 1984.
- SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C.B. et al. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12 year literature review. **Journal of Dairy Science**. 81: 3182-3213, 1998.
- SCHWAB, C. G.; TYLUTKI, T. P.; ORDWAY, R. S. et al. Characterization of proteins in feeds. **Journal of Dairy Science**. 86 (E. Suppl.): 88–103, 2003.
- SEO, S.; TEDESCHI, L.O.; LANZAS, C. et al. Development and evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. **Animal Feed Science and Technology**. 128: 67 – 83, 2006.
- SIDDONS. R. C.. J. V. NOLAN, D. E. BEEVER, and J. C.MACRAE. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. **British Journal of Nutrition**. 54: 175, 1985.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. 70: 3562–3577, 1992.
- STERN, M.S.; CALSAMIGLIA, S.; ENDRES, M.I. Dinámica de metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rúmen. In **X CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA**. Madrid, 10 y 11 de Noviembre, 1994.
- STERN, M. D.; RODE, L. M; PRANGE, R. W. et al. Ruminal protein degradation of corn gluten meal in lactating dairy cattle fitted with duodenal T-type cannulae. **Journal of Animal Science**. 56: 194, 1986.
- ST-PIERRE, N.R. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. **Journal of Dairy Science**. 84:741-755, 2001.
- STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**. 69: 2941–2947, 1986.
- SUSMEL, P.; STEFANON, B.; PLAZZOTTA, E. et al. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**. 123: 257-265, 1994.
- SYLVESTER, J.T.; KARNATI, S. K. R.; YU, Z. et al. Evaluation of a real-time pcr assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. **Journal of Dairy Science**, 88: 2083 - 2095, 2005.
- SYNGE, R.L.M. Note on the occurrence of diaminopimelic acid in some intestinal micro-organisms from farm animal. **J. Gen. Microbiol.** 8, 407-409, 1953.
- TAMMINGA, S. VAN STRAALLEN, W.M.; SUBNEL, A.P.J. et al. The dutch protein evaluation system; the DVE/OEB-system. **Livestock Production Science**. v.40, p.139-155, 1994.
- TOMÁNKOVÁ, O. and KOPEČNY, J. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. **Animal Feed Science and Technology**. 3: 71–80, 1995.
- TOPPS, J.H., ELLIOT, R.C. Partition of nitrogen in the urine of African sheep given a variety of low-protein diets. **Animal Production**. 9: 219-227, 1965.
- USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. **Reproduction, Nutrition and Development**, 25: 1037- 1046, 1985.

- VAGNONI, D.B.; BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. et al. Excretion of purine derivatives by holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. **Journal of Dairy Science**.80: 1695-1702, 1997.
- VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, S. C.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**. 82: 2686-2696, 1999.
- VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 4. Concentrações de amônia ruminal e uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 26: 1270-1278, 1997.
- VALADARES FILHO, S.C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES**, 1995, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV/DZO, 1995. p.1259-1263.
- VALADARES FILHO, S.C.; BRODERICK, G.A.; VALADARES, R.F.D. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on nutrient utilization and milk production. **Journal of Dairy Science**. 83: 106-114, 2000.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.; Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**. 74: 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2. Ed. London. Constock Publishing Associates, USA, 1994. 476p.
- VANZANT, E. S.; COCHRAN R. C.; TITGEMEYER, E. C. Standardization of In Situ Techniques for Ruminant Feedstuff Evaluation. **Journal of Animal Science**. 76: 2717–2729, 1998.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**. 114: 243-248, 1990.
- VERBIC, J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. *Viehwirtschaftliche Fachtagung*, 24 - 25. April 2002.
- VLAEMINCK, B.; DUFOUR, C.; VAN VUUREN, A. M. Use of odd and branched-chain fatty acids in rumen contents and milk as a potential microbial marker. **Journal of Dairy Science**. 88: 1031–1042, 2005.
- WALLACE, R. J. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. **Journal of Nutrition**. 126: 1326S–1334S, 1996.

