

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTERNOS PARA
ESTIMATIVA DE FLUXO DE DIGESTA E DE PROTEÍNA
MICROBIANA NO DUODENO DE RUMINANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiano Miguel Stefanello

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTERNOS PARA
ESTIMATIVA DE FLUXO DE DIGESTA E DE PROTEÍNA
MICROBIANA NO DUODENO DE RUMINANTES**

Cristiano Miguel Stefanello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em
Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stefanello, Cristiano Miguel

Avaliação de marcadores internos para estimativa de fluxo de digesta e proteína microbiana no duodeno de ruminantes / Cristiano Miguel Stefanello.-2014.

103 f.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2014

1. Derivados de purinas 2. Fibra em detergente ácido
3. Lignina em detergente ácido 4. Purinas 5. Ruminantes
I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Cristiano Miguel Stefanello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: cmstefanello@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTERNOS PARA ESTIMATIVA DE
FLUXO DE DIGESTA E PROTEÍNA MICROBIANA NO DUODENO DE
RUMINANTES**

elaborada por
Cristiano Miguel Stefanello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM) (Presidente/Orientador)

Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (CAV/UDESC, Santa
Catarina)

Lisandre de Oliveira, Dr.^a (UNIJUÍ, Ijuí)

Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2014.

**Aos meus pais, Adelino (*in memoriam*) e Eracilda
pelo amor, pelo apoio incondicional e pelo incentivo a sempre buscar mais.**

**Aos meus irmãos,
Mara, Gelson, Felipe, meu cunhado Idemar e sobrinhas Débora e Eduarda, pelo
companheirismo, pela torcida e pelo apoio em todos os momentos.**

**À minha esposa Renata,
pelo amor, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.**

**À minha filhota Carolina, para a qual não tenho palavras para expressar o amor que
sinto.**

A vocês, dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por me propiciar a realização do Mestrado.

Ao Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC), por colaborar e ceder amostras para o estudo.

Ao Prof. Gilberto V. Kozloski, pela oportunidade, pelos ensinamentos com dedicação e honestidade e pelo exemplo de profissional que és.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos ao tomar todas as decisões ao longo de minha vida.

À Renata, “o amor da minha vida”, por estar sempre comigo me apoiando, me amando, me dando forças para a busca de meus objetivos.

A minha Carolina, “Caiol”, que encheu minha vida de alegrias, que me fez amadurecer e perceber o real sentido da vida.

Aos colegas e amigos de laboratório: Mariana, Roberta, Tiago, Suélen, Fernanda, Simone, Thais, Bruno, Marcelo, Gizele, Vitor, Gonzalo e demais estagiários pela ajuda, agradável convivência e amizade.

Em especial, ao meu amigo Vinicius Greff (*in memoriam*), pela sua amizade.

A todos os professores que sempre estiveram dispostos a colaborar para a realização deste estudo, principalmente ao Henrique e à Lisandre.

Aos meus amigos que me escutaram falando de análises e estatísticas nas horas de lazer.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTERNOS PARA ESTIMATIVA DE FLUXO DE DIGESTA E PROTEÍNA MICROBIANA NO DUODENO DE RUMINANTES

AUTOR: CRISTIANO MIGUEL STEFANELLO

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Local e Data da defesa: Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2014.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de marcadores internos para estimativa de fluxo de digesta duodenal e de síntese de proteína microbiana duodenal em bovinos e ovinos. Foram utilizados dados e amostras de oito ensaios de digestibilidade *in vivo* com ovinos (n=204) e dois com bovinos (n=31), canulados no duodeno, previamente conduzidos no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina. Para estimativa do fluxo de digesta duodenal, foram comparados os seguintes marcadores internos: fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA). Para estimar o fluxo de proteína microbiana ruminal no duodeno, foi comparado o uso de purinas na digesta duodenal com os derivados de purinas (DP) excretados na urina como marcadores. Neste último caso, foram testadas diferentes equações disponíveis na literatura para estimar o fluxo de proteína microbiana a partir dos DP urinários. Concluiu-se que a FDA pode ser utilizada como marcador interno para estimar o fluxo duodenal de digesta em ensaios com animais canulados no duodeno, onde é medida a excreção total de fezes, e que o uso dos DP como marcadores do fluxo duodenal de proteína microbiana é aceitável em bovinos, mas não em ovinos. Em ovinos, independentemente da equação utilizada, os DP subestimam a disponibilidade duodenal de proteína microbiana ruminal.

Palavras-chave: Bovinos. Derivados de Purinas. Fibra em detergente ácido. Lignina em detergente ácido. Ovinos. Purinas.

ABSTRACT

Master of Science Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science Federal
University of Santa Maria

EVALUATION OF INTERNAL MARKERS FOR ESTIMATING DIGESTA FLOW AND MICROBIAL PROTEIN IN THE DUODENUM OF RUMINANTS

AUTHOR: CRISTIANO MIGUEL STEFANELLO

ADVISER: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Defense's Place and date: Santa Maria, February, 26, 2014.

The aim of this study was to evaluate the use of internal markers to estimate duodenal flow of digesta and duodenal microbial protein synthesis in cattle and sheep. Data and samples of *in vivo* digestibility trials, eight trials with sheep (n=204) and two with cattle (n=31) were used. All animals were cannulated in the duodenum, procedure previously conducted at the Laboratory of Food Science and Ruminants Nutrition at the Federal University of Santa Maria and Laboratory of Animal Nutrition and Food Science at the University of the State of Santa Catarina. Internal markers, acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) were compared to estimate the flow of duodenal digesta. Purines in duodenal digesta were compared with purine derivatives (PD) excreted in urine as markers to estimate the flow of rumen microbial protein in the duodenum. In the latter case, different equations available in literature were tested to estimate the flow of microbial protein from urinary PD. It was concluded that ADF may be used as an internal marker to estimate duodenal flow of digesta in experimental animals cannulated in the duodenum where total fecal excretion is measured, and that the use of DP as a marker of duodenal flow of microbial protein is acceptable for cattle but not for sheep. In sheep, regardless of the equation used, the DP underestimated duodenal availability of rumen microbial protein.

Keywords. Cattle. Acid detergent fiber. Acid detergent lignin. Purine derivatives. Purines. Sheep.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I	17
Avaliação de marcadores internos para estimativa de fluxo de digesta duodenal e digestibilidade ruminal	
Figura 1 – Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimado através da fibra em detergente ácido (FDA), ou fibra em detergente ácido livre de cinzas (FDAC) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de ovinos (n=204, P<0.05).....	33
Figura 2 – Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimado através da fibra em detergente ácido (FDA), ou fibra em detergente ácido livre de cinzas (FDAC) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de bovinos (n=31, P<0.05).....	34
Figura 3 – Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimado através da fibra em detergente ácido (FDA), ou lignina em detergente ácido (LDA) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de ovinos (n=204, P<0.05).....	35
Figura 4– Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimado através da fibra em detergente ácido (FDA), ou lignina em detergente ácido (LDA) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de bovinos (n=31, p<0.05).....	35
Figura 5- Relação entre digestibilidade total (%) e digestibilidade ruminal (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a FDA como marcador interno na digesta de ovinos (n=204, P<0.05).....	37
Figura 6– Relação entre digestibilidade total (%) e digestibilidade ruminal (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a LDA como marcador interno na digesta de ovinos (n=204, P<0.05).....	37
Figura 7 – Relação entre digestibilidade total (%) e digestibilidade ruminal (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a FDA como marcador interno na digesta de bovinos (n=31, P<0.05).....	38
Figura 8 – Relação entre digestibilidade total (%) e digestibilidade ruminal (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a LDA como marcador interno na digesta de bovinos (n=31, P<0,05).....	38
Figura 9 – Médias dos coeficientes de variação da digestibilidade ruminal da MS, estimada através da fibra em detergente ácido (FDA) ou lignina em detergente ácido (LDA), como marcadores internos em ensaios com ovinos (8 ensaios) e bovinos (2 ensaios). Linhas acima das barras indicam o desvio padrão das médias (DP) (P<0.05, n=10).....	39

CAPITULO II.....	48
Comparação de métodos para estimar a síntese de proteína microbiana ruminal: Derivados de purinas urinários e Purinas no duodeno	
Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo das purinas pelos ruminantes. (adaptado de Chen e Gomes, 1992).....	58
Figura 2 – Formação dos derivados de purinas a partir da degradação dos nucleotídeos púricos. (adaptado de Chen e Gomes, 1992).....	58
Figura 3 – Relação entre purinas totais no duodeno (g/dia) e derivados de purinas totais na urina (g/dia) em bovinos (A) (n=31, p<0,05) e ovinos (B) (n=176, p<0,05).....	72
Figura 4 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Chen e Gomes (1992) em bovinos (n=31, P<0.05).....	73
Figura 5 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Moorby et al. (2006) em bovinos (n=31, P<0.05).....	74
Figura 6 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Ma et al. (2013a) em bovinos (n=31, P<0.05).	74
Figura 7 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Ma et al. (2013b) em bovinos (n=31, P<0.05).....	75
Figura 8 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Chen e Gomes (1992) em ovinos (n=176, P<0.05).....	76
Figura 9 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Puchala e Kulasek (1992) em ovinos (n=176, P<0.05).....	76
Figura 10 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Ma et al. (2013a) em ovinos (n=176, P<0.05).....	77
Figura 11 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimado segundo Ma et al. (2013b) em ovinos (n=176, P<0.05).....	77
Figura 12 – Relações entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimado pela excreção de derivados de purinas na urina. Comparação do Nm estimado segundo Chen e Gomes (1992) com outras equações para ovinos (n=176, P<0.05).....	78
Figura 13 – Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimado pelas purinas em bovinos (n=31, P<0.05).....	79

Figura 14 – Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimado pelos derivados de purinas urinários em bovinos (n=31, P<0.05).....	80
Figura 15 – Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimado pelas purinas em ovinos (n=176, P<0.05).....	81
Figura 16 – Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimado pelos derivados de purinas urinários em ovinos (n=176, P<0.05).....	82
Figura 17– Relação entre purinas totais no duodeno (g/dia) e derivados de purinas totais na urina (g/dia) em ovinos que receberam concentrado na dieta (ensaio 2 n=15, P<0,05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.....	85

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I	17
Avaliação de marcadores internos para estimativa de fluxo de digesta duodenal e digestibilidade ruminal	
Tabela 1 – Descrição de algumas variáveis (dieta, peso corporal, consumo de matéria seca (MS) e digestibilidade da MS) nos ensaios com ovinos e bovinos utilizados no estudo	29
CAPITULO II	48
Comparação de métodos para estimar a síntese de proteína microbiana ruminal: Derivados de purinas urinários e Purinas no duodeno	
Tabela 1 – Descrição de algumas variáveis (dieta, peso corporal, consumo de matéria seca (MS) e digestibilidade da MS) nos ensaios com ovinos e bovinos utilizados no estudo	64

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Entrada de dados para análise estatística do capítulo I.....	94
APÊNDICE B – Entrada de dados para análise estatística do capítulo 2 para bovinos.....	100
APÊNDICE C – Entrada de dados para análise estatística do capítulo 2 para ovinos.....	101

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO I.....	17
AVALIAÇÃO DE MARCADORES INTERNOS PARA ESTIMATIVA DE FLUXO DE DIGESTA DUODENAL E DIGESTIBILIDADE RUMINAL.....	18
RESUMO.....	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....	22
2.1 Fluxo de digesta em ruminantes	22
2.2 Uso de marcadores em estudos de nutrição de ruminantes	23
2.3 Marcadores internos para estimativa do fluxo de digesta	24
2.4 Desaparecimento ruminal e intestinal da FDA e LDA	25
3 HIPÓTESE.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Local e época	28
4.2 Ensaios	28
4.3 Coleta de amostras	30
4.4 Análises químicas	30
4.5 Cálculos.....	31
4.6 Análises estatísticas	32
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPITULO II.....	48
COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL: DERIVADOS DE PURINAS URINÁRIOS E PURINAS NO DUODENO.....	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....	53
2.1 Síntese de proteína microbiana ruminal	53

2.4 Marcadores microbianos	54
2.4.1 Bases de purinas.....	54
2.4.2 Derivados de purinas.....	56
3 HIPÓTESES	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Local e época	63
4.2 Ensaio	63
4.3 Coleta de amostras	65
4.4 Análises químicas	65
4.4.1 Análise de purinas.....	66
4.4.2 Análise de derivados de purinas.....	67
4.5 Cálculos	67
4.5.1 Digestibilidade e fluxo duodenal de MS.....	67
4.5.2 Fluxo duodenal de Nitrogênio microbiano estimado por purinas.....	67
4.5.3 Fluxo duodenal de proteína microbiana estimado por derivados de purinas.....	68
4.6 Análises estatísticas	70
5 RESULTADOS	72
.....	72
5.2 Relações entre o Nm ruminal estimado por diferentes métodos	73
5.2 Eficiência de síntese de proteína microbiana	79
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICES	93

INTRODUÇÃO

Com o intuito de melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes na alimentação ruminantes, têm sido desenvolvidos modelos/sistemas nutricionais que estimam a oferta de energia e proteína metabolizável aos animais. Esses modelos foram desenvolvidos com base em dados que incluíram medidas da disponibilidade intestinal de nutrientes. A confiabilidade desses sistemas em prever o suprimento de nutrientes que irão atender as demandas dos animais é dependente da capacidade de medir acuradamente o fluxo de nutrientes pelo trato digestivo. Desse modo, aumentar a precisão das medições de fluxo é fundamental para reduzir erros na predição e aumentar a confiabilidade dos modelos nutricionais.

Dentre as medidas de importância, incluem-se a estimativa do fluxo de digesta e de proteína microbiana ruminal no duodeno. O fluxo de digesta duodenal pode ser medido com uso de cânulas reentrantes. Contudo, em função da sua complexidade e necessidade de equipamento não convencional, usualmente, o fluxo de digesta duodenal é estimado com uso de marcadores externos ou internos. Marcadores externos (i.e. cromo, itérbium, titânio, alcanos, entre outros) apresentam algumas limitações associadas principalmente ao grau de mistura com a digesta, variabilidade no fluxo e excreção nas fezes, o que torna mais complexos os procedimentos de dosagem e coleta de amostras e de variabilidade no grau de recuperação do marcador nas fezes. Várias dessas deficiências seriam superadas com uso de marcadores internos, que são constituintes naturais do alimento, porém indigestíveis no trato gastrointestinal dos ruminantes. Marcadores internos utilizados com certa frequência incluem frações indigestíveis de MS ou fibra e lignina. A lignina, em detergente ácido (LDA), é utilizada como marcador de fluxo de digesta duodenal em animais com cânulas de duodeno e com coleta total de fezes por não sofrer digestão nos intestinos. Contudo, a análise de LDA envolve uso de ácido forte e sua concentração nas amostras de digesta é usualmente muito baixa, diminuindo a precisão das estimativas. De outra forma, a digestão da fibra em detergente ácido (FDA) nos intestinos também pode ser considerada insignificante apresentando-se como um marcador alternativo à LDA para estimar o fluxo de digesta no duodeno. A concentração de FDA na digesta duodenal é relativamente bem mais alta que LDA, apresentando menor variabilidade nos resultados e, também, sua análise utiliza procedimento mais simples, com menor tempo analítico que a LDA.

Por sua vez, o fluxo de proteína microbiana ruminal no duodeno, usualmente, era estimado por meio de marcadores externos (i.e. N_{15}) ou internos (i.e. ácido diaminopimélico (DAPA), purinas, entre outros) medidos na digesta duodenal. Todavia, esta técnica necessita de animais cirurgicamente implantados com cânula duodenal e depende de estimativas confiáveis do fluxo de digesta neste compartimento.

Como alternativa, a disponibilidade intestinal de proteína microbiana pode, também, ser estimada com base na excreção urinária dos derivados de purinas, cuja principal vantagem é não depender de animais canulados no duodeno. No entanto, na literatura, encontram-se muitas incoerências quanto aos resultados de síntese de proteína microbiana utilizando derivados de purinas como marcador, bem como diferentes equações para estimá-la.

O objetivo do presente estudo é avaliar o uso de marcadores internos para estimativas de fluxo de digesta duodenal e de síntese de proteína microbiana ruminal em bovinos e ovinos.

CAPÍTULO I

AValiação DE MARCADORES INTERNOS PARA ESTIMATIVA DE FLUXO DE DIGESTA DUODENAL E DIGESTIBILIDADE RUMINAL

RESUMO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial de uso de componentes da fibra, FDA em alternativa ao LDA, como marcadores internos na estimativa do fluxo duodenal em ovinos e bovinos. Também foi avaliada a digestibilidade ruminal quando empregado cada um dos marcadores. Foram utilizadas amostras e dados de dez ensaios de digestibilidade, todos com delineamento Quadrado Latino, realizados na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS e na Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, sendo oito ensaios com ovinos (n=204) e dois ensaios com bovinos (n=31). Todos os animais foram cirurgicamente implantados com cânula tipo “T” simples no duodeno. As dietas experimentais foram baseadas no uso de volumosos, com ou sem suplementação de concentrados. Em todos os ensaios, foi feita coleta total de fezes e foram obtidas amostras de digesta duodenal. Nas fezes e na digesta duodenal, foram analisadas as concentrações de FDA e LDA. O fluxo de digesta duodenal foi estimado com base na excreção fecal e nas concentrações fecal e duodenal de cada marcador. Observaram-se alta e significativa ($P<0,05$) relação entre o fluxo duodenal (g/dia) de MS, no duodeno estimado, com o uso de FDA ou LDA, tanto em ovinos ($R^2=0,78$) como em bovinos ($R^2=0,90$). No entanto, a análise de variância dos dados em cada ensaio resultou em coeficientes de variação que, em média, foram menores para FDA que para LDA (18,07 vs 28,11), indicando que a FDA podem substituir, com vantagens, as LDA como marcador interno para estimar a digestibilidade ruminal da MS.

Palavras-chave: Bovinos. Fibra em detergente ácido. Lignina em detergente ácido. Ovinos.

EVALUATION OF INTERNAL MARKERS FOR ESTIMATING DUODENAL DIGESTA FLOW AND RUMINAL DIGESTIBILITY

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the potential of using fiber components, ADF and ADL, as internal markers to estimate duodenal flow in sheep and cattle. Ruminal digestibility when each of the markers was employed was also evaluated. Samples and data from ten digestibility trials, all with Latin Square design, previously carried out at the Federal University of Santa Maria in Santa Maria, RS Brazil, and at the University of the State of Santa Catarina in Lages, SC Brazil were used. Data and samples were extracted from eight trials with sheep (n=204) and two trials with cattle (n=31). All animals were surgically implanted with a simple type "T" cannula in the duodenum. Experimental diets were based on the use of a basal diet with or without concentrate supplementation. Total feces were collected and duodenal digesta samples were obtained in all assays. Duodenal digesta concentrations of ADF and ADL were analyzed in feces. The flow of duodenal digesta was estimated based on fecal excretion and the fecal and duodenal concentrations of each marker. A highly significant ($P < 0.05$) relationship between the duodenal flow (g/day) of DM in the duodenum estimated using either the duodenum ADF or ADL is present both in sheep ($R^2=0.78$) and in cattle ($R^2=0.90$). However, analysis of variance at each trial resulted on average in lower coefficients of variation for ADF than for ADL (18.07 vs 28.11), indicating that the ADF may replace LDA with advantage as an internal marker to estimate ruminal digestibility.

Keywords: Acid detergent fiber. Acid detergent lignin. Cattle. Sheep.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área de nutrição de ruminantes vêm, há muitos anos, buscando alternativas para avaliar o valor nutricional dos alimentos. Conhecer o fluxo de nutrientes que chegará aos intestinos e estará disponível para a absorção, também, é peça fundamental para alimentar os modelos que foram desenvolvidos a fim de se estimar as exigências e o desempenho animal.

Usualmente, o fluxo de digesta duodenal é estimado pelo uso de marcadores externos ou internos. O uso de marcadores externos é frequentemente sujeito à alta variabilidade associada a fatores que incluem grau de mistura do marcador com a digesta, procedimentos de dosagem, coleta de amostras, exatidão e precisão analítica, grau de recuperação, entre outros (OWENS e HANSON, 1992). Várias dessas deficiências podem ser superadas com uso de marcadores internos, que são constituintes naturais do alimento, mas indigestíveis no segmento gastrointestinal em estudo (VAN SOEST, 1994).

Em estudos de digestibilidade que utilizam animais canulados no duodeno, mantidos em gaiolas de metabolismo e onde a excreção fecal total é mensurada, o fluxo duodenal de digesta pode ser estimado com um marcador interno que seja indigestível nos intestinos, independentemente do seu grau de desaparecimento no rúmen. Nesta perspectiva, PORTER & SINGLETON (1971a) observaram que não houve digestão intestinal da lignina em detergente ácido (LDA) no intestino de ovinos utilizando cânulas reentrantes. A LDA apresenta a vantagem de ser obtida por um método rotineiro em laboratórios de análise de alimentos, entretanto, problemas relacionados ao método analítico e a repetibilidade dos resultados têm sido um obstáculo na utilização desta fração como marcador (BERCHIELLI et al., 2005b).

Como alternativa à LDA, outra fração da fibra que tem potencial de uso como marcador do fluxo duodenal de digesta é a fibra em detergente ácido (FDA). Porter e Singleton (1971b) relatam que de 95 a 100% da celulose desapareceu no rúmen de ovinos. Beever et al. (1972) também observaram, em um estudo com ovinos implantados com cânula reentrante, que apenas 5% da celulose digestível desapareceu pós-ruminalmente. Da mesma forma, utilizando a técnica dos saquinhos móveis, Mesquita (2012) observou que o desaparecimento intestinal de LDA e FDA de resíduos de forragem e concentrados incubados no rúmen foi mínima (i.e. em torno de 10%) e semelhante. Estes resultados indicam o

potencial de uso de FDA como alternativa à LDA como marcador do fluxo de digesta no duodeno em experimentos onde é feita a coleta total das fezes. Em função de sua maior concentração nas amostras, a análise de FDA usualmente tem maior precisão, resultando em menor variabilidade nas estimativas de fluxo de digesta se comparada à LDA. Contudo, o uso de FDA como marcador para estimar o fluxo duodenal de digesta ainda necessita ser consistentemente avaliado. O objetivo do presente estudo foi avaliar a FDA como alternativa à LDA como marcador interno para estimativas de fluxo de digesta duodenal e digestibilidade ruminal em ovinos e bovinos.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Fluxo de digesta em ruminantes

A expressão quantitativa dos processos de digestão e passagem é necessária para estimar precisamente a quantidade e a composição dos nutrientes digeridos e seu aproveitamento pelo animal. A saída ruminal ou fluxo de resíduos não digeridos e indigestíveis através do trato digestório denomina-se *taxa de passagem*, evento este que atua de forma simultânea e competitiva com a digestão. O fluxo ruminal inclui, além da fibra indigestível, bactérias e outras frações não degradadas do alimento, sendo a composição e o volume da dieta variáveis externas que influenciam a digestão, a taxa de digestão e a reciclagem do conteúdo ruminal (ELLIS et al., 1994).

A taxa de passagem dos alimentos é um dos mais importantes parâmetros que influenciam o desaparecimento ruminal da digesta e a ingestão e é influenciada pelos níveis de consumo e pela forma física da dieta (MERTENS e ELY, 1982). Outros fatores determinantes da taxa de passagem são o tamanho e a gravidade específica das partículas (ELLIS et al., 1994), pois definem o tempo em que as partículas do alimento permanecem no rúmen-retículo, bem como a distribuição pelas diferentes regiões destes compartimentos.

O ruminante desenvolveu um complexo e eficiente mecanismo digestivo para degradação e absorção dos nutrientes da parede celular das plantas (MERTENS, 2002). Os aspectos principais da digestão em ruminantes incluem o fluxo e concentração da ingesta no trato digestório. Esse processo envolve a taxa de passagem de material indigestível e *turnover*¹ que, por sua vez, envolve a taxa de digestão e captação líquida de nutrientes (digestibilidade) (VAN SOEST, 1994).

A digesta no trato gastrointestinal é constituída de partículas e água, em que é dissolvida uma série de solutos orgânicos e inorgânicos da dieta ou mesmo do material de origem endógena. A proporção relativa desses componentes na digesta é variável de acordo com a secção do trato (FAICHNEY, 1975). A digesta apresenta uma fase líquida (líquido e pequenas partículas) e outra sólida (médias e grandes partículas). Outros importantes

¹ *Turnover* é o efeito de mistura que ocorre quando há fluxo de entrada em um compartimento que tem uma ou mais saídas para balancear a entrada (VAN SOEST, 1994).

constituintes da digesta que fluem a partir do rúmen são os microrganismos ruminais, em sua maioria, bactérias, que são responsáveis por grande parte do aporte de proteína que será disponibilizado ao animal (VAN SOEST, 1994).

O fluxo de digesta pode ser considerado, em termos de velocidade, taxa de fluxo ou taxa de passagem (WARNER, 1981). Velocidade, que tem unidade de distância por unidade de tempo, é aplicada somente para segmentos tubulares do trato gastrointestinal (TGI), onde fornecem um índice de motilidade intestinal. Taxa de fluxo refere-se ao volume ou massa de digesta que passa um ponto do TGI por unidade de tempo e é medida em associação com outras análises. Permite fazer estimativas da partição da digestão, ou seja, a extensão da digestão, absorção e/ou excreção ocorrendo em segmentos definidos do trato digestório. Por outro lado, a taxa de passagem mede o tempo em que uma porção da digesta é exposta ao processo de mistura digestão e absorção no TGI, ou em um segmento específico deste (FAICHNEY, 2005).

No trato digestório como um todo, é possível estimar a digestibilidade ou fluxo por meio da recuperação fecal de um marcador, no entanto, quando se deseja saber o fluxo em um determinado segmento do trato digestivo, isso requer o uso de animais com algum grau de preparação cirúrgica (GROVUM, 1986). A produção fecal pode ser determinada a partir de coleta total ou da recuperação do marcador fecal. As medidas de fluxo de digesta duodenal requerem cânula reentrante, dificultando os trabalhos. No entanto, estimativas de fluxo de digesta têm sido obtidas com a coleta de amostras de digesta via cânulas duodenais do tipo T e uso de marcadores.

2.2 Uso de marcadores em estudos de nutrição de ruminantes

Marcadores são substâncias indigestíveis, normalmente de fácil determinação, que podem ser fornecidos junto com o alimento ou determinados em algum segmento do sistema digestório e, posteriormente, identificados e quantificados nas fezes ou ao final do segmento em estudo (WARNER, 1981). A utilização de marcadores é de grande relevância em estudos de nutrição animal por possibilitar a estimativa de parâmetros como produção fecal, coeficiente de digestibilidade, consumo de alimentos e fluxo de nutrientes pelo trato gastrintestinal dos animais e que, em determinadas situações, não podem ser obtidos facilmente pela impossibilidade de manipulação constante dos animais.

Owens e Hanson, (1992) e Faichney, (1975) sugerem que um marcador ideal tenha as seguintes características: 1) não deve ser absorvido; 2) não deve afetar ou ser afetado pelo trato gastrointestinal ou pela população microbiana; 3) deve fluir paralelamente, ser fisicamente semelhante ou intimamente associado com o material a ser marcado e; 4) deve ter um método específico e sensível de estimativa.

Uma vez que a digesta pode ser dividida em duas fases, é recomendável que seja utilizado um marcador para cada fase, pois as fases não possuem a mesma proporção na digesta duodenal (WALLER et al., 1980). Fluidos passam pelo rúmen mais rapidamente que partículas pequenas e pequenas partículas densas passam pelo rúmen mais rapidamente que partículas grandes. Nenhum marcador único preenche todos estes critérios (MERCHANT, 1993), mas o grau tolerável de erro difere com a variável que está sendo medida (OWENS e HANSON, 1992).

Os indicadores podem ser classificados como internos representados por substâncias indigestíveis presentes naturalmente em algum componente da dieta, ou externos, quando adicionados à dieta ou fornecidos via oral ou ruminal aos animais.

Marcadores externos são extensamente utilizados em nutrição de ruminantes, seja na medida de fluxo, excreção fecal ou nas estimativas de digestibilidade de dietas. Dentre eles, podemos citar os compostos de metais trivalentes, tais como, Cromo, Titânio e Cobalto (MARAIS, 2000).

2.3 Marcadores internos para estimativa do fluxo de digesta

Os marcadores internos são compostos indigestíveis dos alimentos, representados geralmente por uma fração da parede celular e não requerem preparação especial (BERCHIELLI et al., 1998; SALIBA, 1998). Estes apresentam vantagem por já estarem presentes no alimento e, de modo geral, permanecerem distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção (BERCHIELLI et al., 2005a).

Marcadores internos são comumente empregados nos estudos de digestão por apresentarem uma série de vantagens frente aos marcadores externos. Ambos marcadores são utilizados, principalmente, em experimentos com animais em pastejo para medida excreção fecal, onde é dificultada a dosagem individual dos animais. Entretanto, o seu uso ainda tem restrições em função de erros provocados pela modificação do marcador no alimento e nas

fezes, ou seja, o marcador pode ser quimicamente modificado pela ação da digestão (MARAIS, 2000).

Propostos inicialmente por Lippke et al. (1986), os componentes indigestíveis da parede celular, como a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) têm sido usados (ÍTAVO et al., 2002; ZEOULA et al., 2002), podendo ser obtidos pela incubação ruminal em sacos de náilon ou incubação *in vitro* em líquido ruminal (FREITAS et al., 2002). Segundo Cochran et al. (1986), a FDNi e a FDAi são indicadores com potencial de utilização para estimativa da digestibilidade. Entretanto, problemas com relação a variações nos resultados, possivelmente em função do método de análise destes marcadores, são relatados (DETMANN et al., 2001). As frações indigestíveis da fibra apresentam ainda problemas relacionados à recuperação fecal, que dificultam a adoção de metodologias baseadas nessas frações (KOZLOSKI et al., 2009).

2.4 Desaparecimento ruminal e intestinal da FDA e LDA

O efeito do aumento do tempo de incubação ruminal leva a um aumento da degradação ruminal das frações fibrosas. Segundo Weiss (1994), a digestibilidade da fibra depende, dentre outros fatores, do tempo de fermentação ruminal.

Embora em alguns trabalhos se relate que não ocorre degradação da lignina no rúmen (CRAMPTON e MAYNARD, 1938; ELLIS et al., 1946; FORBES et al., 1946), existem estudos que contrapõem este fato. Hale et al. (1940) observaram digestibilidade ruminal da lignina dietética variando de 5,1% a 23,7%. Mesquita (2012) observou degradabilidade ruminal média de 21% da lignina dietética. Entretanto, nos intestinos a lignina é indigestível (PORTER e SINGLETON, 1971a).

Segundo Porter e Singleton (1971b), uma fração muito pequena da celulose digestível chega ao intestino, cerca de 95 à 100% da celulose digestível é degradada no rúmen de ovinos. Beever et al. (1972), ao realizarem um estudo com ovinos implantados com cânula reentrante, encontraram apenas 5% de desaparecimento pós-ruminal da celulose. Segundo MacRae e Armstrong (1969), 91% da celulose digestível é fermentada no rúmen de ovinos alimentados exclusivamente com feno. Em bovinos a proporção é a mesma (WALDO, 1970).

Mesquita (2012), utilizando a técnica dos saquinhos móveis, incubou diferentes dietas em saquinhos de poliéster, pós-digestão ruminal, na porção inicial do duodeno de bovinos e

observou que tanto a LDA, quanto a FDA praticamente não se degradaram nos intestinos. Porém, este autor observou um desaparecimento intestinal de LDA similar à porção que desapareceu da FDA (em torno de 10%). Isto indica que a perda de FDA levou a perda de LDA uma vez que essas frações são estritamente ligadas e sua hipótese mais coerente para este fato é que esse desaparecimento tenha ocorrido em função de perda de partículas através dos poros dos saquinhos de poliéster.

3 HIPÓTESE

A fibra em detergente ácido dos alimentos que escapa da fermentação ruminal pode ser utilizada como marcador para estimativas do fluxo de digesta duodenal e digestibilidade ruminal em bovinos e ovinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

As análises laboratoriais e de dados foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, vinculado ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, no período de março de 2012 a novembro de 2013.

4.2 Ensaio

Foram utilizadas amostras de digesta duodenal e fezes, bem como dados de consumo e excreção fecal de dez (10) ensaios de digestibilidade *in vivo* previamente conduzidos no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina. O banco de dados e amostras foi constituído por oito (8) ensaios com ovinos (n=204) e dois (2) ensaios com bovinos (n=31), sendo utilizado para a realização de todos os ensaios o delineamento experimental Quadrado Latino. Todos os animais foram cirurgicamente preparados para a implantação de cânula do tipo “T” no duodeno proximal para possibilitar as coletas de digesta duodenal. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas e alimentados com dietas experimentais baseadas no uso de volumosos, com ou sem suplementação de concentrados. As descrições gerais das dietas e variáveis relevantes são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição de algumas variáveis (dieta, peso corporal, consumo de matéria seca (MS) e digestibilidade da MS) nos ensaios com ovinos e bovinos utilizados no estudo.

Ensaio	N	Dieta	Espécie	Peso Corporal (kg)	Consumo MS (g/dia)	Digestibilidade MS (%)
1	16	<i>Cynodon dactylon</i> fresco	Ovinos	23-31	294-784	47-74
2	15	<i>Sorghum sudanense</i> congelado + farelo de canola e milho moído	Ovinos	28-34	330-963	50-86
3	14	<i>Lolium multiflorum</i> Lam fresco + extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> (infusão intrarruminal)	Ovinos	28-33	245-879	62-81
4	24	<i>Lolium multiflorum</i> Lam fresco	Ovinos	18-28	221-926	63-91
5	28	Silagem de <i>Lolium multiflorum</i> Lam + silagem de milho	Ovinos	22-38	390-1414	63-75
6	66	<i>Lolium multiflorum</i> Lam fresco ou feno de <i>cynodon sp.</i> + níveis de glicerina bruta (infusão intrarruminal)	Ovinos	15-36	105-711	43-80
7	25	<i>Pennisetum purpureum</i> + feno de <i>Arachis pintoii</i>	Ovinos	31-44	575-1258	58-69
8	16	<i>Pennisetum purpureum</i> + feno de <i>Arachis pintoii</i>	Ovinos	35-46	915-1542	47-63
9	15	<i>Avena strigosa</i> fresca + farelo de soja, farelo de arroz, grão de milho moído e níveis de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i>	Bovinos	110-205	2176-4144	73-83
10	16	Silagem de milho + farelo de soja ou farelo de canola + farelo de trigo grão de milho moído e níveis de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i>	Bovinos	190-395	4926-9868	67-75

4.3 Coleta de amostras

Os períodos experimentais dos ensaios variaram entre 15 a 21 dias de adaptação e 5 a 7 dias para coleta de dados e amostras. As amostras de alimento, sobras e fezes foram pesadas e amostradas diariamente durante o período de coletas. Foram coletadas amostras de digesta duodenal (aproximadamente 100 mL) a cada 2 ou 3 horas por um período de 24 horas.

As amostras de alimento, sobras, fezes e digesta duodenal foram previamente secas em estufa com circulação forçada de ar a 55° C durante, no mínimo, 72 horas, moídas a 1 mm e armazenadas para posterior análise.

4.4 Análises químicas

Nas amostras de alimentos e sobras, foram analisados os teores de matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO). Nas amostras de fezes e digesta duodenal foram analisados os teores de MS, MO, fibra em detergente neutro (FDN), FDA e LDA. A FDA, FDAc (livre de cinzas) e a LDA foram utilizadas como marcadores para estimativa de fluxo de digesta no duodeno.

O teor de MS foi determinado por secagem em estufa a 105°C durante, pelo menos, 16 horas. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa.

Para a análise dos marcadores, foram pesadas, separadamente, 0,5 g de amostras de fezes e digesta duodenal em saquinhos de poliéster (KOMAREK, 1993) com porosidade de 16 µm e dimensões de 4 × 5 cm. As amostras de fezes e digesta duodenal do mesmo animal foram analisadas sempre juntas (passaram pelos mesmos processos analíticos) e de forma sequencial, conforme Robertson e Van Soest (1981). Primeiramente, as amostras passaram por um processo de digestão com detergente neutro para remoção das frações solúveis após, os saquinhos contendo o resíduo foram lavados em água corrente, secos em estufa a 105°C por 24 horas e pesados. Os mesmos saquinhos, após o tratamento com detergente neutro, foram submetidos à digestão em solução detergente ácido. Após a digestão ácida, os saquinhos foram novamente lavados em água corrente, secos em estufa a 105°C por 24 horas, pesados e posteriormente submetidos à análise de lignina utilizando H₂SO₄ 12M. Os

saquinhos contendo a FDA permaneceram 3 horas em contato com o ácido e, posteriormente, foram secos em estufa a 105°C por 24 horas e pesados. Os resíduos, após a determinação sequencial dos teores de FDN, FDA e LDA, foram submetidos à combustão em mufla a 600°C por 3 horas para quantificar os teores de matéria mineral nos resíduos.

A análise de FDN foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) sem uso de α -amilase termoestável e sulfito de sódio e a análise de FDA foi feita, de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), à exceção do fato de as amostras terem sido pesadas dentro de sacos de poliéster (4 × 5 cm; porosidade de 16 μ m) e tratadas com detergente neutro ou ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). Para análise de LDA, os saquinhos contendo o resíduo em detergente ácido foram digeridos com ácido sulfúrico 12 M durante 3 horas (Método 973.18 da AOAC, 1997).

4.5 Cálculos

4.5.1 Fluxo duodenal de MS

O fluxo duodenal de MS (g/dia) foi estimado com base na excreção fecal e na concentração do marcador (FDA, FDAc ou LDA) nas fezes e na digesta duodenal, conforme a equação:

$$\text{Fluxo Duodenal MS (g/dia)} = \frac{\text{MS fecal (g/dia)} \times \text{Marcador nas fezes (g/kg MS)}}{\text{Marcador na digesta duodenal (g/kg MS)}}$$

4.5.2 Digestibilidade ruminal da MS (DRMS)

$$\text{DRMS (\%)} = \frac{\text{Consumo MS (g/dia)} - \text{MS duodenal (g/dia)}}{\text{Consumo MS (g/dia)}} \times 100$$

4.6 Análises estatísticas

Os marcadores foram comparados entre si por meio de regressão linear, utilizando um modelo misto que incluiu o efeito fixo de ensaio. O modelo de análise de variância foi:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + bC_{ij} + biC_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Y = variável dependente (fluxo estimado utilizando FDA)

μ = média geral

E_i = efeito fixo de ensaio

bC_{ij} = coeficiente de regressão linear geral entre os valores de fluxo duodenal estimados utilizando FDA contra os estimados através da LDA

biC_{ij} = coeficiente de regressão linear dentro de cada ensaio

ε_{ij} = erro residual

Em cada comparação foi gerado um coeficiente de determinação (R^2) que indicou o grau de precisão da relação entre as duas medidas. Foi testado se o intercepto era diferente de zero e se o coeficiente de regressão era diferente de 1 utilizando o teste “t”. Adicionalmente, a digestibilidade ruminal estimada com FDA ou LDA, em cada ensaio, foi analisada com um modelo misto que incluiu efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios de animal e período. Essa análise gerou um coeficiente de variação (CV) para cada marcador em cada ensaio. Os coeficientes de variação foram, dessa forma, comparados pelo teste F. Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico SAS, (2007).

5 RESULTADOS

Nas figuras 1 e 2, estão representadas as relações entre o fluxo duodenal de MS (g/dia) estimado através da fibra em detergente ácido (FDA) e a fibra em detergente ácido livre de cinzas (FDAc) em ovinos e bovinos, respectivamente. Foi observada alta e significativa ($P < 0.05$) relação entre os dois marcadores para ambas as espécies. Os coeficientes de determinação foram elevados, de 0,96 e 0,98 para ovinos e bovinos, respectivamente. Ambos os coeficientes de regressão foram iguais a 1 e interceptos iguais a zero ($P > 0,05$).

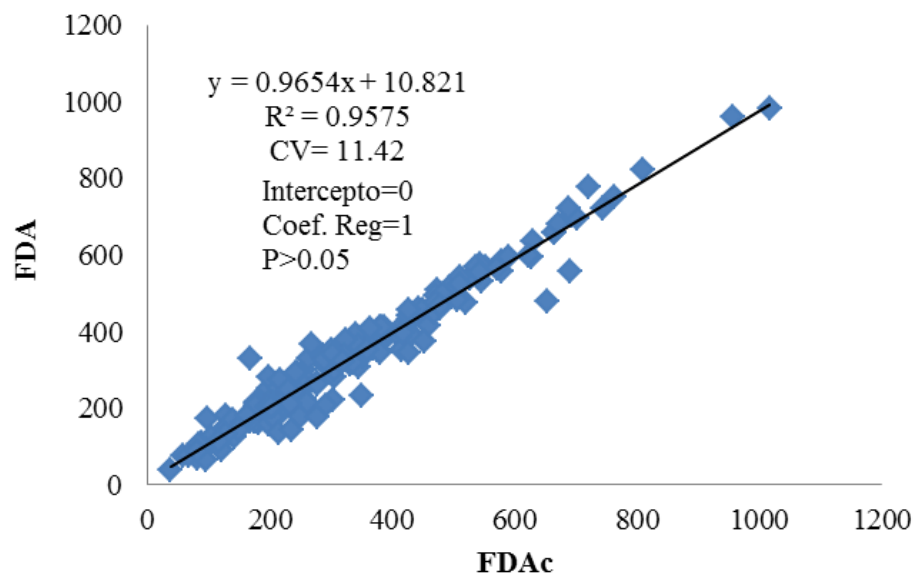


Figura 1– Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimada através da fibra em detergente ácido (FDA), ou fibra em detergente ácido livre de cinzas (FDAc) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de ovinos (n=204, $P < 0.05$).

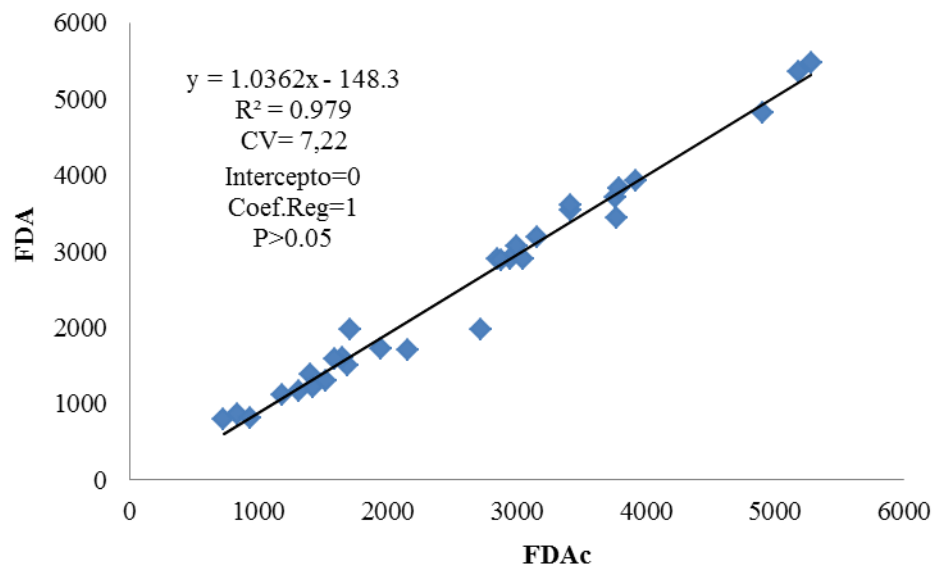


Figura 2– Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimada através da fibra em detergente ácido (FDA), ou fibra em detergente ácido livre de cinzas (FDAc) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de bovinos (n=31, $P < 0.05$).

A partir desses resultados, optou-se pelo uso da FDA com cinzas como alternativa à LDA, pois a FDA (com cinzas) não apresentou diferença estatística da FDAc. O processo de combustão da FDA para descontar o teor de cinzas da amostra aumenta o custo e o tempo de análise. Além disso, as cinzas presentes na FDA, normalmente, apresentam-se em baixas concentrações. Isto pode acarretar em erros na pesagem e, como consequência, a superestimação ou subestimação da FDA.

Nas figuras 3 e 4, foram observados com altas e significantes ($P < 0.05$) relações entre os fluxos duodenais de MS (g/dia) quando estimados através da FDA e comparados com a LDA como marcadores internos em ovinos (Figura 3) ou bovinos (Figura 4). O coeficiente de determinação (R^2) foi maior para bovinos (0,90) que para os ovinos (0,78). Embora os coeficientes de determinação elevados, somente para os bovinos o coeficiente de regressão foi igual a 1 e o intercepto igual a zero ($P > 0,05$).

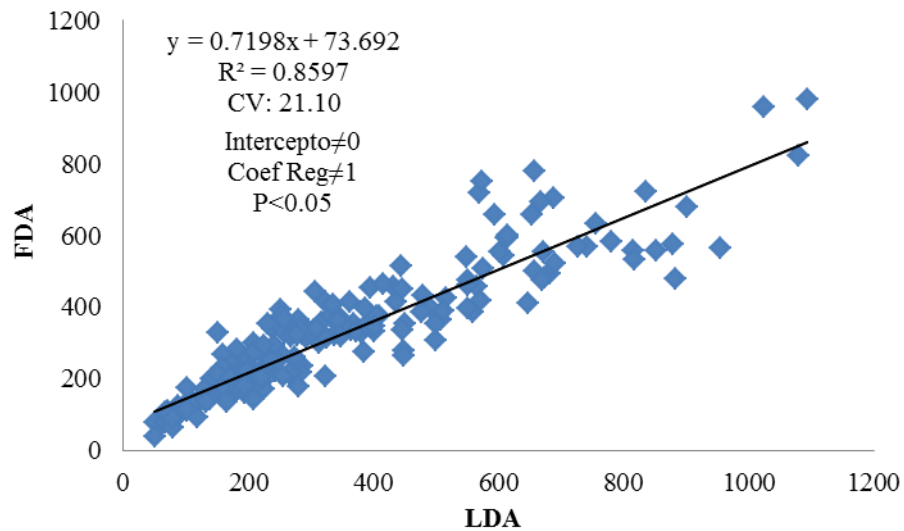


Figura 3– Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimada através da fibra em detergente ácido (FDA), ou lignina em detergente ácido (LDA) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de ovinos (n=204, P<0.05).

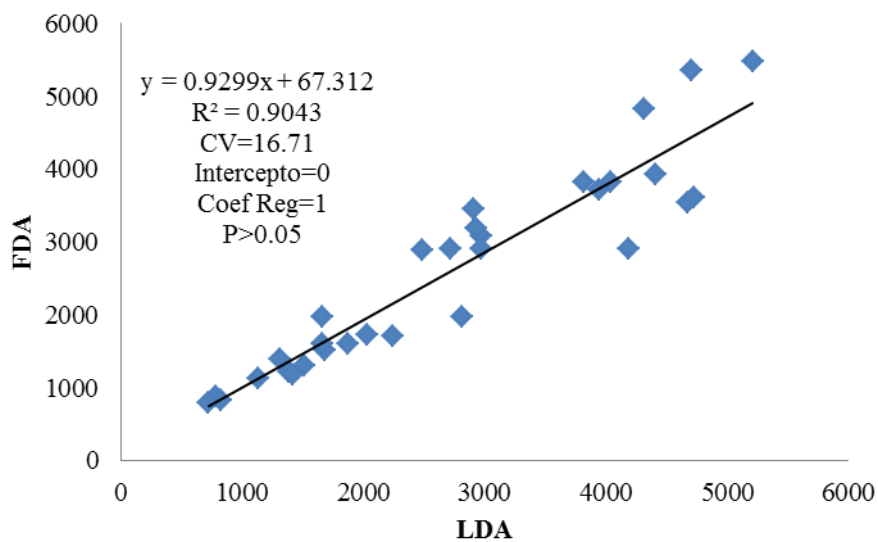


Figura 4– Relação entre fluxo duodenal de MS (g/dia) estimada através da fibra em detergente ácido (FDA), ou lignina em detergente ácido (LDA) como marcadores internos medidos na digesta duodenal e fezes de bovinos (n=31, P<0.05).

As relações entre digestibilidade total (%) dos alimentos e a digestibilidade ruminal (%), utilizando a FDA ou LDA como indicador de fluxo de digesta duodenal, estão apresentadas nas figuras 5, 6, 7 e 8. Nessas figuras, são apresentadas duas equações e duas linhas. Uma das equações (linha cheia) expressa o grau de precisão das estimativas, enquanto a outra (linha tracejada) foi forçada à origem e expressa o grau de desvio médio das estimativas. Com base na equação em que o intercepto é forçado à origem, observa-se a digestibilidade ruminal (%) em relação à digestibilidade total.

A digestibilidade ruminal em relação à digestibilidade total em ovinos, utilizando FDA como marcador (Figura 5), foi em média 78,8% com coeficiente de determinação de 0,69. Quando utilizado a LDA (Figura 6), foi em média de 75,1% da digestibilidade total, com R^2 de 0,73. O coeficiente de variação foi menor para o FDA (31,3%) que para o LDA (34,7%).

Na figura 7, é apresentada a digestibilidade ruminal nos bovinos, representando em média de 69.3% da digestibilidade total, com R^2 de 0.64 com a FDA como marcador. Ao utilizar a LDA como marcador nos bovinos (Figura 8), a digestibilidade ruminal representou uma média de 66.3% da digestibilidade total, mas com baixo coeficiente de determinação ($R^2=0.27$). O coeficiente de variação, como ocorreu para a espécie ovina, para a FDA (12,6%), foi inferior à de LDA (22.2%) na espécie bovina.

Na figura 9, estão apresentadas as médias dos coeficientes de variação da digestibilidade ruminal da MS estimadas através de ambos marcadores para todos os ensaios (8 de ovinos e 2 de bovinos). O coeficiente de variação médio foi menor para a FDA (CV= 18,07, DP= 5,2) em comparação à LDA (CV=28,11, DP=13,74). No entanto, a análise da variância no âmbito dos ensaios indicaram que a FDA é mais precisa que LDA para estimar digestibilidade ruminal.

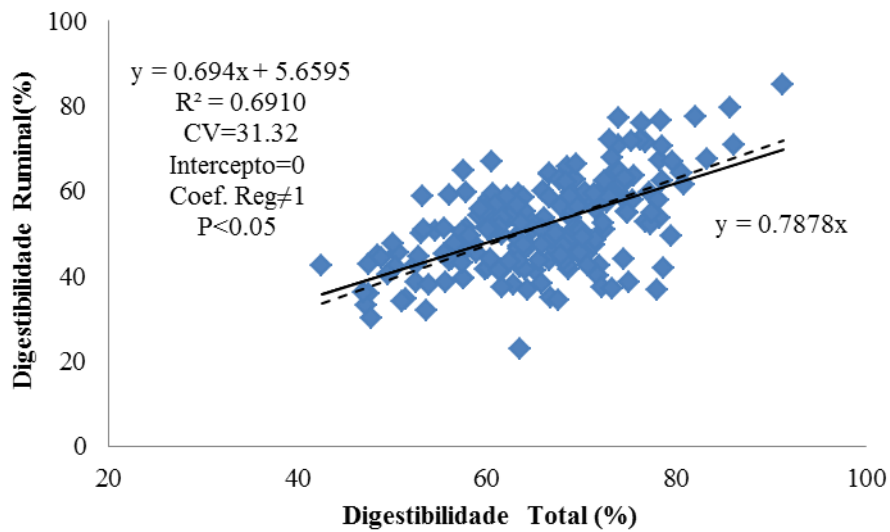


Figura 5 – Relação entre digestibilidade total da MS (%) e digestibilidade ruminal da MS (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a FDA como marcador interno na digesta de ovinos (n=204, P<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

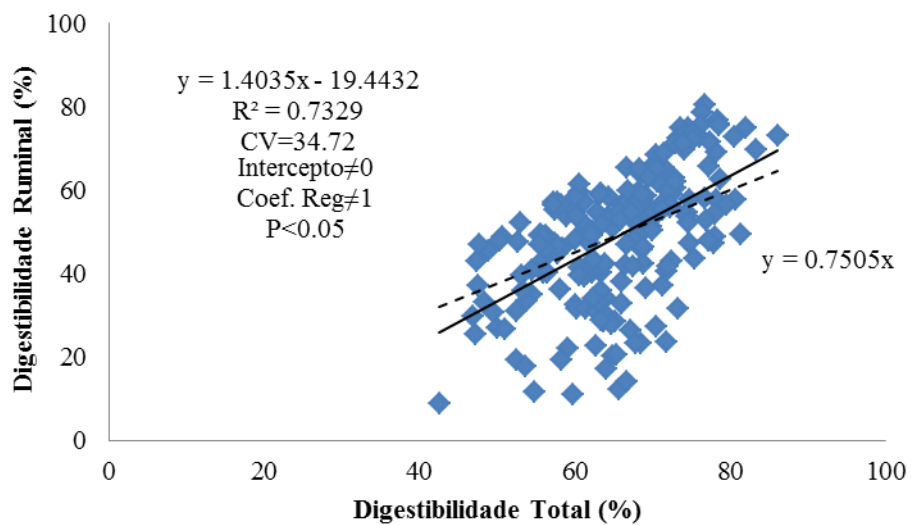


Figura 6 – Relação entre digestibilidade total da MS (%) e digestibilidade ruminal da MS (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a LDA como marcador interno na digesta de ovinos (n=204, P<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

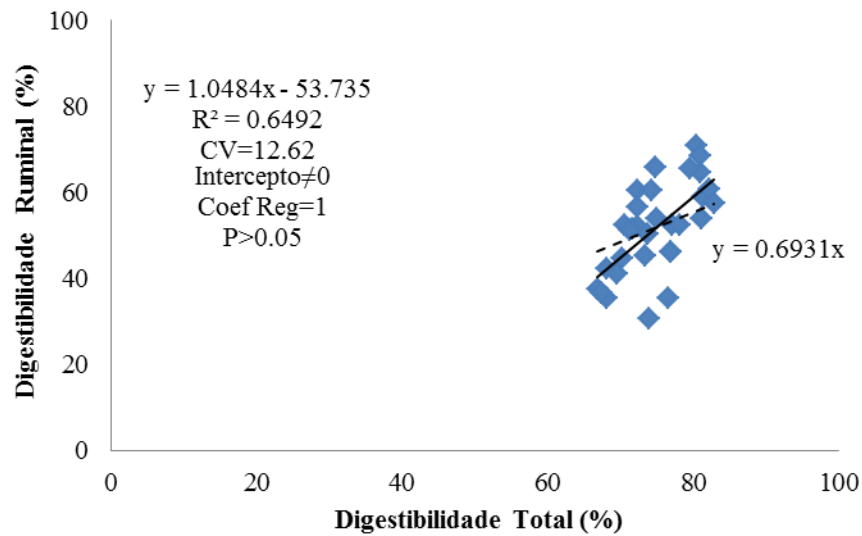


Figura 7 – Relação entre digestibilidade total da MS (%) e digestibilidade ruminal da MS (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a FDA como marcador interno na digesta de bovinos (n=31, P<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

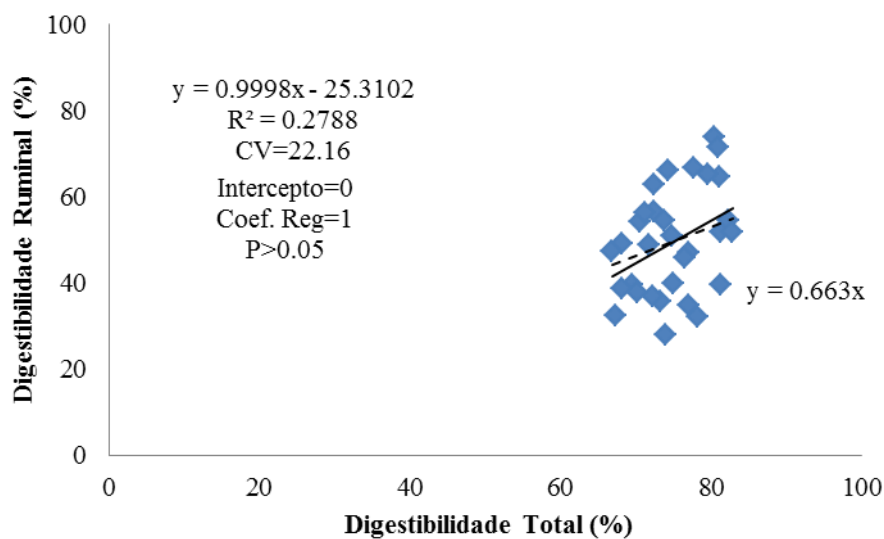


Figura 8 – Relação entre digestibilidade total da MS (%) e digestibilidade ruminal da MS (%) estimadas através do fluxo duodenal de MS, utilizando a LDA como marcador interno na digesta de bovinos (n=31, P<0,05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

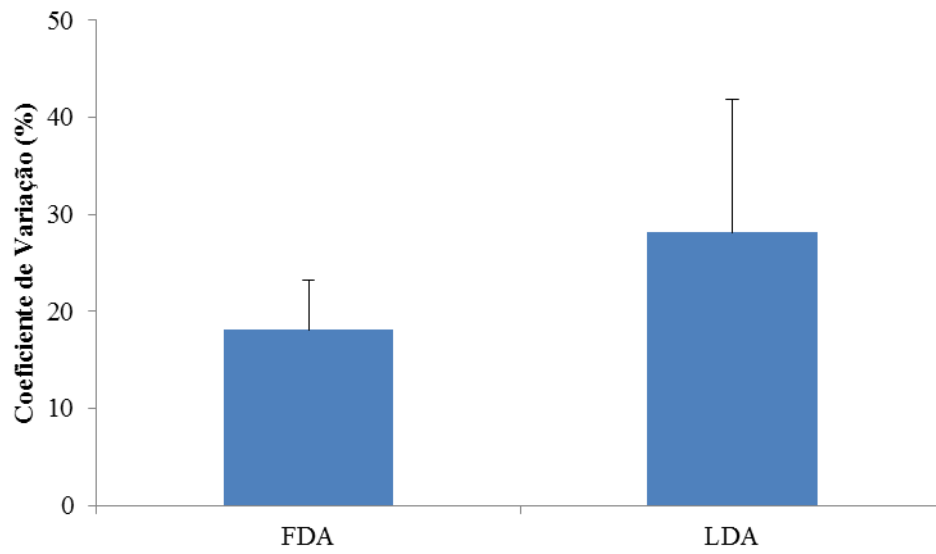


Figura 9—Médias dos coeficientes de variação da digestibilidade ruminal da MS, estimadas através da fibra em detergente ácido (FDA) ou lignina em detergente ácido (LDA), como marcadores internos em ensaios com ovinos (8 ensaios) e bovinos (2 ensaios). Linhas acima das barras indicam o desvio padrão das médias (DP) ($P < 0.05$, $n = 10$).

6 DISCUSSÃO

As estimativas do fluxo de MS ao duodeno e as relações entre elas indicam que o FDA pode ser utilizado como marcador de fluxo de digesta, como alternativa ao LDA, em bovinos e ovinos. Os fluxos de digesta duodenal obtidos a partir das concentrações de FDA e LDA foram similares. Estes resultados estão em concordância com Porter e Singleton (1971a) que indicaram o uso do LDA como marcador por não haver degradação intestinal dessa fração. Em um trabalho subsequente, Porter e Singleton (1971b) apontaram a possibilidade de outras frações, principalmente a FDA por apresentar degradação intestinal muito pequena, como possíveis marcadores. Os coeficientes de variação, observados nas determinações de fluxo de digesta baseadas na FDA, foram inferiores aos observados com a LDA, o que reforça o potencial dessa fração ser utilizada como marcador do fluxo de digesta em ovinos e bovinos.

A estimativa da degradação ruminal dos alimentos tem sido fundamental para avaliar a quantidade de nutrientes disponíveis para os microrganismos do rúmen e sua qualidade (MOREIRA et al., 2003). No presente estudo, a digestibilidade ruminal foi semelhante entre os marcadores dentro de cada espécie, com a FDA apresentando valores de digestibilidade ruminal mais elevados em relação à digestibilidade total. Os valores médios de digestibilidade ruminal da MS, nos ensaios com ovinos, foram de 78% com FDA e de 75% com LDA e, nos ensaios em que foram utilizados bovinos, foram de 69% e 66% com a LDA e FDA, respectivamente. A menor digestibilidade ruminal em bovinos pode ser explicada pelo fato de as dietas serem compostas por concentrado, proporcionando maior taxa de passagem e, conseqüentemente, menor tempo de retenção do alimento no rúmen. Owens e Zinn (2005) encontraram resultados semelhantes em um estudo com vacas, em lactação, alimentadas com dietas ricas em amido em que em torno de 60% de todo o alimento digerido ao longo do trato gastrointestinal foi degradado no rúmen.

Quando observados os coeficientes de variação, verificou-se que esta medida de dispersão apresentou valores mais baixos para a FDA e, conforme a análise de variância, a FDA é mais precisa que a LDA para estimar digestibilidade ruminal. Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que a FDA pode ser utilizada como marcador de fluxo de digesta duodenal, uma vez que os resultados foram semelhantes entre os marcadores e menores variações foram obtidas nas estimativas utilizando a FDA. Além disso, como citado por Van Soest et al. (1993), a lignina é um componente indigestível nos intestinos e pode ser

utilizada como indicador. Conforme os resultados obtidos no presente estudo, a mesma afirmação pode ser feita para a FDA.

Dados da literatura indicam que a lignina apresenta problemas com a determinação e recuperação fecal (BERCHIELLI et al. 2005b). A complexa e variável estrutura da lignina torna difícil a adoção de metodologias específicas que determinem, com alta confiabilidade, sua real concentração. A situação é agravada ao considerar evidências de que a lignina dietética difere da lignina fecal em seus constituintes químicos (ELAN e DAVIS, 1961). Jung e Fahey (1983) observaram que a lignina é degradada ou modificada estruturalmente durante a passagem pelo trato gastrointestinal, resultando em baixa recuperação fecal.

Outro problema associado à adoção da LDA como marcador é a variabilidade dos resultados obtidos nas análises. Mesmo com vastas pesquisas, a composição da lignina permanece obscura e, conseqüentemente, sua determinação quantitativa é basicamente empírica (FAHEY et al., 1983). No entanto, a análise de FDA é um método corriqueiro entre os laboratórios, pois é de baixo custo, rápido e com boa reprodutibilidade nos resultados.

7 CONCLUSÕES

O fluxo duodenal e a digestibilidade ruminal da MS podem ser precisamente estimados a partir da relação entre a concentração de FDA ,com cinzas, nas fezes e na digesta duodenal de ruminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16th, 3.ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 1997.

BEEVER, D. E. COELHO DA SILVA, J. F., PRESCOTT, J. H. D. and ARMSTRONG, D.G. The effect in sheep of physical form and stage of growth on the sites of digestion of adried grass 1. Sites of digestion of organic matter, energy and carbohydrate. **British Journal of Nutrition**, 28, 347, 1972.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUES, M. N.; OSÓRIO, N. E. Comparação de indicadores de fase sólida para medir fluxo de matéria seca e matéria orgânica no duodeno. **Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n.2, p. 147-152, 1998.

BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S.G. and GARCIA, A.V. Aplicação de técnicas para estudos de ingestão, composição da dieta e digestibilidade. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.29-40, 2005a.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.M.; et al. Comparação demarcadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.987-996, 2005b.

COCHRAN, R.C., ADAMS, D.C., WALLACE, J.D. and GALYEAN, M.L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, 63, 1476–1483, 1986.

CRAMPTON, E. W. and MAYNARD. L. A. 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. **Journal of Nutrition**.15:383.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

ELAM, C. J. and DAVIS, R. E. Lignin Excretion by Cattle Fed a Mixed Ration. **Journal of Animal Science**, 20:484-486, 1961.

ELLIS, G. H., MATRONE G. and MAYNARD. L. A. A 72% sulfuric acid method for the determination of lignin and its use in animal studies. **Journal of Animal Science**, 5:285,1946.

ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; HILL, T.H. et al. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, p.682-7561994.

FAHEY, Jr. G. C., and JUNG, H. G. Lignin as a Marker in Digestion Studies: a Review. **Journal of Animal Science**, 57:220-225, 1983.

FAICHNEY, G. J. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: **Digestion and Metabolism in the Ruminant**. I. W. McDonald and A.C.I. Warner, ed. Univ. New England Publ. Unit, Armidale, New South Wales, Australian, 1975.

FAICHNEY, G.J. Digest flow: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. **Wallingford: CAB International**, 2ed. p.49-86, 2005.

FORBES, E. B., ELLIOT, R. F. SWIFT, R. W. JAMES W. H. and SMITH V. F. Variation in determination of digestive capacity of sheep. **Journal of Animal Science**.5:298, 1946.

FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados por meio de marcadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1521-1530, 2002.

GROVUM, W. L. A new look at what is controlling food intake. **Feed Intake Symposium**, Oklahoma, 1986.

HALE, E. B., DUNCAN C. W. e HUFFMAN C. F. Rumen digestion in the bovine with some observations on the digestibility of alfalfa hay. **Journal of Dairy Science**, 23:953, 1940.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. et al. Comparação de marcadores e metodologia de coleta para estimativas de produção fecal e fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1833-1839, 2002.

JUNC, H.G.; FAHEY Jr., G.C. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. **J. Anim. Sci**, v.57, p.206-219, 1983

KOMAREK, R. J. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 250, Supplement 1. 1993.

KOZLOSKI, G. V.; MESQUITA, F. R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. de S.; STEFANELLO, C. M.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L. M. Avaliação do uso de frações

indigestíveis do alimento como indicadores internos de digestibilidade em ovinos. **Revista brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 1819-1823, 2009.

LIPPKE, H.; FORBES, T.D.A.; ELLIS, W.C. Effect of supplements on growth and forage intake by stocker steers grazing wheat pasture. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1625-1635, 2000.

LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Animal Science**, v.69, n.2, p.403-413, 1986.

MACRAE J. C. e ARMSTRONG D. G. Studies on intestinal digestion in the sheep 2.Digestion of some carbohydrate constituents in hay, cereal and hay-cereal rations.**British Journal of Nutrition**, 23, 377, 1969.

MARAIS, J.P. Use of Markers. in: **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. CAB International ed. J.P.F. D'Mello, 2000.

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

MERTENS, D.R.; ELY, L.O. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization: a dynamic model evaluation. **Journal of Animal Science**, v.54, n.4, p.895-905, 1982

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

MESQUITA, F.R. **Avaliação de componentes da fibra como marcadores internos e de alcanos para estimar o fluxo de digesta no duodeno de bovinos**. 2012. Dissertação (Mestrado em zootecnia)- Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

MOREIRA, J.F.C.; RODRIGUEZ, N.M.; FERNANDES, P.C.C. et al. Concentrados proteicos para bovinos. 1. Digestibilidade *in situ* da matéria seca e da proteína bruta. **Arq.Bras.Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.315-323, 2003.

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

OWENS, F. N., e ZINN R. A. Corn grain for cattle: Influence of processing on site and extent of digestion. **Southwest Nutr.Conf., Univ. of Arizona**, p. 78-85, 2005.

PORTER, P. e SINGLETON, A. G. The degradation of lignin and quantitative aspects of ruminant digestion. **British Journal of Nutrition**, n. 25, 3, 1971a

PORTER, P. and SINGLETON, A. G. Digestion of carbohydrates of hay in small ruminants. **British Journal of Nutrition**, n. 26, 75, 1971b.

ROBERTSON, J. B. e VAN SOEST, P. J. The detergent system of analyses and its application to human foods. In: **The analysis of dietary fiber in food**. New York, p.123-156, 1981.

SALIBA, E. O. S. **Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostos à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais**. 1998. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 1998.

SAS.Institute Inc. SAS Language Reference. Version 9.2. Cary, NC: **SAS institute**, 2007

SENGER, C. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p.169, 2008.

THONEY, M. L.; et al. Acid insoluble ash and permanganate lignin as indicators to determine digestibility of cattle rations. **Journal of Animal Science**.v. 49, n. 4, p. 1112-1116, 1979.

VAN SOEST, P.J. Cell wall matrix interactions and degradation-session synopsis. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, p.377-393, 1993.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, nd ed. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, 1994.

WALDO, D.R.; SMITH, I.W. e COW, L.L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.1, p.125-129, 1972.

WALLER, J.; MERCHEN, N.; HANSON T. e KLOPFENSTEIN T. Flow Determinations effect of sampling intervals and digesta markers on abomasal. **Journal of Animal Science**, 50:1122-1126, 1980.

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

WEISS, P.E. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Fahey Jr., G.C. (Ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 644-681, 1994.

ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M; et al. Recuperação fecal de marcadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1865-1874, 2002.

CAPITULO II

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL: DERIVADOS DE PURINAS URINÁRIOS E PURINAS NO DUODENO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de purinas microbianas da digesta duodenal e derivados de purinas excretados na urina para estimar a síntese de proteína microbiana ruminal em bovinos e ovinos. Foram utilizadas amostras e dados de nove ensaios de digestibilidade, todos com delineamento Quadrado Latino, realizados na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS e na Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, sendo sete ensaios com ovinos (n=176) e dois ensaios com bovinos (n=31). Todos os animais foram cirurgicamente implantados com cânula tipo “T” simples no duodeno. As dietas experimentais foram baseadas no uso de volumosos, com ou sem suplementação com concentrados. Em todos os ensaios, foi feita coleta total de fezes e urina e obtidas amostras de digesta duodenal. Na digesta duodenal foi analisada a concentração de purinas e, na urina, foram analisados os derivados de purinas. A síntese de proteína microbiana foi estimada com base nas concentrações de purinas no duodeno e fluxo de digesta duodenal, ou pela concentração de derivados na urina utilizando as equações encontradas na literatura utilizada no estudo. Nos bovinos, o nitrogênio microbiano estimado pelos derivados apresentou alta e significativa relação ($P < 0.05$) quando comparado com o método das purinas em todas as equações testadas. A eficiência da síntese de proteína microbiana foi superior quando estimada pelos derivados, entretanto, encontra-se dentro da faixa de valores citados na literatura. Nos ovinos, o nitrogênio microbiano e a eficiência de síntese de proteína microbiana foram superiores quando estimados pelas purinas. As equações testadas, que apresentaram melhor relação com as purinas microbianas da digesta duodenal de ovinos, foram a de Chen e Gomes, (1992) e Ma et al.,(2013a). Dessa forma, conclui-se que o nitrogênio microbiano pode ser estimado a partir dos derivados de purinas urinários em bovinos, porém, em ovinos, os derivados subestimam a quantidade de nitrogênio microbiano, quando comparado com o método das purinas no duodeno.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos. Ácido úrico. Alantoína. Bovinos. Nitrogênio microbiano. Ovinos.

COMPARISON OF METHODS FOR ESTIMATING SYNTHESIS OF MICROBIAL RUMINAL PROTEIN: URINARY PURINE DERIVATIVES AND PURINES IN THE DUODENUM

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of microbial purines of duodenal digesta and purine derivatives excreted in urine to estimate rumen microbial protein synthesis in cattle and sheep. Samples and data from nine digestibility trials, all with Latin Square design, performed at the Federal University of Santa Maria, and the University of the State of Santa Catarina, were used seven trials with sheep (n=176) and two trials with cattle (n=31). All animals were surgically implanted with simple type "T" duodenum cannula. The experimental diets were based on the use of a base diet, with or without concentrate supplementation. A total collection of feces and urine, as well as the collection samples of duodenal digesta were carried out in all assays. The concentration of purines and urine of purine derivatives was analyzed in duodenal digesta. The synthesis of microbial protein was estimated based on the concentrations of purines either in the duodenum and the duodenal digesta flow or the concentration of urine derived using equations found in literature used in the study. In cattle the estimated microbial nitrogen by derivatives presented high and significant relation ($P < 0.05$) when compared with the method of purines in all equations tested. The efficiency of microbial protein synthesis was higher than that estimated by derivatives, however, lies within the range of values reported in the literature. In sheep, the microbial nitrogen and efficiency of microbial protein synthesis were higher when estimated by purines. The tested equations which showed better relationship with the microbial purines of duodenal digesta of sheep were Chen and Gomes (1992) and Ma et al., (2013b). Thus, it may be concluded that the microbial nitrogen may be estimated from urinary purine derivatives in cattle, but in sheep derivatives underestimate the amount of microbial nitrogen when compared with the method of purines in the duodenum.

Keywords: Allantoin. Cattle. Microbial nitrogen. Nucleic acids. Sheep. Uric acid.

1 INTRODUÇÃO

As exigências proteicas dos ruminantes são atendidas mediante a absorção intestinal de aminoácidos provenientes, principalmente, da proteína microbiana sintetizada no rúmen e da proteína de origem alimentar não degradada no rúmen (KOZLOSKI, 2011). Segundo Clark et al. (1992), a quantificação da síntese de proteína microbiana, bem como a determinação da degradação da proteína dos alimentos no rúmen são os pontos críticos em todos os sistemas de avaliação nutricional de animais ruminantes, especialmente no caso de animais de alto potencial produtivo.

Os microrganismos do rúmen são ricos em ácidos nucléicos com cerca de 18% do nitrogênio total (CHEN e ØRSKOV, 2004). A fim de quantificar a proteína microbiana, foram desenvolvidas metodologias como a proposta por Zinn e Owens (1986), adaptada a partir de uma técnica desenvolvida por McAllan e Smith (1969), que objetiva a mensuração de purinas nas bactérias. Com base nesses métodos, a síntese de proteína microbiana pode ser estimada através do fluxo duodenal de purinas. Esta medida por ser direta, poderia trazer maior confiabilidade na estimativa de fluxo de proteína microbiana ruminal. No entanto, para a medida do fluxo e a obtenção de amostras de digesta duodenal, é necessário o uso de animais fistulados pós-ruminalmente. Esses métodos são considerados invasivos e, conseqüentemente, de encontro às premissas de sanidade e bem-estar animal além, dos custos envolvidos com o procedimento cirúrgico e manutenção destes animais (TAS e SUSENBETH, 2007).

Pesquisas vêm sendo realizadas durante os últimos 20 a 30 anos acerca da excreção urinária de metabólitos das purinas com o objetivo de usar a excreção desses metabólitos como um parâmetro para estimar quantitativamente a oferta de proteína microbiana sintetizada no rúmen. As purinas dos microrganismos do rúmen são metabolizadas e excretadas na urina na forma de seus produtos finais, também chamados de derivados de purinas: alantoína, ácido úrico, hipoxantina, xantina. Chen e Gomes (1992) desenvolveram uma metodologia baseada na mensuração da excreção de derivados de purinas na urina para estimar a síntese de proteína microbiana. A utilização desta técnica apresenta vantagens sob outros métodos por não ser invasiva, eliminando os transtornos de comportamento alimentar e digestivo dos animais devido à implantação de cânulas e, ademais, é de fácil implantação na

maioria das circunstâncias experimentais, pois necessita unicamente da coleta de urina do animal (CARRO, 2001).

Entretanto, na literatura encontram-se muitas incoerências quanto aos resultados da síntese de proteína microbiana utilizando derivados de purinas, bem como diferentes equações para estimá-la. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo comparar o uso das purinas da digesta duodenal com os derivados de purinas excretados na urina como marcadores para estimar a síntese de proteína microbiana em bovinos e ovinos.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Síntese de proteína microbiana ruminal

A quantificação da síntese de proteína microbiana é necessária devido à grande importância que os microrganismos ruminais, principalmente as bactérias, possuem na digestão e degradação da fibra, além de ofertarem ao animal proteína microbiana de alto valor biológico para absorção no intestino delgado. Em razão disso, existe interesse constante em estudar mais detalhadamente a quantidade de proteína produzida pelos microrganismos do rúmen para melhor atender as exigências proteicas dos animais.

A quantidade e a eficiência de síntese de proteína microbiana no rúmen dependem da fermentação ruminal realizada pelos microrganismos que habitam os pré-estômagos do animal, que, por sua vez, requerem energia e proteína em quantidade e qualidade adequadas à sua demanda metabólica para hidrólise e digestão de moléculas complexas como, por exemplo, a celulose (VALADARES FILHO, 1995). Infelizmente, a relação entre N e exigências de energia para os microrganismos ruminais em ruminantes são complexas e não bem compreendidas. Além disso, o estabelecimento de uma relação ótima de nitrogênio para a energia na dieta fornecida é complicado porque dois requisitos devem ser atendidos, um para os microrganismos ruminais e outro para o animal (CLARK et al., 1992).

As exigências proteicas dos ruminantes são atendidas mediante a absorção intestinal de aminoácidos provenientes, principalmente, da proteína microbiana sintetizada no rúmen e da proteína de origem alimentar não degradada no rúmen (HUTTON et al., 1971; RUSSEL, et al., 1992). Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que 40 a 90% da proteína que chega ao intestino delgado é de origem microbiana (SCHNIFFEN e ROBISON, 1987; CLARK et al., 1992). A estimativa da síntese microbiana ruminal pode ser obtida através de marcadores microbianos internos ou externos. No entanto, existe uma limitação na compreensão do processo da síntese de proteína microbiana devido à falta de métodos simples e precisos para fazer estas estimativas *in vivo* (CHEN e GOMES, 1992).

2.4 Marcadores microbianos

Os marcadores microbianos podem ser classificados em dois grandes grupos: marcadores internos e externos. Os marcadores internos são constituintes das células microbianas e, por isso, não precisam ser administrados aos animais experimentais. Por outro lado, os marcadores externos devem ser administrados aos animais experimentais para que sejam incorporados pelos microrganismos ruminais fazendo parte de suas estruturas (CARRO, 2001).

Segundo Broderick e Merchen (1992), um marcador microbiano ideal deveria cumprir os seguintes requisitos: (1) ser de fácil determinação e quantificação, (2) não fazer parte da composição alimentar dos animais, (3) distribuir-se de maneira uniforme em todas as espécies microbianas ruminais e (4) ser biologicamente estável. Dehority (1995) acrescentou mais três requisitos: (5) não ser absorvido no trato digestivo, (6) estar em uma proporção constante nos microrganismos ruminais em todas as suas fases de crescimento e (7) que em todas as suas formas apresente mesma taxa de passagem pelo trato digestório. No entanto, nenhum dos marcadores apresenta todos os requisitos mencionados (BRODERICK e MERCHEN, 1992; OBISPO e DEHORITY, 1999).

Os principais marcadores internos são: derivados de purinas, bases de purinas ou ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA)), ácido diaminopimélico (DAPA), perfis de aminoácidos e o ATP (adenosina trifosfato) (CHEN e ØRSKOV, 2004). Neste trabalho, será dada ênfase às primeiras duas técnicas, por serem relevantes ao contexto do estudo.

2.4.1 Bases de purinas

Quando nos referimos às bases purinas (BP), estamos nos remetendo aos constituintes dos ácidos nucleicos presentes no RNA e DNA de todos os seres vivos. Os ruminantes podem ingerir quantidades relevantes de ácidos nucleicos da dieta, além dos sintetizados pela população microbiana no retículo-rúmen. Segundo Chen e Ørskov (2004), os pesquisadores Smith e McAllan, na década de 1970, realizaram extensos estudos sobre o metabolismo dos

ácidos nucleicos no intestino dos ruminantes. Suas pesquisas demonstraram que fontes exógenas de ácidos nucleicos foram completamente degradadas no líquido ruminal. Isso indica que os ácidos nucleicos oriundos da alimentação não contribuem significativamente para o teor de ácidos nucleicos que deixam o rúmen e considera-se que os ácidos nucleicos que entram no duodeno dos ruminantes são exclusivamente de origem microbiana. McAllan (1982) afirma que os ácidos nucleicos da dieta e seus derivados são rapidamente degradados no rúmen e não contribuem significativamente para o total de ácidos nucleicos que chegam ao duodeno. A utilização das bases purinas como marcador de síntese bacteriana está baseada nesse conceito.

O método descrito por Zinn e Owens (1986) para quantificação de purinas é considerado um método simples, rápido e de menor custo, se comparado a outros métodos diretos para estimar a síntese microbiana no rúmen. Este método baseia-se na hidrólise das bases purinas em HClO_4 e posterior precipitação dos produtos desta hidrólise, adenina e guanina, em AgNO_3 (MAKKAR e BECKER, 1999).

A estimativa da síntese microbiana por purinas é passível de erro dependendo da proporção de bactérias associadas à fase sólida presente no rúmen (CARRO, 2001). Merry e McAllan (1983) relatam que esta proporção está relacionada com a alimentação fornecida ao animal, podendo chegar a ser de 90% em dietas com apenas forrageiras na alimentação.

Makkar e Becker (1999) sugerem modificações para o método descrito por Zinn e Owens (1986) lançando a hipótese de que há a possibilidade de alimentos não digeridos no ambiente ruminal produzirem erros na determinação de purinas. Contudo, os autores atestam a confiabilidade do método para determinação de purinas após a transformação dos valores de absorvância em proteína microbiana. Broderick e Merchen (1992) destacam que não há nenhum marcador completamente adequado e as estimativas obtidas são relativas e não absolutas. Contudo, os autores indicam as purinas totais como um robusto marcador microbiano.

A maior limitação para estimar proteína microbiana no duodeno é a necessidade de coletar amostras de digesta ruminal e isolar as bactérias para determinação de um padrão bacteriano, de modo que, esta amostra necessita ser representativa do total da população bacteriana. No ambiente ruminal, estão presentes diferentes cepas de bactérias em diferentes fases de crescimento além de protozoários e outras espécies de microrganismos. A dificuldade de amostragem está no fato de necessitar de percentagens similares entre estas espécies e os diferentes estágios de crescimento. (OBISPO e DEHORITY, 1999).

Em um experimento realizado por Obispo e Dehority (1999), as concentrações de purinas em bactérias isoladas de amostras de digesta ruminal representaram, aproximadamente, um terço das encontradas em bactérias puras o que sugere que amostras bacterianas isoladas de conteúdo ruminal podem estar contaminadas, provavelmente com partículas muito pequenas da dieta, e a utilização destes valores poderia subestimar a síntese de proteína microbiana. Outro item importante na tentativa de estimar a síntese de proteína microbiana é a medida de fluxo duodenal. A acurácia da predição de síntese microbiana utilizando purinas é dependente da estimativa acurada do fluxo de digesta.

Para estimativas de fluxo, o mais comumente utilizado são cânulas duodenais simples em "T" que permitem coletas pontuais da digesta duodenal. Para quantificar o total da digesta é necessária a utilização de um marcador de fluxo.

2.4.2 Derivados de purinas

O termo "derivado de purina" foi usado pela primeira vez por Topps e Elliott (1965). Esses autores demonstraram que a excreção de alantoína na urina tem correlação com a concentração de ácidos nucleicos no rúmen. Os autores, também afirmaram, que alantoína na urina poderia servir a um índice de medida produção de ácidos nucleicos presentes no rúmen.

Ao longo dos últimos anos, as pesquisas confirmaram a relação entre síntese de proteína microbiana e excreção urinária de derivados de purinas (SERRANO et al., 2011). É observada correlação positiva entre o fluxo de N microbiano e excreção urinária de derivados de purinas comparada aos métodos dos ácidos nucleicos microbianos (PUCHALA e KULASEK, 1992). A estimativa de síntese microbiana por derivados de purinas tem demonstrado alta correlação com as medidas de fluxo de purinas no duodeno (PEREZ et al., 1996; GONZÁLES-RONQUILLO et al., 2004; RENNÓ et al., 2000; MA et al., 2013). Os autores também sugerem o uso dos derivados para estimar a síntese de proteína microbiana, porém observaram que o método das purinas normalmente possui coeficientes de determinação mais elevados e coeficientes de variação mais baixos em relação aos derivados.

A excreção de derivados de purinas está diretamente relacionada e é proporcional a absorção de purinas no duodeno, por conseguinte, a síntese de N microbiano pode ser

calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas, que é estimada por intermédio da excreção urinária de derivados de purinas (CHEN e GOMES, 1992).

A determinação de derivados de purinas para estimar a síntese microbiana assume que todos os ácidos nucleicos de origem dietética são degradados no rúmen e que, portanto, todos os ácidos nucleicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana (CHEN e GOMES, 1992). Isto ocorre porque os alimentos dos ruminantes possuem um baixo conteúdo de purinas e a maior parte deles sofre extensiva degradação no rúmen como resultado da fermentação microbiana.

No intestino delgado, os nucleotídeos das purinas são hidrolisados em nucleosídeos (guanosina, adenosina, inosina) e bases livres (guanina e adenina) e ambas as formas podem ser absorvidas (CHEN e GOMES, 1992). Os nucleosídeos e bases livres são absorvidos no lúmen do intestino delgado e estão sujeitos à degradação extensiva por enzimas específicas como, guanina deaminase, adenosina deaminase e xantina oxidase em sua passagem pela mucosa intestinal. É importante salientar que a extensão dessa degradação determina a disponibilidade metabólica das purinas a serem utilizadas pelos animais (STANGASSINGER, 1995). A degradação das purinas se dá por intermédio de ações enzimáticas: a xantina oxidase age na conversão de hipoxantina em xantina e ácido úrico; este, então, é degradado em alantoína, pela ação da uréase (LENINGHER, 1995). A figura 1 mostra, de modo esquemático, o princípio do metabolismo das purinas pelos ruminantes. As purinas dos ácidos nucleicos microbianos então são absorvidas, degradadas e excretadas na urina como seus derivados (produtos de degradação), alantoína e ácido úrico e, também, hipoxantina e xantina em ovinos, conforme pode ser observado na figura 2.

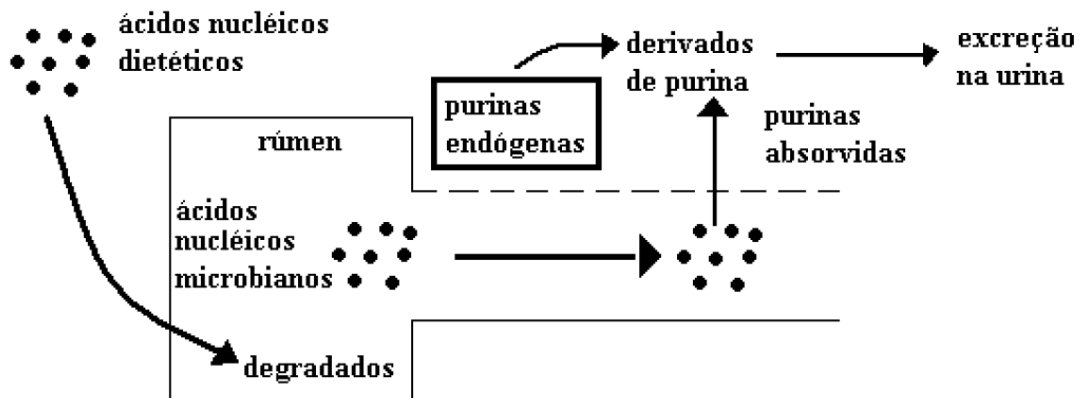


Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo das purinas pelos ruminantes.
(adaptado de Chen e Gomes, 1992).

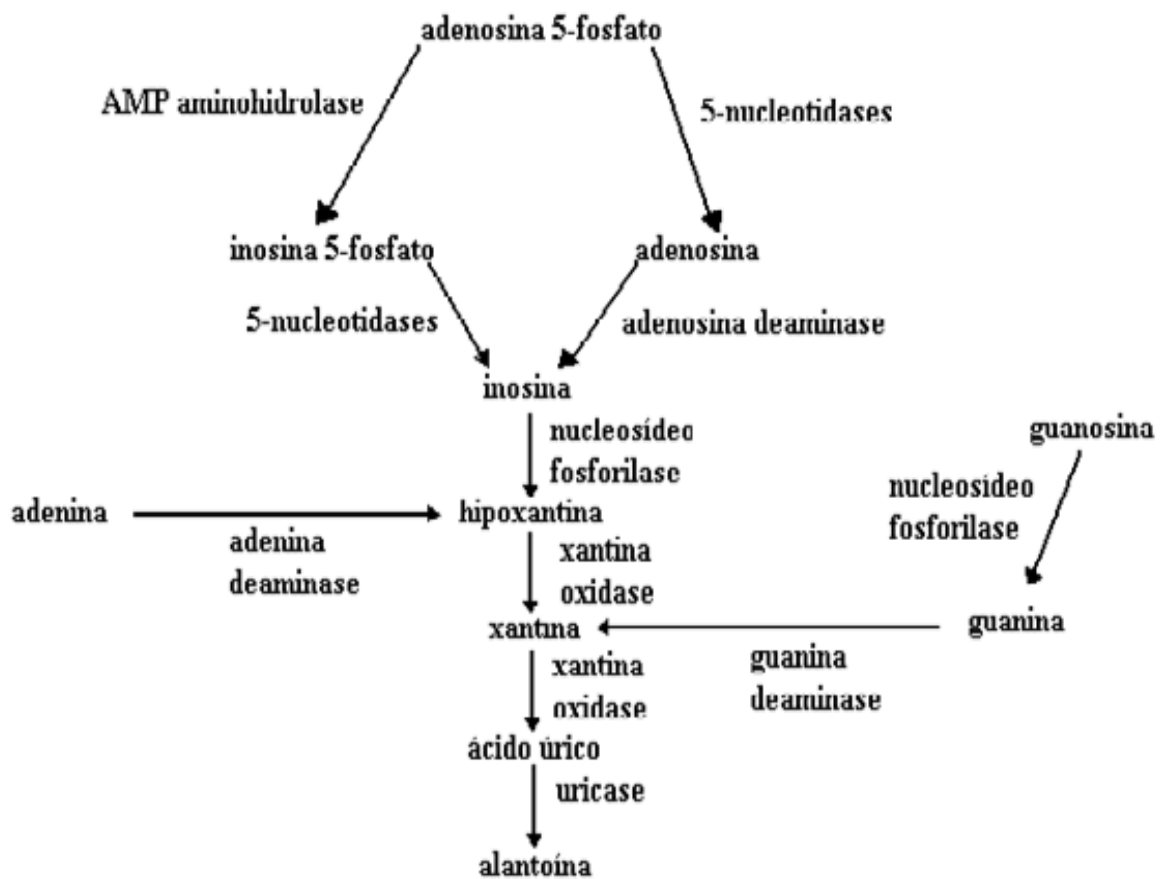


Figura 2–Formação dos derivados de purinas a partir da degradação dos nucleotídeos púricos.
(adaptado de Chen e Gomes, 1992).

Existem diferenças no metabolismo das purinas entre os bovinos e ovinos. Segundo Kozloski (2011), na mucosa intestinal, sangue, e na maior parte dos tecidos dos bovinos, há conversão a ácido úrico de quase todas as purinas absorvidas (absorvidas do catabolismo intracelular) pela alta ação da xantina oxidase nesses tecidos. O ácido úrico produzido chega ao fígado ou aos rins dos bovinos e é convertido a alantoína. O mesmo autor relata que, em ovinos, a atividade da xantina oxidase é praticamente nula, e por consequência as purinas podem ser utilizadas pelos tecidos dos animais, porém, as que escapam desse processo são convertidas aos seus produtos finais (hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína). A diferença no metabolismo das purinas entre as espécies leva a uma diferença entre os produtos (derivados) do metabolismo das purinas excretados na urina entre bovinos e ovinos. As concentrações são em torno de 80 a 85% de alantoína e de 15 a 20% de ácido úrico nos bovinos, enquanto nos ovinos as concentrações variam de 60 a 80% de alantoína, 10 a 30% de ácido úrico e 5 a 10% de hipoxantina e xantina (KOZLOSKI, 2011). Outra diferença entre bovinos e ovinos ocorre pela contribuição de derivados de origem endógena excretados na urina.

A excreção urinária de derivados de purinas, pelos ruminantes, pode ser usada para estimar o fluxo intestinal de proteína microbiana, uma vez que a excreção endógena de derivados de purinas e a relação quantitativa entre a excreção de derivados de purinas e a absorção de purina tenham sido previamente determinadas (CHEN et al., 1996). Nucleotídeos de purina são hidrolisados e re-sintetizados a partir de qualquer síntese de novas purinas ou captação de purinas pré-formadas. Este ciclo é um processo contínuo nos tecidos dos animais (CHEN e ØRSKOV, 2004). Durante este processo, uma pequena proporção das purinas recicladas é decomposta em alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, que são excretados na urina. Esta fração de derivados de purinas, que se originam de tecidos animais, é chamada de "endógeno". Deve ser lembrado que hipoxantina pode ser reutilizada para a síntese de nucleótidos de purinas, mas quando hipoxantina é oxidada pela xantina-oxidase para a produção de ácido úrico, esta não pode ser reutilizada (CHEN e ØRSKOV, 2004). A atividade da enzima xantina oxidase no tecido é, portanto, a chave que regula a produção e excreção de derivados de purinas endógenas.

Walker e Faichney (1964) e Laurent e Vignor (1983) avaliaram a excreção endógena em animais em jejum, porém seus resultados foram variáveis (em ovinos foi de 32-208 mmol de alantoína/kg PV^{0.75} por dia). Foi constatado nesses trabalhos que o jejum prolongado pode

alterar as atividades metabólicas do animal e, assim, a taxa de degradação dos ácidos nucleicos.

Segundo Stangassinger et al. (1995), existem diferenças no metabolismo das purinas, sendo estabelecido que ovinos e *Bos taurus* diferem quanto ao nível de excreção endógena de purinas e à habilidade de utilização de purinas de origem exógena.

Chen et al. (1990) realizaram medições da excreção endógena de derivados de purinas em ovinos e bovinos. Foi observada diferença na excreção endógena entre ovinos e bovinos, sendo de 168 e 514 mmol/kg PV^{0.75}, respectivamente. Os autores sugerem que este resultado pode ter se dado devido à atividade da enzima xantina oxidase. Essa enzima é ausente no sangue de ovinos, mas presente e em atividade elevada no sangue e em outros tecidos de bovinos. Orellana Boero et al. (2001) também observaram que, em bovinos, existe alta atividade da enzima xantina oxidase na mucosa intestinal e plasma, que oxida as purinas rapidamente a compostos não reutilizáveis, enquanto que nos ovinos isso não acontece.

A excreção de derivados de purinas é determinada pela absorção de purinas microbianas. Entretanto, a relação entre excreção total de derivados e absorção de purinas microbianas não é linear em ovinos. Isto ocorre porque nestes animais a atividade da xantina oxidase na mucosa intestinal é muito pequena e parte das purinas absorvidas podem ser utilizadas pelos tecidos do animal para a re-síntese e incorporação nos ácidos nucleicos teciduais. Os derivados originados da degradação exógena de purinas são produzidos principalmente no fígado que possui alta atividade de xantina oxidase e uricase. Em ovinos, a relação entre excreção urinária de derivados e absorção de purinas exógenas é corrigida pelo fator 0,84, que ajusta a perda de derivados de purinas para rotas que não sejam a excreção na urina (CHEN e GOMES, 1992; CHEN et al., 1992; CHEN et al., 1990).

A excreção de derivados de purinas na urina representa uma alternativa de técnica simples e não invasiva suportada pelo princípio de que a excreção urinária dos derivados provém de ácidos nucleicos que fluem do rúmen (GONZÁLES-RONQUILLO et al., 2004; PEREZ et al., 1996). As análises de derivados de purinas (alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina) podem ser realizadas por um método colorimétrico (CHEN e GOMES, 1992). Embora esta seja uma técnica relativamente simples, para sua execução é necessário à coleta total de urina.

Segundo Serrano et al. (2011), as principais limitações desta técnica residem no fato de estar baseada em duas suposições. A primeira, de que todo ácido nucleico que chega ao intestino delgado é de origem microbiana e assumir tal fato não compromete a maioria dos

estudos, pois, de fato, os ácidos nucleicos dietéticos são rapidamente e extensivamente degradados no rúmen, mas existem exceções que não podem ser desprezadas. O segundo ponto de limitação refere-se à relação entre purinas e proteína nos microrganismos ruminais ser constante, em que, até o momento, não há informação suficiente para tal afirmação.

3 HIPÓTESES

Os derivados de purinas excretados na urina podem ser utilizados como marcadores para estimar a síntese de proteína microbiana ruminal independente da espécie em questão.

Os resultados das estimativas de síntese de proteína microbiana utilizando equações disponíveis na literatura, a partir dos derivados de purinas, são semelhantes aos estimados utilizando as purinas da digesta duodenal em bovinos e ovinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

As análises laboratoriais e de dados foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, vinculado ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, no período de março de 2012 a novembro de 2013.

4.2 Ensaios

Foram utilizadas amostras de digesta duodenal e fezes, bem como dados de consumo e excreção fecal de 9 ensaios de digestibilidade *in vivo* previamente conduzidos no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina. O banco de dados e amostras foi constituído por 7 ensaios com ovinos (n=176) e 2 ensaios com bovinos (n=31), sendo todos os ensaios realizados usando o delineamento experimental Quadrado Latino. Todos os animais foram cirurgicamente preparados para a implantação de cânula do tipo “T” no duodeno proximal para possibilitar as coletas de digesta duodenal. Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas e foram alimentados exclusivamente com forragem ou recebiam algum tipo de suplementação. As descrições gerais das dietas e variáveis relevantes são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 — Descrição de algumas variáveis (dieta, peso corporal, consumo de matéria seca (MS) e digestibilidade da MS) nos ensaios com ovinos e bovinos utilizados no estudo.

Ensaio	n	Dietas	Espécie	Peso Corporal (kg)	Consumo MS (g/dia)	Digestibilidade MS (%)
1	16	<i>Cynodon dactylon</i> fresco	Ovinos	23-31	294-784	47-74
2	15	<i>Sorghum sudanense</i> congelado + farelo de canola e grão de milho moído	Ovinos	28-34	330-963	50-86
3	14	<i>Lolium multiflorum</i> fresco + extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> (infusão intrarruminal)	Ovinos	28-33	245-879	62-81
4	24	<i>Lolium multiflorum</i> fresco	Ovinos	18-28	221-926	63-91
5	66	<i>Lolium multiflorum</i> fresco ou feno de <i>Cynodon sp.</i> + níveis de glicerina bruta (infusão intrarruminal)	Ovinos	15-36	105-711	43-80
6	25	<i>Pennisetum purpureum</i> + feno de <i>Arachis pintoi</i>	Ovinos	31-44	575-1258	58-69
7	16	<i>Pennisetum purpureum</i> + feno de <i>Arachis pintoi</i>	Ovinos	35-46	915-1542	47-63
8	15	<i>Avena strigosa</i> fresca + farelo de soja, farelo de arroz, grão de milho moído e níveis de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i>	Bovinos	110-205	2176-4144	73-83
9	16	Silagem de milho + farelo de soja ou farelo de canola + farelo de trigo, grão de milho moído e 1,5% ou não de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> na dieta	Bovinos	190-395	4926-9868	67-75

4.3 Coleta de amostras

Os períodos experimentais dos ensaios variaram entre 15 a 21 dias de adaptação e 5 a 7 dias para coleta de dados e amostras. Os alimentos, sobras e fezes foram pesados e amostrados diariamente durante o período de coletas. Foram coletadas amostras de digesta duodenal (aproximadamente 100 mL) a cada 2 ou 3 horas por um período de 24 horas.

As amostras de alimentos, sobras, fezes e digesta duodenal foram previamente secas em estufa com circulação forçada de ar a 55° C durante, no mínimo, 72 horas, moídas a 1 mm e armazenadas para posterior análise. Durante o período de coletas, foi realizada a coleta total de urina em recipientes contendo 100 mL de H₂SO₄ 20%. O volume total diário foi mensurado e uma amostra foi coletada. Posteriormente, foi diluída, filtrada e armazenada congelada a -20° C até o momento da análise dos derivados de purinas.

4.4 Análises químicas

Nas amostras de alimentos, sobras, fezes e digesta duodenal foram determinados os teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM). Nas amostras de fezes e digesta duodenal, também foram analisados os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de forma sequencial. A FDA foi utilizada como marcador para estimar o fluxo de digesta no duodeno. Nas amostras de digesta duodenal, foram analisadas as concentrações das bases de purinas, que foram utilizadas como indicadores de síntese de proteína microbiana ruminal. Nas amostras de urina foram analisados os derivados de purinas (alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina), sendo que a xantina e a hipoxantina foram analisadas, apenas, nos ensaios com ovinos.

O teor de matéria seca MS foi determinado por secagem em estufa a 105°C durante, pelo menos, 16 horas. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a MO por diferença de massa. A análise de FDN foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) sem uso de α -amilase termoestável e sulfito de sódio e a análise de FDA foi de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto pelo fato de as amostras terem sido pesadas dentro de sacos de poliéster (4 × 5 cm; porosidade de 16 μ m),

tratadas com detergente neutro e, sequencialmente, com detergente ácido em autoclave a 110° C por 40 minutos (Senger et al., 2008).

4.4.1 Análise de purinas

Os teores de purinas das amostras de digesta duodenal foram quantificados conforme os procedimentos descritos por Makkar e Becker (1999). Para a confecção do padrão, foram utilizadas 25 mg de adenina e 25 mg de guanina os quais passaram pelos mesmos processos das amostras de digesta duodenal.

Foram pesados 200 mg de digesta duodenal, previamente seca e moída, em tubos de centrífuga de 25 mL e tampados com uma esfera de vidro. Posteriormente, foram adicionados 2,5 mL de HClO₄ 2 M e as amostras mantidas em banho-maria por 1 hora a 90 – 95°C com agitação periódica. Após este processo, adicionou-se 7,5 mL de NH₄H₂PO₄ 28,5 mM. A amostra foi novamente submetida ao banho-maria por 15 minutos a 90 – 95°C.

A amostra foi centrifugada a 4000 x g por 20 minutos e uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi retirada e adicionados a ela 4,5 mL de NH₄H₂PO₄ 0,2 M. Posteriormente, foi agitada vigorosamente e adicionados 250 µL de AgNO₃ 0,4 M. Em seguida, a amostra foi mantida a 4°C por um período de 12 horas. Posterior a este período, a amostra foi novamente centrifugada (12000 x g por 20 minutos) descartando-se o sobrenadante e foram adicionados ao pellet 4,5 mL de água destilada com o pH ajustado para 2,0 com H₃PO₄ 0,1M.

Após este processo, a amostra foi novamente submetida à centrifugação a 12000 x g por 20 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e ao pellet foram adicionados 5 mL de HCl 0,5 M agitando-o vigorosamente. A amostra permaneceu em banho-maria a 90 – 95°C por 30 minutos (desta vez, coberta com condensadores). Transcorrido este período, a amostra foi centrifugada por 12000 x g por 20 minutos e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 260 nm contra um branco de HCl 0,5 M.

4.4.2 Análise de derivados de purinas

Nas amostras de urina, as concentrações de alantoína e ácido úrico foram determinadas colorimetricamente de acordo com Chen e Gomes (1992). O ácido úrico foi determinado usando um Kit comercial (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil) após xantina e hipoxantina serem convertidas a ácido úrico com xantina oxidase. Esse processo foi necessário apenas para as amostras de urina dos ovinos. Assim, os teores de ácido úrico foram calculados com a soma de ácido úrico, xantina e hipoxantina (convertidas a ácido úrico) e, os derivados de purinas totais (DP), com a soma do ácido úrico e alantoína.

4.5 Cálculos

4.5.1 Digestibilidade e fluxo duodenal de MS

A digestibilidade aparente da MS e da MO foram calculadas da seguinte forma: $(\text{consumo (g/dia)} - \text{excreção fecal (g/dia)}) / \text{consumo (g/dia)}$.

O fluxo duodenal de MS (g/dia) foi estimado com base na excreção fecal e na concentração de FDA nas fezes e na digesta duodenal conforme a equação: $(\text{MS fecal (g/dia)} \times \text{FDA fecal (g/kg MS)}) / \text{FDA na digesta duodenal (g/kg MS)}$.

4.5.2 Fluxo duodenal de Nitrogênio microbiano estimado por purinas

A concentração de Nitrogênio microbiano (Nm) estimada pelo método de purinas representa a concentração de purinas (mg/g de MS) multiplicada pela relação Purinas: N das bactérias (4,3 segundo Chen e Gomes (1992)). O fluxo de Nm foi estimado pela concentração de Nm (g/g de MS) multiplicada pelo fluxo de MS no duodeno (g/dia).

4.5.3 Fluxo duodenal de proteína a microbiana estimado por derivados de purinas

4.5.3.1 Segundo Chen e Gomes (1992)

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

A) Ovinos:

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

O cálculo de X baseado no valor de Y usando o processo iterativo de Newton-Raphson:

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

B) Bovinos:

$$Y=0,85X + (0,385 PV^{0,75})$$

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

$$Nm \text{ (g/dia)} = 70X/(0,116 \times 0,83 \times 1000) = 0,727X$$

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

4.5.3.2 Segundo Ma et al. (2013a)

O fluxo de nitrogênio microbiano (Nm) no intestino delgado foi estimado em bovinos e ovinos com base na excreção urinária dos derivados de purinas totais (DPT). A equação foi desenvolvida a partir da relação entre derivados de purinas excretados na urina e concentração do marcador N¹⁵ na digesta duodenal.

$$\text{Nm (g/dia)} = 0,03 + 0,741 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

4.5.3.3 Segundo Ma et al. (2013b)

O fluxo de nitrogênio microbiano (Nm) no intestino delgado foi estimado em bovinos e ovinos com base na excreção urinária dos derivados de purinas totais. A equação foi desenvolvida a partir da relação entre derivados de purinas totais excretados na urina e concentração de bases purinas na digesta duodenal.

$$\text{Nm (g/dia)} = 1,787 + 0,620 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

4.5.3.4 Segundo Moorby et al. (2006)

O fluxo de nitrogênio microbiano (Nm) no intestino delgado foi estimado em bovinos com base na excreção urinária dos derivados de purinas (DP).

$$\text{Nm (g/dia)} = (19,9 + 0,689 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}) - \text{Nitrogênio (N) endógeno}$$

Do N_m , foi descontada a contribuição endógena de N com base no consumo de MS:

N endógeno (g/dia) = 2,8 g de N \times C , sendo C= consumo de MS (kg/dia).

4.5.3.5 Segundo Puchala e Kulasek (1992)

O fluxo de nitrogênio microbiano (N_m) no intestino delgado foi estimado em ovinos com base na excreção urinária de N alantoína.

N alantoína (g/dia) = (alantoína (mmol/dia) \times 4 \times 14)/1000 sendo, 4= número de átomos de N ($C_4H_6N_4O_3$) e 14= peso molecular do N.

$$N_m \text{ (g/dia)} = \text{Exp}(0,830 + 2,089 \times N \text{ alantoína (g/dia)})$$

4.6 Análises estatísticas

Os marcadores foram comparados entre si através de regressão linear simples, utilizando um modelo que incluiu o efeito fixo de ensaio.

O modelo de análise de variância foi:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + bC_{ij} + biC_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Y = variável dependente (fluxo estimado utilizando Derivados)

μ = média geral

E_i = efeito fixo de ensaio

bC_{ij} = coeficiente de regressão linear geral entre os valores de fluxo duodenal estimados utilizando derivados contra os estimados através das purinas

biC_{ij} = coeficiente de regressão linear dentro de cada ensaio

ϵ_{ij} = erro residual

Em cada comparação foi gerado um R^2 que indicou o grau de precisão da relação entre as duas medidas. Foi testado se o intercepto foi diferente de zero e se o coeficiente de regressão foi diferente de 1 utilizando o teste “t”. Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico SAS (2007).

5 RESULTADOS

5.1 Relação entre purinas no duodeno × derivados de purinas na urina.

Na figura 3, estão apresentadas as relações entre os derivados de purinas totais (g/dia) excretados na urina e purinas (g/dia) na digesta duodenal em bovinos (A) e ovinos (B). Nos bovinos, a quantidade diária de derivados de purinas totais (DPT) na urina foi superior à quantidade de purinas totais no duodeno, como esperado, isso decorre por causa da contribuição endógena de derivados de purinas. Porém, nos ovinos as concentrações de purinas foram aproximadamente 40% superiores aos derivados.

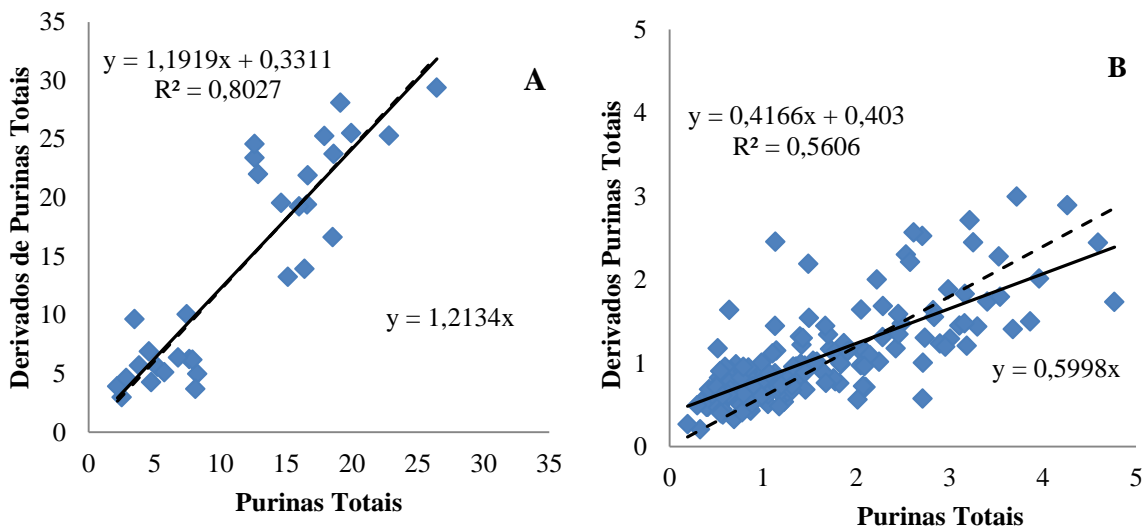


Figura 3 –Relação entre purinas totais no duodeno (g/dia) e derivados de purinas totais na urina (g/dia) em bovinos (A) (n=31, $P < 0,05$) e ovinos (B) (n=176, $P < 0,05$). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

5.2 Relações entre o Nm ruminal estimado por diferentes métodos

Os valores de nitrogênio microbiano estimados pelas purinas no duodeno ou pelos derivados de purinas urinários pelas diferentes equações (CHEN e GOMES, 1992; MOORBY et al., 2006; MA et al., 2013a; MA et al., 2013b) para bovinos foram analisados por regressão e mostraram altas e significativas relações ($P < 0,05$). Esses resultados estão apresentados graficamente nas figuras 4, 5, 6 e 7. Os coeficientes de determinação foram elevados ($R^2 > 0,84$) e os coeficientes de regressão para todas as equações foram estatisticamente iguais a 1 ($P > 0,05$). O intercepto foi igual à zero para todas as equações, exceto quando utilizada a equação de Moorby et al. (2006) (Figura 5). Pode-se observar que o coeficiente de variação médio das estimativas de nitrogênio microbiano ruminal variaram de 19,02 a 29,54. As equações também foram forçadas a passar pela origem a fim de demonstrar o grau de desvio entre as médias (linha tracejada).

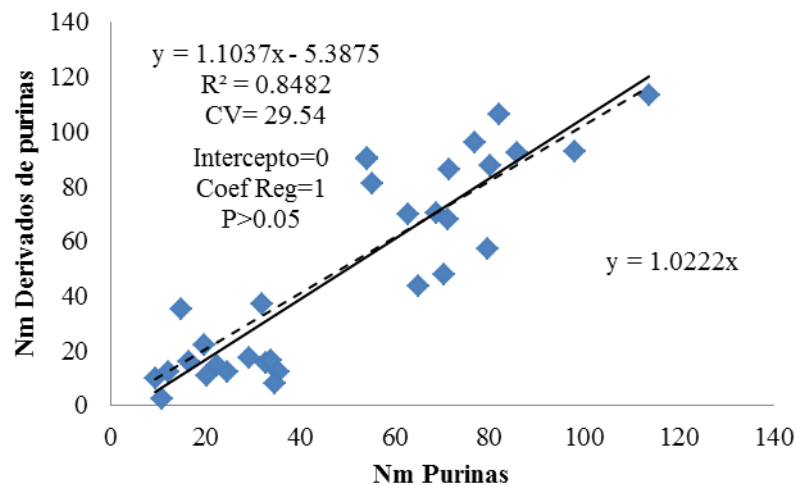


Figura 4 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Chen e Gomes (1992),† em bovinos (n=31, $p < 0,05$). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

† $Y = 0,85X + (0,385 PV^{0,75})$ e $Nm (g/dia) = 70X / (0,116 \times 0,83 \times 1000) = 0,727X$

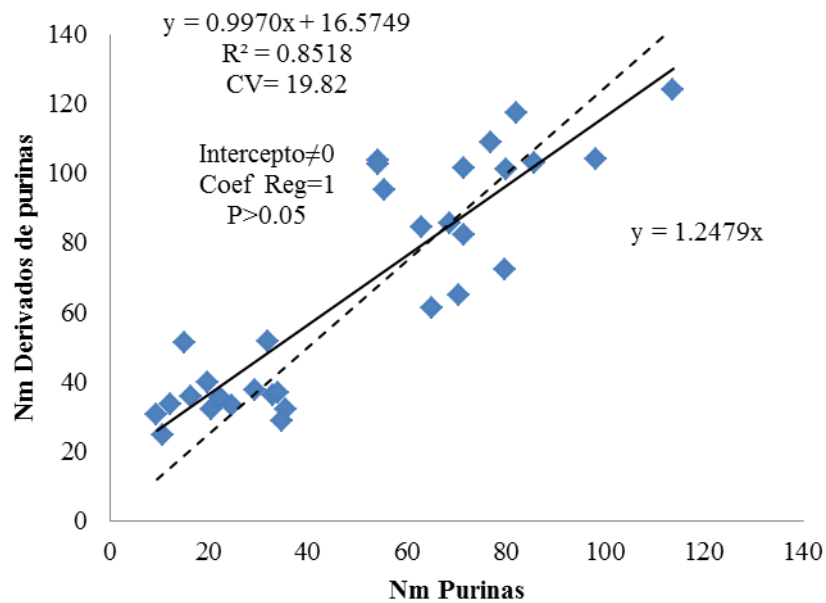


Figura 5– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Moorby et al. (2006),† em bovinos (n=31, p<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger \text{Nm (g/dia)} = 19,9 + 0,689 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

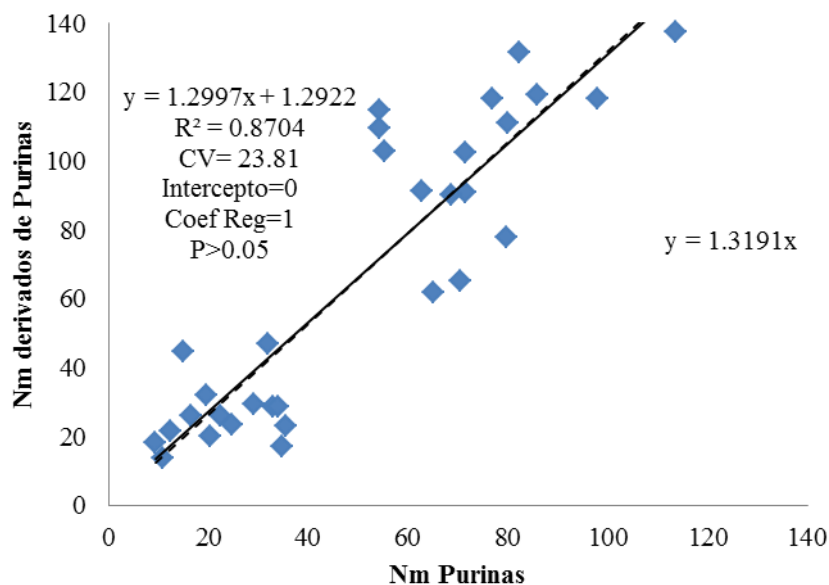


Figura 6 – Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Ma et al. (2013a),† em bovinos (n=31, P<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger \text{Nm (g/dia)} = 0,03 + 0,741 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

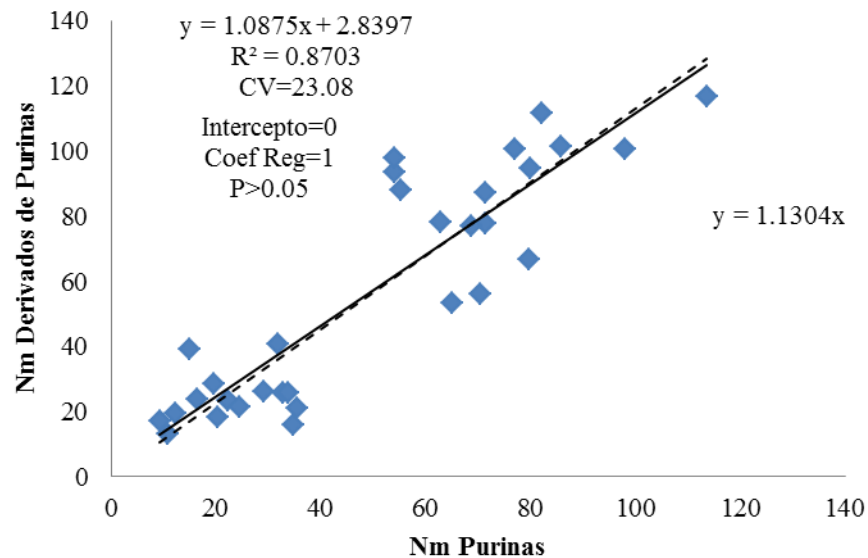


Figura 7– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Ma et al. (2013b),† em bovinos (n=31, $P < 0.05$). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.
 $\dagger Nm \text{ (g/dia)} = 1,787 + 0,620 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$.

Para os ovinos, houve uma menor relação entre nitrogênio microbiano ruminal estimado pelas purinas no duodeno e derivados de purinas utilizando as equações de Chen e Gomes (1992), Puchala e Kulasek (1992), Ma et al. (2013a) e Ma et al. (2013b), apresentadas nas figuras 8, 9, 10 e 11, respectivamente. Os coeficientes de determinação foram baixos, 0,68, 0,51, 0,64 e 0,56 e os coeficientes de variação de 34,35, 35,24, 32,95 e 23,57, respectivamente. Em todas as equações os coeficientes de regressão diferiram de 1 e interceptos diferiram de zero ($P < 0,05$).

A figura 12 mostra em ovinos a relação entre o nitrogênio microbiano estimado por Chen e Gomes (1992) e o nitrogênio microbiano quando estimados pelas outras equações, onde o Nm, estimado por essa equação, apresentou resultados superiores às demais equações. Porém, em todas as estimativas, o Nm estimado pelas purinas no duodeno foi superior ao Nm estimado pelos derivados de purinas em ovinos.

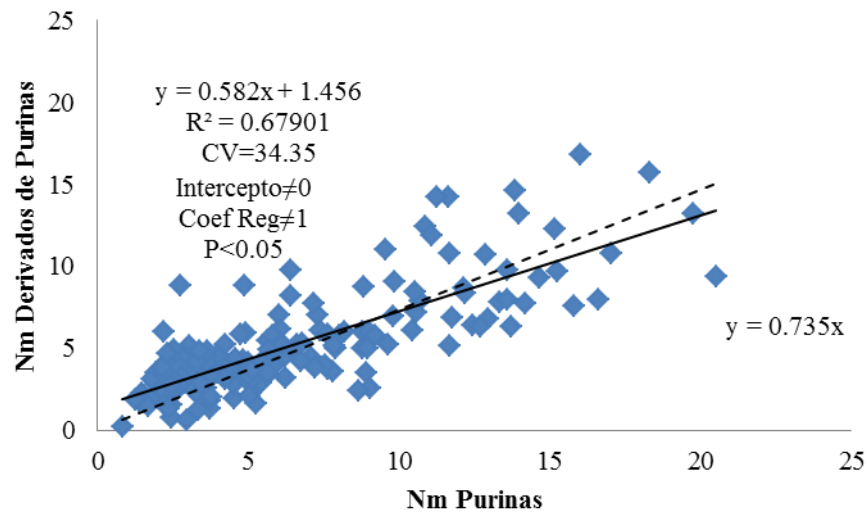


Figura 8– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Chen e Gomes (1992),† em ovinos (n=176, p<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger Y = 0,84X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25X}) \text{ e } Nm \text{ (g/dia)} = 70X / (0,116 \times 0,83 \times 1000) = 0,727X$$

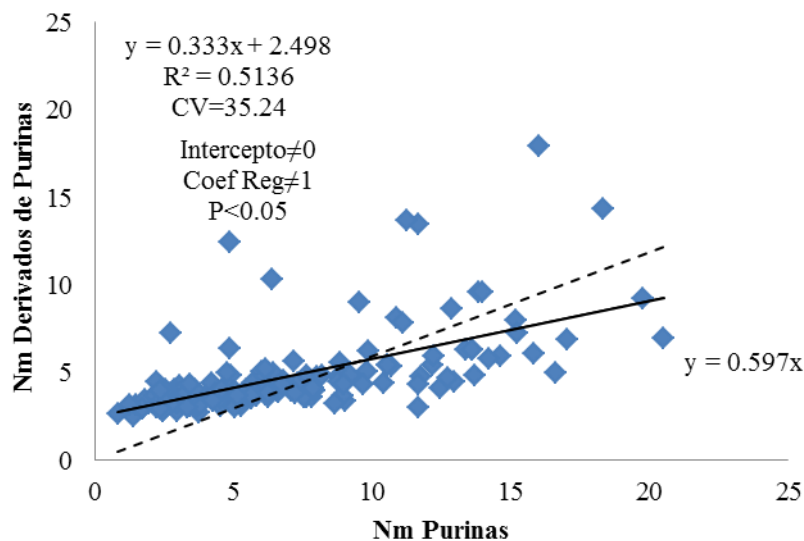


Figura 9– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Puchala e Kulasek (1992),† em ovinos (n=176, P<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger Nm \text{ (g/dia)} = \text{Exp}(0,830 + 2,089 \times *N \text{ alantoína (g/dia)})$$

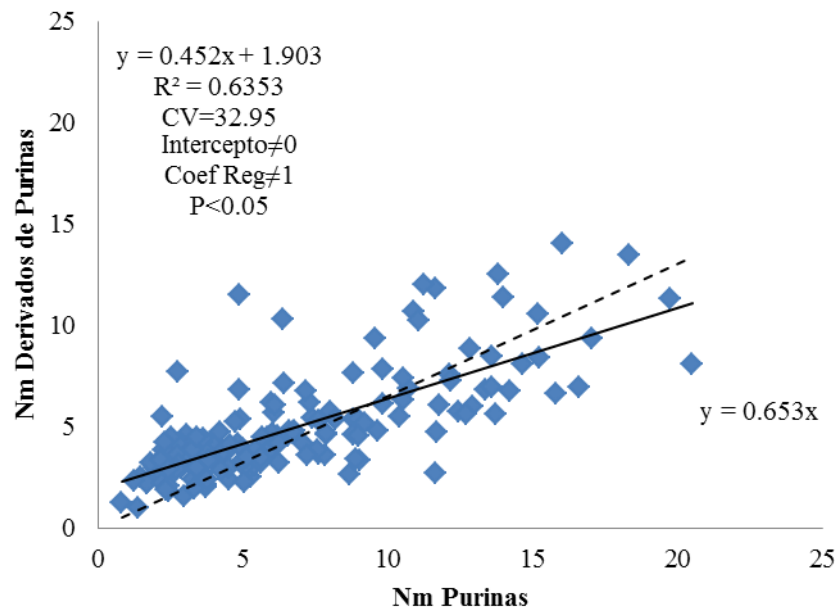


Figura 10– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Ma et al. (2013a),† em ovinos (n=176, p<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger \text{Nm (g/dia)} = 0,03 + 0,741 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

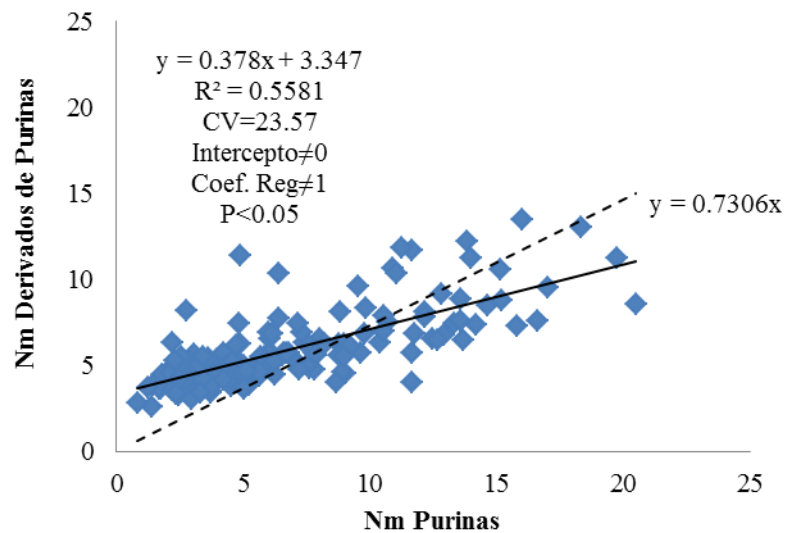


Figura 11– Relação entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimada pelas purinas duodenais e pela excreção de derivados de purinas na urina estimada, segundo Ma et al. (2013b),† em ovinos (n=176, p<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

$$\dagger \text{Nm (g/dia)} = 1,787 + 0,620 \times \text{Derivados de Purinas Totais (mmol/dia)}$$

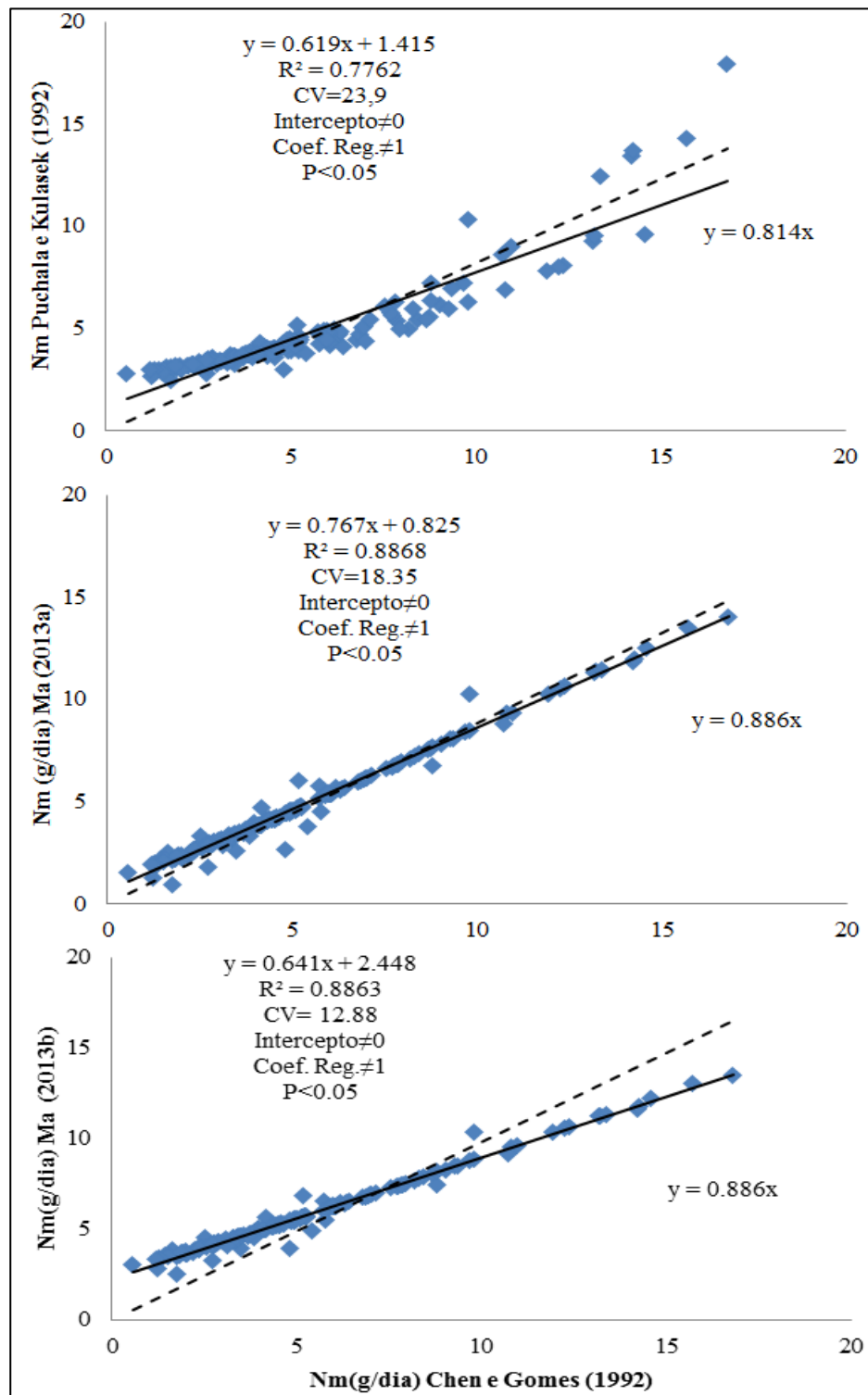


Figura 12 –Relações entre o nitrogênio microbiano (Nm) (g/dia) estimadas pela excreção de derivados de purinas na urina. Comparação do Nm estimado, segundo Chen e Gomes (1992), com outras equações para ovinos (n=176, p<0.05). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

5.2 Eficiência de síntese de proteína microbiana

Nas figuras 13, 14, 15 e 16, estão apresentadas as relações entre o nitrogênio microbiano ruminal (Nm) (g/dia) e o consumo de matéria orgânica digestível (MOD) (kg/dia), bem como a eficiência de síntese de proteína microbiana (PM) estimada pelas purinas duodenais ou pelos derivados de purinas na urina utilizando diferentes equações para bovinos (Figuras 13e 14) e ovinos (Figuras 15 e 16).

Observaram-se relações altamente significativas ($P < 0,05$) entre o Nm estimado pelas purinas ou pelos derivados e a MOD em bovinos. Os coeficientes de determinação e de variação (CV) foram de 0,83 e 24,9 para as purinas e de 0,89 e 24,7; 0,89 e 17,0; 0,92 e 18,4; 0,92 e 17,8, quando estimado pelos derivados de purinas pelas equações de Chen e Gomes (1992), Moorby et al. (2006), Ma et al. (2013a) e Ma et al. (2013b), respectivamente. A eficiência na síntese (ou seja, g de Nm/kg de MOD) foi de aproximadamente 15g de Nm/kg de MOD (94 g de PM/kg de MOD) quando estimada pelas purinas. Quando estimada pelos derivados de purinas, foi de 20, 18, 20 e 24 g de Nm/kg de MOD (125, 113, 125 e 150 g de PM/kg de MOD) conforme as equações de Chen e Gomes (1992), Moorby et al. (2006), Ma et al. (2013a) e Ma et al. (2013b), respectivamente.

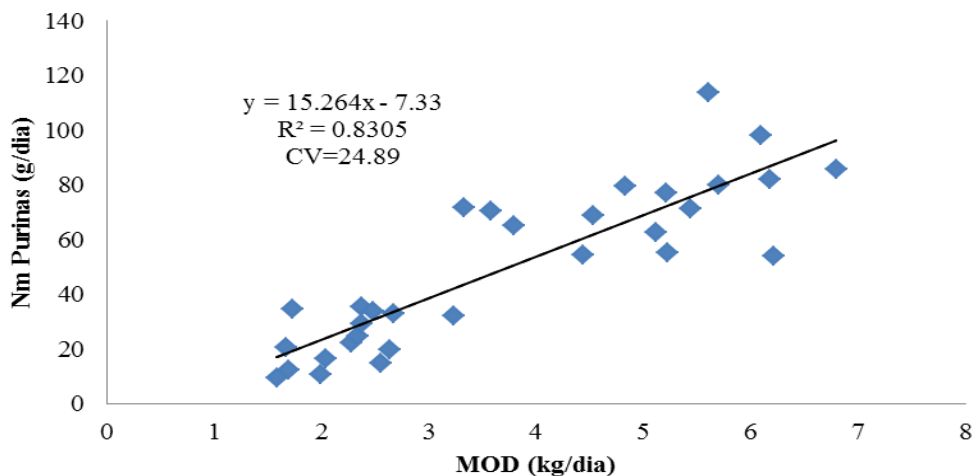


Figura 13– Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimada pelas purinas em bovinos (n=31, $p < 0.05$).

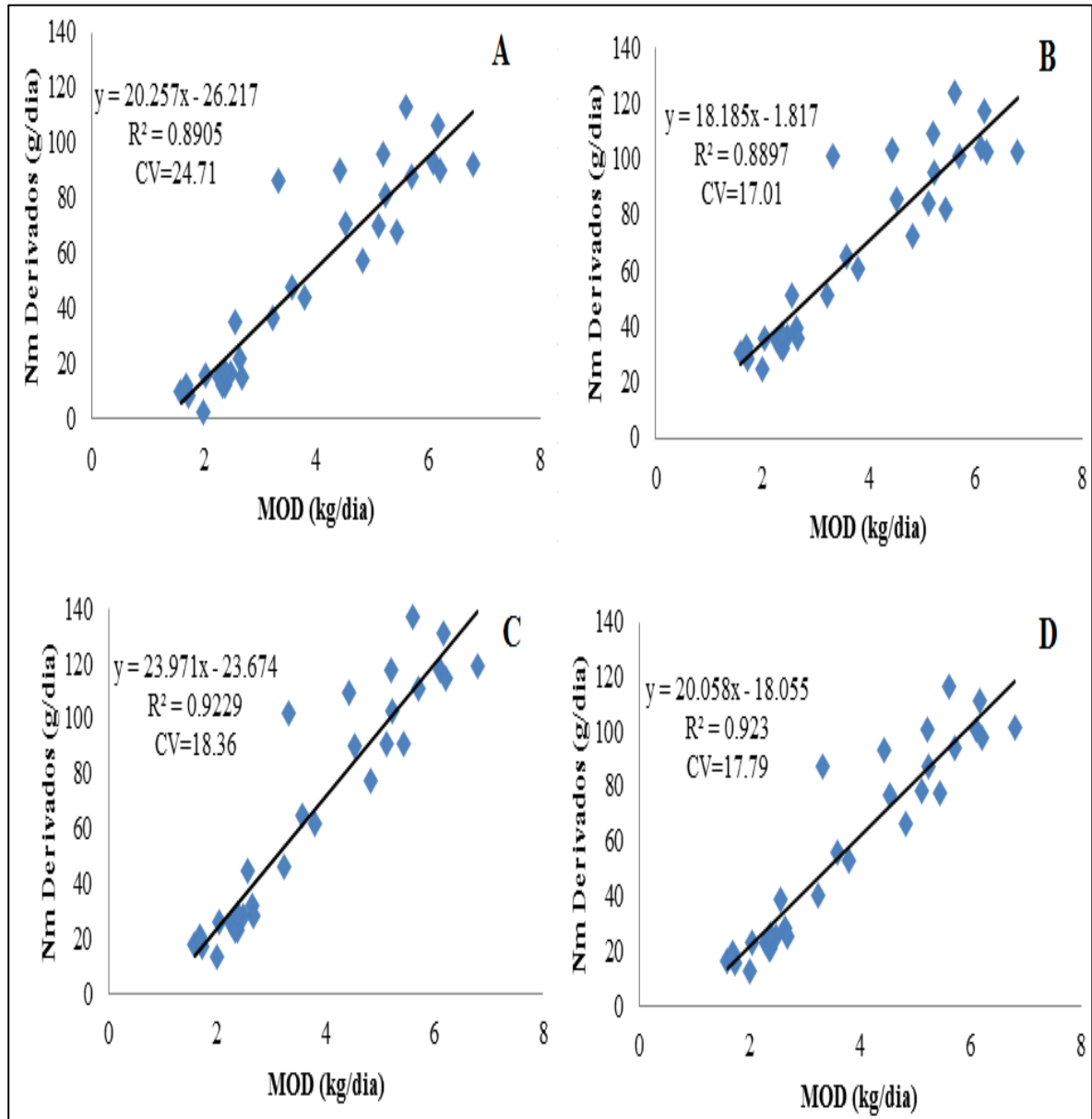


Figura 14– Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimada pelos derivados de purinas urinários em bovinos (n=31, $p < 0.05$). As letras correspondem a cada metodologia utilizada na estimativa do Nm.

A: Chen e Gomes, (1992); $Y = 0,85X + (0,385 PV^{0,75})$ e $Nm \text{ (g/dia)} = 70X / (0,116 \times 0,83 \times 1000) = 0,727X$

B: Moorby et al. (2006), $(Nm \text{ (g/dia)} = 19,9 + 0,689 \times DPT \text{ (mmol/dia)})$;

C: Ma et al. (2013), $(Nm \text{ (g/dia)} = 0,03 + 0,741 \times DPT \text{ (mmol/dia)})$;

D: Ma et al. (2013), $(Nm \text{ (g/dia)} = 1,787 + 0,620 \times DPT \text{ (mmol/dia)})$.

Para ovinos, as purinas demonstraram melhores resultados de eficiência de síntese de proteína microbiana e uma relação mais estreita entre Nm e MOD quando comparada aos derivados. O Nm estimado pelas purinas ou pelos derivados mostrou uma relação significativa com a MOD ($P < 0.05$). Quando estimado pelas purinas (Figura 15), a relação apresentou um $R^2 = 0,64$ e eficiência de 14,4 g de Nm/kg de MOD (90 g de PM/kg de MOD). Todavia, quando estimados pelos derivados (Figura 16), os resultados foram abaixo do esperado para todas as equações. As equações utilizando derivados para estimativa de Nm que mais se assemelharam às purinas foram a de Chen e Gomes (1992) ($R^2 = 0,55$ e eficiência de 10,9 g de Nm/kg de MOD ou 68,1 g de PM/kg de MOD e $CV = 41,78$) e Ma et al. (2013a) ($R^2 = 0,55$ e eficiência de 9,0 g de Nm/kg de MOD ou 56,3 g de PM/kg de MOD e $CV = 36,5$).

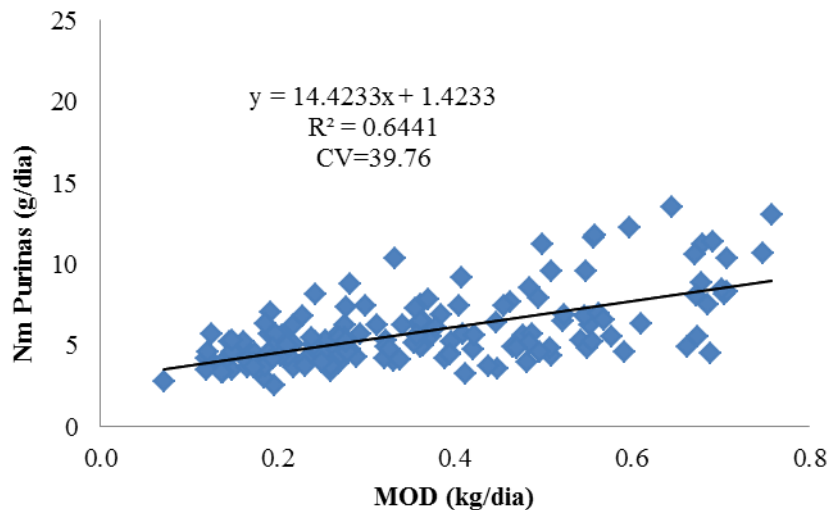


Figura 15– Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimada pelas purinas em ovinos ($n = 176$, $P < 0.05$).

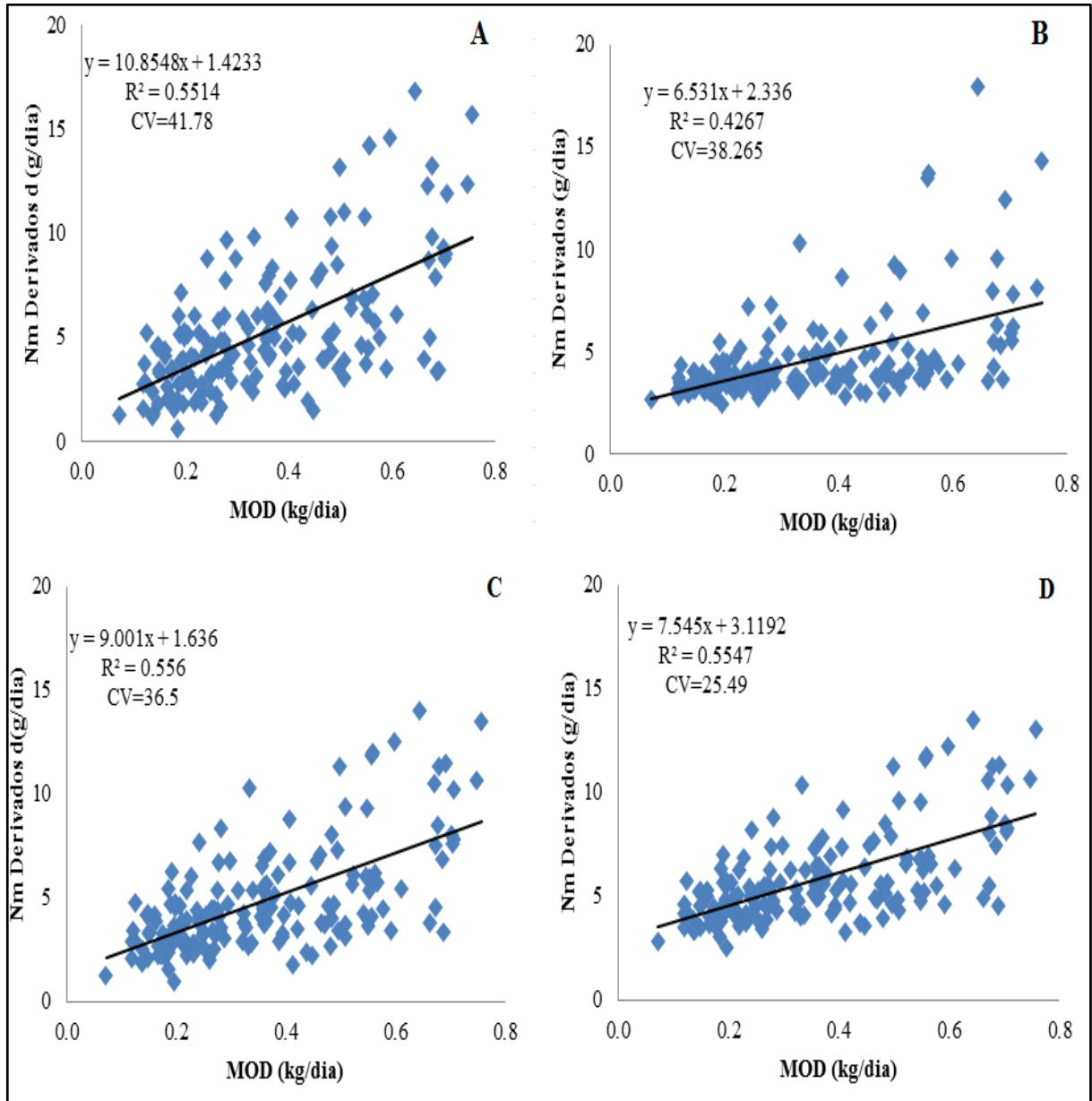


Figura 16– Relação entre consumo de matéria orgânica digestível (kg/dia) e nitrogênio microbiano (g/dia) estimada pelos derivados de purinas urinários em ovinos (n=176, P<0.05). As letras correspondem a cada metodologia utilizada na estimativa do Nm.

A: Chen e Gomes, (1992); $Y=0,84X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25X})$ e $Nm (g/dia) = 70X/(0,116 \times 0,83 \times 1000) = 0,727X$

B: Puchala e Kulasek (1992) ($Nm (g/dia) = \text{Exp}(0,830 + 2,089 \times N \text{ alantoína } (g/dia))$);

C: Ma et al. (2013) ($Nm (g/dia) = 0,03 + 0,741 \times DPT (mmol/dia)$);

D: Ma et al. (2013) ($Nm (g/dia) = 1,787 + 0,620 \times DPT (mmol/dia)$).

6 DISCUSSÃO

A proteína microbiana ruminal pode ser estimada a partir da quantidade de derivados de purinas excretados na urina em bovinos, porém nos ovinos vimos que as medidas são subestimadas.

A relação entre a quantidade de purinas microbianas que chegam no duodeno e a quantidade de derivados de purinas excretados na urina diferiu entre as duas espécies (Figura 3). Chen e Ørskov (2004) afirmam que isso pode ocorrer pela diferença no metabolismo das purinas entre as espécies e raças nos ruminantes.

Para os bovinos a quantidade de derivados de purinas no duodeno foi superior a quantidade de derivados purinas no urina. Esse resultado foi o esperado, pela contribuição endógena de derivados de purinas de origem endógena (BALCELLS et al., 1991). A partir desse resultados foi observada alta e significativa relação ($P < 0,05$ e $R^2 > 0,84$) entre o nitrogênio microbiano estimado pelas purinas e pelos derivados de purinas em bovinos, independente da equação utilizada no estudo para realizar as estimativas.

Outro parâmetro utilizado para avaliar os marcadores foi a eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal. O sistema nutricional CNCPS (*Cornell Net Carbohydrate and Protein System*) propõe uma eficiência de síntese de proteína microbiana de 80 a 130 g de PM/kg de MOD (12,8 a 20,8 g de Nm/kg de MOD) para ruminantes e o ARC (1984) propõe uma eficiência microbiana média de 32 g de Nm/kg de MO degradável no rúmen.

A eficiência de síntese microbiana dos bovinos ficou dentro da faixa esperado se comparado com os sistemas nutricionais, variando de 15 a 23 g de Nm/kg de MOD consumida, independente do método e da forma de cálculo utilizados. Esta eficiência é semelhante aos dados obtidos por Van Vuuren et al. (1993) que encontraram valores de 19 g de Nm/kg de MOD consumida por bovinos leiteiros e inferior a Veth e Kolver (2001), que encontraram valores de eficiência de síntese microbiana em bovinos leiteiros próximos a 29 g de Nm/kg de MOD consumida.

Na espécie ovina, a quantidade de derivados de purinas na urina foi em torno de 40 % inferior a quantidade de purina no duodeno. Isso mostra que parte das purinas que foram absorvidas no duodeno, parte delas foram recuperadas ou excretadas em outras vias, que não a renal. Essa variação na recuperação esta relacionado com o consumo de MO da dieta e resultados encontrados na literatura apontam que 7 a 22% das purinas absorvidas seguem

outras vias, que não a urinária (Chen et al., 1990, Balcells et al., 1991; Perez et al., 1996). Kahn e Nolan (2000) observaram que a principal via de não renal dos derivados foi o rúmen, via saliva ou excreção transepitélial. No rúmen os derivados são degradados, não sendo reabsorvidos. Outra via, seria a utilização dos derivados para síntese de ácidos nucleicos nos tecidos.

A baixa recuperação das purinas na urina interferiu diretamente nas estimativas de síntese de proteína microbiana, bem como na eficiência da síntese utilizando os derivados de purinas urinários. Nos Ovinos, utilizando derivados como marcador, a equação de Chen e Gomes (1992), para estimativa de nitrogênio microbiano, foi a que demonstrou melhor relação com Nm estimado pelas purinas ($R^2=0,68$). A eficiência de síntese microbiana, a partir das purinas, foi de 14 g de Nm/kg de MOD consumida. Independentemente da equação utilizada para o cálculo, sempre que foram utilizados os derivados de purinas, a eficiência foi inferior às purinas.

Perez et al. (1996) compararam o nitrogênio microbiano estimado pelas purinas ou alantoína como marcador e não encontraram diferenças significativas entre os marcadores. No entanto, os resultados com as purinas foram superiores. González-Ronquillo et al. (2004) encontraram valores mais altos para síntese microbiana estimada pelos derivados de purinas em comparação às purinas.

Outra hipótese seria que nos ovinos poderia ter ocorrido influência da dieta, pois para os bovinos os dois ensaios a dieta era composta por concentrado, e nos ovinos apenas um ensaio a dieta era de 100% de forragem. A partir disso, buscou-se verificar se problema de baixa recuperação das purinas na urina, era influenciada pelo metabolismo da espécie ou pela dieta ter ou não concentrado. Na figura 17 esta representada a relação entre a quantidade de purinas no duodeno diária (g/dia) e a quantidade de derivados de purinas excretados na urina (g/dia) no ensaio 2 (tabela 1) com ovinos que receberam concentrados na dieta. Foi observado que a quando analisando o ensaio com os ovinos que recebeu concentrado na dieta a quantidade de purinas continuou superior aos derivados de purinas excretados na urina (em torno de 33% superior). Esse resultado leva a cremos que a problemática da utilização dos derivados de purinas urinários comparados com as purinas no duodeno como marcadores de síntese de proteína microbiana, esta relacionado ao metabolismo pós absorção das purinas e conhecimento das diferentes vias de excreção dos produtos do seu metabolismo (derivados de purinas), de que relacionados a adição ou não de concentrados na dieta.

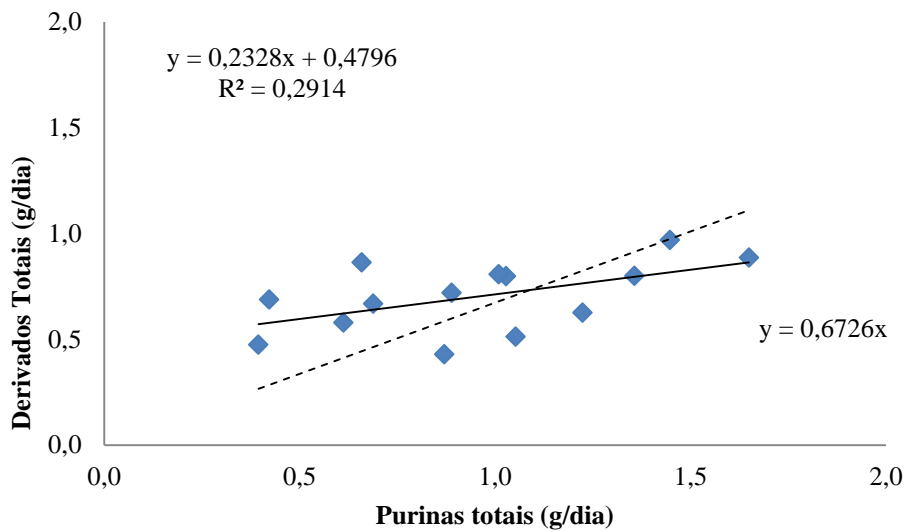


Figura 17– Relação entre purinas totais no duodeno (g/dia) e derivados de purinas totais na urina (g/dia) em ovinos que receberam concentrado na dieta (ensaio 2 n=15, $P < 0,05$). A linha tracejada representa o resultado da regressão cujo intercepto foi forçado à origem.

As informações necessárias para a definição da equação que utiliza derivados de purinas como marcador, principalmente nos ovinos, talvez, necessitem ser revistas. Chen e Ørskovv (2004); Serrano et al., (2011) apontam alguns pontos onde a necessidade de ser aprofundado estudos, como: Verificar quanto das purinas que chegam ao duodeno, realmente, são absorvidas; Examinar quais são as relações entre a taxa de absorção de purinas, a partir do intestino, e a taxa de excreção de derivados de purinas na urina; Investigar qual a contribuição da excreção de purinas do metabolismo basal (purinas endogenamente produzidas) para a excreção total de derivados de purinas; Detalhar a rota metabólica das purinas nos tecidos (intestino, sangue, fígado e rins) e enzimas envolvidas.

Estes e outros aspectos precisam ser estudados para fornecer dados confiáveis para um modelo que irá gerar equações de predição específicas para cada raça ou espécie animal (CHEN e ØRSKOV, 2004). De modo geral, na literatura, encontramos, por diversas vezes, autores, que têm alguma desconfiança com certas relações estabelecidas (SERRANO et al., 2011), quando se: assume-se que a digestibilidade das purinas microbianas é de 85% e esta é tomada como o valor médio de digestibilidade para os ácidos nucleicos microbianos baseados em observações relatadas na literatura; também, a relação N-purinas: N-total dos microrganismos do rúmen é de 11,6:100, considerando-se que o teor de N das purinas é de 70 mg de N/mmol. Essa relação N-purina: N-total pode necessitar ser redefinida para diferentes

estados de alimentação ou diferentes espécies animais a fim de melhorar a precisão do cálculo (CHEN e ØRSKOV, 2004).

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que, em bovinos, o nitrogênio microbiano pode ser estimado a partir dos derivados de purinas urinários utilizando qualquer uma das equações testadas neste estudo. No entanto, em ovinos, os derivados de purinas subestimam o nitrogênio microbiano quando comparado ao método das purinas no duodeno.

Esse estudo indica a necessidade de mais investigações relacionada ao metabolismo das purinas, principalmente em ovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 1984.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16th, 3.ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 1997.

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. **J. Agric. Sci. Camb.**, v.116, p.309-317, 1991.

BRODERICK, G.; MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Jornal of Dairy Science**, v.75, p. 2628-2632, 1992.

CARRO M.D. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos. **Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim**, v. 16, n. 1, 2001.

CHEN, X. B.; CHEN, Y. K.; FRANKLIN, M. F.; et al., The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. **Jornal of Animal Science**, v. 70, p.1534-1542, 1992.

CHEN, X. B.; DEB. HOVELL, F. D.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants : recycling of allantoin into the rumen via saliva and its fate in the gut. **British Journal of Nutrition**, v.63, p.197-205, 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 the technical details. **International Feed Resources Unit Rowett Research Institute**, Bucksburn Aberdeen, UK, p.22, 1992.

CHEN, X.B.; SAMARAWEERA, L.; ORSKOV, E.R.; et al. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine oxidase activity in buffaloes, with special reference to differences between buffaloes and Bos taunts cattle. **Brit. J. Nutr**, v.75, p.397-407, 1996.

CHEN, X. B.; ØRSKOV, E. R.; Research on urinary excretion of purine derivatives in ruminants: past, present and future. In **Estimation of microbial protein supply**

in ruminants using urinary purine derivative (ed. H. P. S. Makkar and X. B. Chen). FAO/IAEA, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.180-210, 2004.

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

DEHORITY B.A. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. In: **Proceedings of the International Symposium on the Nutrition Requirements of Ruminants**, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa, p.121-137, 1995.

GONZÁLES-ROQUILLO, M.; BALCELLS, J.; BELEGUER, A. Comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**.v.87, p.2211–2221, 2004.

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

KAHN e NOLAN. Kinetics of allantoin metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.629- 634, 2000.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**, 3ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, p. 214, 2011.

LAURENT, F.; VIGNON, B. Factors of variations in urinary excretion of allantoin in sheep and goats. **Archiv fur Tierernahrung**, p.671-681, 1983.

LENINGHER, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2ed. São Paulo: Savier, p.839, 1995.

MA, T.; KAIKONG, D.; CHENGGANG, J; et al. The relationship between microbial N synthesis and urinary excretion of purine derivatives in Dorper × thin-tailed Han crossbred sheep. **Small Ruminant Research**, 2013.

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

MARTIN-ORUE, S. M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; et al. Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedure. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.85, p.171-188, 2000.

MCALLAN, A.B. The fate of nucleic acids in ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.41, p.309-316, 1982.

MCALLAN, A.B. SMITH, R.H. Determination of nucleic acids in digesta. **British Journal of Nutrition**, v. 23, p. 671- 683, 1969.

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

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

MOORBY, J. M.; DEWHURST, R. J.; EVANS, R. T.; et al. Effects of Dairy Cow Diet Forage Proportion on Duodenal Nutrient Supply and Urinary Purine Derivative Excretion. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3552–3562, 2006.

OBISPO, N. E. and DEHORITY, B. A. Feasibility of Using Total Purines as a Marker for Ruminant Bacteria. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 3084–3095, 1999

ORELLANA BOERO, P., BALCELLS, J. MARIN-ORUE, S. M. et al., Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**. V. 68, p. 243–250, 2001.

PEREZ, J. F.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; et al. Determination of rumen microbial nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using N^{15} and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p.699-709, 1996.

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

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

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

SAS.Institute Inc. SAS Language Reference. Version 9.2. Cary, NC: **SAS institute**, 2007.

SCHNIFFEN C.J.; ROBINSON P.H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulation. **Jornal Dairy Science**, v. 70, p. 425-441, 1987.

SENGER, C. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p.169, 2008.

STANGASSINGER, M.; CHEN, X. B.; LINDBERG, J. E.; et al. Metabolism of purines in relation to microbial production. In: Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. **Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology**. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, p.387-406, 1995.

SERRANO, C.; DAVID, R.; SIERRA, P.; et al. Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review. **Rev. CES Med. Vet. y Zoot.** Colombia, v.6, p.46-53, 2011.

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

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

VALADARES FILHO S.C. Eficiência da síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. In: Simpósio Internacional sobre exigências nutricionais de ruminantes, Viçosa. **Anais...**, p.355-388, 1995.

VAN VUUREN, M.; VAN DER KOELEN, C. J.; VROONS-DE BRUIN, J. Ryegrass versus Corn Starch or Beet Pulp Fiber Diet Effects on Digestion and Intestinal Amino Acids in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v.76, n. 9, p. 2692-2700, 1993.

VETH, M. J.; KOLVER, E. S. Digestion of Ryegrass Pasture in Response to Change in pH in Continuous Culture. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 84, n. 6, p. 1449-1457, 2001.

WALKER, D. M.; FAICHNEY, G. J. Nitrogen balance studies with the milk-fed lamb: The partition of urinary nitrogen and sulphur. **Brit. J. Nutr.** v.18, p.201-207, 1964.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Entrada de dados para análise estatística do capítulo I. E= ensaio(1 a 8 para ovinos e 9 e 10 para bovinos) A= animal, P= período, PV= peso vivo médio, CMS= consumo de matéria seca, MSF= excreção de MS fecal , FDFDA= fluxo de MS duodenal pelo marcador FDA,FDFDAc=fluxo de MS duodenal pelo marcador FDA com cinzas, FDLDA= fluxo de MS duodenal pelo marcador LDA, DigT= digestibilidade total, DRFDA= digestibilidade ruminal estimado pelo marcador FDA , DRFDAc= digestibilidade ruminal estimado pelo marcador FDA com cinzas, DRLDA= digestibilidade ruminal estimado pelo marcador LDA

E	A	P	PV (Kg)	CMS (g/dia)	MSF (g/dia)	FDFDA (g/dia)	FDFDA c (g/dia)	FDLDA (g/dia)	DigT (%)	DRFDA (%)	DRFDA c (%)	DRLDA (%)
1	1	1	32	874	268	327	334	380	69	63	62	56
1	2	1	35	635	226	337	321	294	64	47	49	54
1	6	1	37	1259	427	583	579	781	66	54	54	38
1	7	1	33	958	351	508	473	575	63	47	51	40
1	8	1	38	1137	472	594	627	613	59	48	45	46
1	18	1	31	775	259	280	306	449	67	64	60	42
1	20	1	34	1138	353	459	443	566	69	60	61	50
1	1	2	33	951	349	387	393	559	63	59	59	41
1	2	2	36	751	300	366	354	507	60	51	53	33
1	6	2	40	1243	470	570	552	742	62	54	56	40
1	7	2	32	1184	428	492	471	682	64	58	60	42
1	18	2	33	963	327	411	381	648	66	57	60	33
1	1	3	32	919	307	330	327	400	67	64	64	56
1	2	3	35	767	302	353	375	450	61	54	51	41
1	6	3	39	1219	452	475	520	552	63	61	57	55
1	7	3	35	1022	428	658	664	653	58	36	35	36
1	8	3	41	1088	462	659	664	595	58	39	39	45
1	18	3	32	1061	343	395	393	551	68	63	63	48
1	20	3	34	987	397	576	544	879	60	42	45	11
1	1	4	34	936	319	376	359	410	66	60	62	56
1	2	4	36	575	235	264	252	449	59	54	56	22
1	6	4	41	1062	378	516	495	444	64	51	53	58
1	7	4	38	918	333	499	484	658	64	46	47	28
1	8	4	44	1177	428	557	578	816	64	53	51	31
1	20	4	37	867	326	397	428	492	62	54	51	43
2	1	1	35	1013	423	532	546	817	58	48	46	19
2	2	1	37	972	461	556	537	672	53	43	45	31
2	6	1	44	1094	574	702	693	687	48	36	37	37
2	8	1	46	1336	634	821	810	1079	53	39	39	19
2	2	2	39	1113	470	595	591	615	58	47	47	45
2	6	2	44	1466	774	981	1017	1093	47	33	31	25
2	8	2	47	1390	653	694	703	667	53	50	49	52
2	20	2	40	915	352	461	477	552	62	50	48	40
2	2	3	39	982	391	483	506	673	60	51	48	31
2	6	3	45	1423	585	778	721	657	59	45	49	54
2	8	3	46	1223	471	722	744	835	61	41	39	32
2	20	3	39	1308	559	719	688	569	57	45	47	57
2	2	4	40	1381	628	681	673	901	55	51	51	35
2	6	4	46	1232	459	563	571	955	63	54	54	22

Continuação do apêndice A.....

2	8	4	43	1543	712	959	956	1025	54	38	38	34
2	20	4	40	1289	513	540	528	550	60	58	59	57
3	202	1	28	813	271	457	451	432	67	44	44	47
3	203	1	30	826	272	542	510	608	67	34	38	26
3	205	1	24	723	252	424	429	516	65	41	41	29
3	214	1	31	668	210	389	432	512	69	42	35	23
3	224	1	32	1178	416	556	691	851	65	53	41	28
3	227	1	24	621	194	323	339	338	69	48	45	46
3	231	1	29	826	258	384	413	477	69	54	50	42
3	202	2	28	649	222	418	421	570	66	36	35	12
3	203	2	31	694	258	431	427	480	63	38	39	31
3	205	2	25	802	267	523	511	690	67	35	36	14
3	209	2	23	626	220	307	345	499	65	51	45	20
3	214	2	26	628	217	353	416	500	65	44	34	20
3	224	2	32	1063	383	478	654	882	64	55	38	17
3	227	2	22	584	182	298	306	313	69	49	48	46
3	231	2	32	763	246	334	352	364	68	56	54	52
3	202	3	28	1055	325	475	471	671	69	55	55	36
3	203	3	32	847	281	414	459	363	67	51	46	57
3	205	3	28	844	294	750	762	574	65	11	10	32
3	209	3	24	629	159	267	259	159	75	58	59	75
3	227	3	23	616	182	337	328	447	70	45	47	27
3	231	3	32	617	174	354	369	368	72	43	40	40
3	202	4	33	1200	343	634	629	756	71	47	48	37
3	203	4	33	949	268	568	537	727	72	40	43	23
3	205	4	30	955	253	339	314	240	74	65	67	75
3	209	4	22	651	197	356	334	317	70	45	49	51
3	214	4	25	391	108	191	181	223	72	51	54	43
3	224	4	38	1413	407	600	622	615	71	58	56	57
3	227	4	25	410	106	145	146	124	74	65	64	70
4	3	1	20	501	70	146	138	135	86	71	72	73
4	1	1	22	222	51	105	99	93	77	53	55	58
4	1	2	18	745	195	300	256	210	74	60	66	72
4	3	2	21	390	85	181	127	165	78	54	67	58
4	4	3	22	815	190	233	221	160	77	71	73	80
4	1	3	21	280	66	68	81	60	76	76	71	79
4	2	3	18	321	83	125	117	87	74	61	64	73
4	3	3	20	446	121	176	192	176	73	61	57	60
4	2	4	20	794	219	314	332	326	72	60	58	59
4	4	4	22	496	137	186	198	219	72	62	60	56
4	3	4	21	453	155	223	230	205	66	51	49	55
4	1	4	18	486	111	196	195	166	77	60	60	66
4	8	1	28	891	195	375	366	406	78	58	59	54
4	5	2	24	820	207	368	348	347	75	55	58	58
4	7	2	25	446	97	147	145	138	78	67	67	69
4	8	2	28	625	174	392	341	252	72	37	45	60
4	6	3	29	892	270	442	427	308	70	50	52	65
4	7	3	25	408	109	131	133	112	73	68	67	72
4	8	3	28	603	130	178	178	146	79	71	70	76

Continuação do apêndice A.....

4	5	3	24	646	206	364	364	280	68	44	44	57
4	7	4	25	926	81	138	122	110	91	85	87	88
4	8	4	28	303	90	122	112	96	70	60	63	68
4	5	4	24	347	127	201	183	141	63	42	47	59
4	6	4	29	515	164	273	248	208	68	47	52	60
5	4	1	26	294	156	188	219	207	47	36	26	30
5	1	1	23	315	135	162	182	135	57	49	42	57
5	2	1	26	474	201	167	176	207	58	65	63	56
5	3	1	31	707	279	234	349	286	61	67	51	60
5	1	2	23	693	181	203	256	187	74	71	63	73
5	2	2	26	406	160	164	177	157	61	59	56	61
5	3	2	31	645	203	222	304	232	69	66	53	64
5	4	2	26	555	170	187	217	198	69	66	61	64
5	2	3	26	677	288	345	380	357	57	49	44	47
5	3	3	31	412	213	227	256	275	48	45	38	33
5	4	3	26	381	188	208	227	195	51	45	40	49
5	1	3	23	408	172	165	169	217	58	60	59	47
5	3	4	31	784	412	450	470	447	47	43	40	43
5	4	4	26	371	190	206	205	202	49	44	45	45
5	1	4	23	445	207	219	223	285	53	51	50	36
5	2	4	26	582	289	337	350	304	50	42	40	48
6	1	1	33	535	134	330	168	152	76	41	70	73
6	2	1	33	647	138	376	453	331	78	40	28	47
6	1	2	33	520	114	329	264	267	78	37	49	49
6	2	2	33	246	119	413	387	324	81	35	39	49
6	3	2	28	498	102	251	229	180	79	48	52	63
6	4	2	33	337	166	362	344	343	72	39	42	42
6	1	3	33	733	209	377	324	254	71	49	56	65
6	2	3	33	504	164	332	286	294	67	34	43	42
6	3	3	28	801	190	225	195	196	76	72	76	76
6	4	3	33	879	235	554	544	602	73	37	38	31
6	1	4	33	569	183	414	382	436	68	27	33	23
6	2	4	33	513	197	339	323	308	62	34	37	40
6	3	4	28	565	203	331	306	373	64	42	46	34
6	4	4	33	823	190	351	360	389	77	57	56	53
7	2	1	30	661	119	150	130	166	82	77	80	75
7	3	1	34	570	190	238	228	198	67	58	60	65
7	7	1	28	836	252	455	427	395	70	46	49	53
7	8	1	34	652	125	250	256	276	81	62	61	58
7	2	2	30	963	161	313	291	292	83	68	70	70
7	3	2	34	331	82	93	89	87	75	72	73	74
7	7	2	28	660	179	184	204	189	73	72	69	71
7	8	2	34	530	76	109	121	103	86	79	77	81
7	2	3	30	641	212	328	289	258	67	49	55	60
7	3	3	34	648	200	319	337	269	69	51	48	59
7	7	3	28	526	263	276	261	384	50	48	50	27
7	8	3	34	404	155	253	199	200	62	37	51	50
7	2	4	30	506	138	216	202	187	73	57	60	63
7	7	4	28	802	320	466	477	415	60	42	41	48

Continuação do apêndice A.....

7	8	4	34	366	165	206	291	324	55	44	21	12
8	9	1	27	611	179	352	302	232	71	42	51	62
8	10	1	30	385	170	213	206	218	56	45	46	43
8	11	1	29	336	170	261	258	233	49	22	23	31
8	15	1	36	335	124	171	204	224	63	49	39	33
8	16	1	35	284	70	174	159	161	75	39	44	43
8	17	1	27	665	151	318	318	347	77	52	52	48
8	21	1	16	483	228	267	277	253	53	45	43	48
8	37	1	25	447	135	219	179	206	70	51	60	54
8	10	2	27	237	103	132	128	120	56	44	46	49
8	11	2	29	662	294	407	364	336	56	39	45	49
8	15	2	31	513	162	195	185	180	68	62	64	65
8	16	2	29	603	130	141	147	139	78	77	76	77
8	17	2	26	476	93	170	139	130	81	64	71	73
8	21	2	20	284	125	160	157	170	56	44	45	40
8	37	2	28	368	111	282	199	183	70	24	46	50
8	9	3	31	393	205	275	216	209	48	30	45	47
8	10	3	25	361	157	189	215	216	57	48	41	40
8	11	3	31	711	310	397	418	387	56	44	41	46
8	15	3	30	512	200	223	249	243	61	57	51	53
8	16	3	31	205	44	77	59	50	78	62	71	76
8	17	3	24	259	64	109	89	72	75	58	66	72
8	21	3	20	128	49	77	67	68	62	40	48	47
8	36	3	36	222	57	125	105	101	74	44	53	55
8	37	3	26	225	61	93	96	85	73	59	57	62
8	9	4	26	493	145	182	168	172	71	63	66	65
8	10	4	24	557	224	248	243	248	60	55	56	55
8	11	4	30	666	281	325	317	287	58	51	52	57
8	15	4	32	146	51	88	85	72	65	40	42	51
8	16	4	29	480	137	213	178	150	71	56	63	69
8	17	4	16	248	74	126	143	112	70	49	42	55
8	21	4	17	460	187	203	218	201	59	56	53	56
8	35	4	29	606	241	340	303	281	60	44	50	54
8	36	4	30	318	80	143	150	167	75	55	53	47
8	37	4	26	377	138	291	245	242	63	23	35	36
8	10	5	24	476	145	208	178	177	70	56	63	63
8	15	5	28	275	56	91	122	119	80	67	55	57
8	16	5	28	379	172	227	222	224	55	40	41	41
8	21	5	17	419	107	160	199	193	75	62	52	54
8	35	5	29	538	239	262	278	275	55	51	48	49
8	36	5	27	305	149	215	217	224	51	30	29	27
8	121	5	17	336	115	178	204	159	66	47	39	53
8	135	5	26	447	190	222	227	199	57	50	49	55
8	136	5	25	354	137	208	208	214	61	41	41	39
8	10	6	23	277	72	63	95	79	74	77	66	71
8	11	6	27	233	52	105	83	67	77	55	64	71
8	15	6	26	183	51	87	81	80	72	52	56	57
8	16	6	28	577	212	249	230	237	63	57	60	59
8	21	6	18	324	101	134	128	133	69	59	61	59

Continuação do apêndice A.....

8	35	6	29	639	267	322	319	278	58	50	50	57
8	121	6	19	383	140	216	261	273	63	44	32	29
8	135	6	26	416	161	201	199	179	61	52	52	57
8	10	7	24	517	228	212	232	266	56	59	55	49
8	11	7	28	609	230	345	427	402	62	43	30	34
8	15	7	24	199	72	174	98	103	64	12	51	48
8	21	7	18	273	108	135	215	165	61	51	22	39
8	35	7	26	383	140	182	163	184	64	53	57	52
8	36	7	28	516	220	294	243	224	57	43	53	56
8	121	7	19	435	125	177	249	195	71	59	43	55
8	135	7	26	413	165	203	196	173	60	51	53	58
8	10	8	22	347	163	143	235	209	53	59	32	40
8	11	8	26	504	191	208	199	257	62	59	60	49
8	21	8	14	308	177	177	277	280	43	42	10	9
8	35	8	28	226	74	113	118	102	67	50	48	55
8	36	8	28	487	217	368	267	258	56	25	45	47
8	37	8	22	105	27	39	38	50	75	63	63	52
8	135	8	20	269	125	203	203	221	54	25	24	18
9	3	1	185	3925	878	1382	1399	1312	78	65	64	67
9	4	1	140	2990	586	869	839	783	80	71	72	74
9	5	1	150	3187	732	1512	1686	1685	77	53	47	47
9	6	1	110	2331	443	822	930	821	81	65	60	65
9	3	2	195	3888	727	1600	1646	1876	81	59	58	52
9	4	2	153	3052	717	1972	1712	1657	77	35	44	46
9	5	2	163	3259	669	1122	1178	1132	79	66	64	65
9	6	2	115	2299	599	1595	1586	1659	74	31	31	28
9	3	3	205	4144	907	1978	2723	2809	78	52	34	32
9	4	3	165	3332	593	1309	1522	1511	82	61	54	55
9	5	3	185	3717	700	1714	2150	2242	81	54	42	40
9	6	3	125	2535	485	798	727	723	81	69	71	71
9	4	4	165	2859	492	1213	1420	1381	83	58	50	52
9	5	4	183	3159	843	1727	1948	2034	73	45	38	36
9	6	4	123	2176	502	1173	1311	1419	77	46	40	35
10	3	1	297	7404	2056	3544	3413	4675	72	52	54	37
10	4	1	250	6476	1906	3077	3000	2970	71	52	54	54
10	5	1	365	9270	2959	5363	5179	4708	68	42	44	49
10	6	1	190	4926	1502	2903	2846	2969	70	41	42	40
10	3	2	297	7354	2036	2910	2947	2721	72	60	60	63
10	4	2	279	7092	2114	3931	3919	4413	70	45	45	38
10	5	2	343	8538	2156	2909	3044	4183	75	66	64	51
10	6	2	218	5521	1832	3449	3771	2904	67	38	32	47
10	3	3	335	8493	2711	5484	5278	5212	68	35	38	39
10	4	3	298	7322	1889	2887	2883	2485	74	61	61	66
10	5	3	317	7845	1969	3616	3413	4725	75	54	56	40
10	6	3	240	5851	1910	3712	3765	3946	67	37	36	33
10	3	4	350	8834	2441	3827	3791	3822	72	57	57	57
10	4	4	321	7916	2242	3830	3794	4041	72	52	52	49
10	5	4	395	9869	2836	4826	4901	4312	71	51	50	56
10	6	4	257	6415	1689	3193	3159	2924	74	50	51	54

APÊNDICE B – Entrada de dados para análise estatística do capítulo II para bovinos. E= ensaio) A= animal, P= período, MOD= matéria orgânica digestível consumida, DPT= derivados de purinas totais na urina, PUR T.= purinas totais no duodeno, Nm PUR= nitrogênio microbiano estimado pelas purinas, Nm EQ1= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Chen e Gomes (1992), Nm EQ4= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Moorby et al., (2006), Nm EQ5= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Ma et al., (2013a) e Nm EQ6= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Ma et al., (2013b).

E	A	P	MOD (Kg/dia)	DPT (g/dia)	PUR T. (g/dia)	NmPUR (g/dia)	Nm EQ1 (g/dia)	NmEQ4 (g/dia)	NmEQ5 (g/dia)	NmEQ6 (g/dia)
9	3	1	2.6	10	3	15	35	51	45	39
9	4	1	2.0	3	3	11	2	25	14	13
9	5	1	2.0	6	4	16	16	36	26	24
9	6	1	1.6	4	2	9	10	31	18	17
9	3	2	3.2	10	7	32	37	51	47	41
9	4	2	2.4	5	8	35	12	32	23	21
9	5	2	2.6	7	5	20	22	40	32	28
9	6	2	1.7	4	8	35	8	29	17	16
9	3	3	2.7	6	8	33	15	36	29	26
9	4	3	2.3	6	5	22	15	35	26	23
9	5	3	2.5	6	8	34	17	37	29	26
9	6	3	1.7	5	3	12	12	33	21	20
9	4	4	2.3	5	6	25	12	33	24	21
9	5	4	2.4	6	7	29	18	38	29	26
9	6	4	1.7	4	5	20	11	32	20	18
10	3	1	5.2	25	18	77	96	109	118	101
10	4	1	4.4	23	13	54	90	104	109	93
10	5	1	6.1	25	23	98	93	104	118	101
10	6	1	3.3	22	17	72	86	101	102	87
10	3	2	5.1	20	15	63	70	84	91	78
10	4	2	4.8	17	19	80	57	72	78	67
10	5	2	6.2	25	13	54	90	103	115	98
10	6	2	3.6	14	16	71	48	65	65	56
10	3	3	5.6	29	26	114	113	124	138	117
10	4	3	5.2	22	13	55	81	95	103	88
10	5	3	5.7	24	19	80	88	101	111	95
10	6	3	3.8	13	15	65	44	61	62	54
10	3	4	6.2	28	19	82	106	117	131	112
10	4	4	5.4	19	17	71	68	82	91	78
10	5	4	6.8	25	20	86	92	103	119	101
10	6	4	4.5	19	16	69	70	86	90	77

APÊNDICE C – Entrada de dados para análise estatística do capítulo II para ovinos. E= ensaio) A= animal, P= período, MOD= matéria orgânica digestível consumida, DPT= derivados de purinas totais na urina, PUR T.= purinas totais no duodeno, Nm PUR= nitrogênio microbiano estimado pelas purinas, Nm EQ1= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Chen e Gomes (1992), Nm EQ2= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Puchala e Kulasek (1992), Nm EQ5= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Ma et al., (2013a) e Nm EQ6= nitrogênio microbiano estimado pelos derivados com equação de Ma et al., (2013b).

E	A	P	MOD (Kg/dia)	DPT (g/dia)	PUR T. (g/dia)	NmPUR (g/dia)	Nm EQ1 (g/dia)	NmEQ2 (g/dia)	NmEQ5 (g/dia)	NmEQ6 (g/dia)
1	1	1	0.54	0.9	1.4	6.1	4.6	3.8	4.2	5.3
1	2	1	0.37	1.0	1.5	6.5	5.0	3.9	4.6	5.6
1	6	1	0.75	2.3	2.5	10.9	12.4	8.1	10.7	10.7
1	7	1	0.55	1.3	3.0	12.9	6.8	4.5	6.0	6.8
1	8	1	0.60	2.7	3.2	13.8	14.6	9.6	12.5	12.2
1	18	1	0.46	1.5	1.5	6.4	8.2	5.0	7.1	7.7
1	20	1	0.70	1.6	2.1	8.8	8.8	5.6	7.6	8.1
1	1	2	0.55	0.8	1.8	7.6	3.7	3.6	3.6	4.8
1	2	2	0.41	1.0	1.5	6.6	5.2	3.9	4.8	5.7
1	6	2	0.71	1.7	2.3	9.8	9.0	6.2	7.8	8.3
1	7	2	0.69	1.5	2.5	10.7	7.9	5.4	6.9	7.5
1	8	2	0.50	2.4	4.6	19.7	13.2	9.3	11.3	11.2
1	20	2	0.36	1.5	3.9	16.6	7.9	5.0	6.9	7.6
1	1	3	0.55	1.2	1.7	7.4	6.1	4.2	5.4	6.3
1	2	3	0.42	0.8	1.8	7.8	3.6	3.6	3.6	4.7
1	8	3	0.55	2.0	4.0	17.0	10.8	6.9	9.3	9.6
1	18	3	0.66	0.8	1.8	7.6	4.0	3.6	3.8	4.9
1	20	3	0.55	1.3	2.7	11.8	6.9	4.7	6.1	6.8
1	1	4	0.56	1.3	1.7	7.3	7.0	4.4	6.2	6.9
1	2	4	0.32	0.9	0.9	4.0	4.6	3.6	4.3	5.3
1	6	4	0.61	1.2	2.4	10.4	6.1	4.4	5.5	6.3
1	7	4	0.52	1.2	2.9	12.5	6.4	4.1	5.7	6.5
1	8	4	0.68	1.8	3.2	13.6	9.8	6.3	8.5	8.9
1	20	4	0.48	1.0	1.8	7.9	5.0	3.9	4.6	5.6
2	8	2	0.68	2.4	3.3	14.0	13.2	9.6	11.4	11.3
2	20	2	0.49	1.6	2.5	10.5	8.4	5.5	7.4	7.9
2	2	3	0.52	1.3	2.3	9.8	6.9	5.1	6.1	6.9
2	6	3	0.76	2.9	4.3	18.3	15.7	14.3	13.5	13.0
2	8	3	0.67	2.3	3.5	15.2	12.2	8.0	10.5	10.6
2	20	3	0.70	1.7	3.4	14.6	9.3	6.0	8.1	8.5
2	6	4	0.67	1.6	2.8	12.1	8.7	5.5	7.6	8.1
2	20	4	0.71	2.2	2.6	11.1	11.9	7.8	10.3	10.3
4	3	1	0.36	1.2	1.4	6.1	6.2	5.0	5.7	6.5

Continuação do apêndice C.....

4	1	1	0.15	0.7	0.8	3.3	3.4	3.5	3.3	4.5
4	1	2	0.48	0.6	2.7	11.7	4.8	3.0	2.7	4.0
4	3	2	0.27	0.5	1.2	5.3	1.6	3.1	2.5	3.9
4	4	3	0.57	1.2	1.9	8.0	5.7	4.8	5.8	6.6
4	3	3	0.20	0.2	0.3	1.4	1.8	2.5	1.0	2.6
4	1	3	0.22	0.8	0.7	3.0	4.0	4.0	4.0	5.1
4	2	3	0.30	1.4	1.1	4.9	8.8	6.4	6.8	7.4
4	2	4	0.51	2.0	2.2	9.5	11.0	9.0	9.4	9.6
4	4	4	0.32	0.8	1.3	5.6	5.4	3.8	3.8	4.9
4	3	4	0.27	1.0	1.4	5.8	5.8	4.3	4.5	5.5
4	1	4	0.33	2.2	1.5	6.4	9.8	10.3	10.3	10.3
4	8	1	0.64	3.0	3.7	16.0	16.8	18.0	14.0	13.5
4	5	2	0.56	2.5	2.7	11.6	14.2	13.5	11.8	11.7
4	7	2	0.31	1.1	1.1	4.9	5.9	4.9	5.4	6.3
4	8	2	0.41	1.9	3.0	12.8	10.7	8.6	8.8	9.2
4	6	3	0.56	2.6	2.6	11.2	14.2	13.7	12.0	11.8
4	7	3	0.27	0.7	0.5	2.3	3.4	3.6	3.4	4.6
4	8	3	0.42	1.0	0.7	3.0	5.1	4.3	4.6	5.6
4	5	3	0.39	0.7	2.1	9.0	2.5	3.4	3.3	4.5
4	7	4	0.69	2.5	1.1	4.9	13.4	12.4	11.5	11.4
4	8	4	0.21	0.6	0.6	2.5	2.8	3.3	2.8	4.1
4	5	4	0.24	0.9	1.1	4.9	4.3	4.1	4.1	5.2
4	6	4	0.36	1.1	1.8	7.6	5.9	4.9	5.3	6.2
5	4	1	0.15	0.9	0.6	2.6	4.5	4.0	4.2	5.2
5	1	1	0.17	0.7	0.7	3.0	3.4	3.6	3.3	4.5
5	2	1	0.25	0.9	0.7	2.8	4.6	4.1	4.2	5.3
5	3	1	0.40	0.9	0.8	3.6	4.5	3.9	4.2	5.3
5	1	2	0.49	1.0	1.0	4.2	5.2	4.4	4.7	5.7
5	2	2	0.23	0.5	0.3	1.5	2.2	3.2	2.5	3.9
5	3	2	0.41	0.4	0.6	2.5	2.7	2.8	1.8	3.3
5	4	2	0.36	0.8	0.5	2.3	4.1	3.9	3.9	5.0
5	2	3	0.36	0.8	0.9	3.7	4.0	3.7	3.8	4.9
5	3	3	0.19	0.6	0.5	1.9	2.8	3.3	3.0	4.2
5	4	3	0.19	0.3	0.7	3.0	0.6	2.8	1.6	3.1
5	1	3	0.22	0.5	0.4	1.8	1.8	3.0	2.2	3.6
5	3	4	0.39	1.3	1.4	6.0	7.0	5.1	6.2	6.9
5	4	4	0.17	0.5	0.4	1.9	3.5	3.2	2.6	3.9
5	1	4	0.23	0.6	0.6	2.5	2.3	3.3	2.6	4.0
5	2	4	0.28	0.7	0.9	4.0	3.5	3.6	3.4	4.6
6	1	1	0.37	1.6	2.8	12.2	8.3	5.9	7.2	7.8
6	2	1	0.45	1.2	3.0	12.7	6.3	4.7	5.6	6.4
6	1	2	0.13	1.0	2.2	9.7	5.2	4.3	4.8	5.7
6	2	2	0.36	1.2	3.2	13.7	6.3	4.8	5.6	6.5
6	3	2	0.22	1.1	2.0	8.8	6.0	4.7	5.4	6.2
6	1	3	0.28	1.8	3.5	15.2	9.7	7.3	8.4	8.8
6	2	3	0.19	1.0	2.7	11.7	5.1	4.4	4.7	5.7
6	3	3	0.41	1.4	1.7	7.2	7.7	5.7	6.8	7.4
6	4	3	0.48	1.7	4.8	20.5	9.3	7.0	8.1	8.5
6	1	4	0.28	1.4	3.3	14.2	7.7	5.8	6.7	7.4

Continuação do apêndice C.....

6	2	4	0.19	1.3	2.5	10.6	7.2	5.4	6.3	7.0
6	3	4	0.28	1.1	2.1	9.0	6.0	4.9	5.4	6.2
7	2	1	0.51	0.7	0.7	3.0	3.0	3.3	3.1	4.4
7	3	1	0.39	0.6	1.2	5.3	2.7	3.4	2.9	4.2
7	7	1	0.56	0.9	1.6	7.1	4.5	4.0	4.1	5.2
7	8	1	0.51	0.8	1.0	4.4	3.8	3.7	3.7	4.9
7	2	2	0.67	1.0	1.4	6.2	5.0	4.2	4.5	5.6
7	3	2	0.25	0.7	0.4	1.8	3.1	3.5	3.2	4.5
7	7	2	0.48	0.9	0.7	2.8	4.3	3.9	4.0	5.1
7	8	2	0.45	0.5	0.4	1.7	1.4	3.0	2.2	3.6
7	2	3	0.44	0.5	1.1	4.5	1.9	3.1	2.4	3.8
7	3	3	0.47	0.8	1.0	4.3	3.9	3.8	3.8	4.9
7	7	3	0.26	0.4	0.9	3.7	1.3	2.7	2.0	3.4
7	8	3	0.25	0.7	0.9	3.8	3.3	3.4	3.4	4.6
7	2	4	0.33	0.6	0.6	2.6	2.4	3.2	2.7	4.0
7	7	4	0.47	0.8	1.4	5.8	3.9	3.7	3.7	4.9
8	9	1	0.36	1.4	3.7	15.8	7.6	6.1	6.6	7.3
8	10	1	0.21	1.0	1.4	6.0	5.1	4.5	4.7	5.7
8	11	1	0.16	0.8	1.2	5.0	4.1	4.0	3.9	5.0
8	15	1	0.21	0.7	1.3	5.4	2.9	3.6	3.1	4.4
8	16	1	0.20	1.0	2.0	8.8	5.0	4.5	4.6	5.6
8	17	1	0.46	1.5	3.1	13.4	7.8	6.3	6.8	7.5
8	21	1	0.24	0.8	1.3	5.5	4.2	4.0	3.8	5.0
8	37	1	0.28	0.8	1.7	7.2	3.8	3.8	3.6	4.8
8	10	2	0.12	0.6	0.7	2.9	2.8	3.5	3.0	4.2
8	11	2	0.34	1.1	1.9	8.2	6.0	4.9	5.3	6.2
8	15	2	0.32	0.6	1.1	4.5	2.7	3.5	3.0	4.2
8	21	2	0.15	0.4	0.9	3.7	1.8	3.1	2.1	3.5
8	37	2	0.59	0.7	2.1	8.9	3.5	3.7	3.4	4.6
8	9	3	0.20	1.0	1.6	6.8	5.3	4.6	4.8	5.8
8	10	3	0.20	0.8	0.7	3.1	3.9	3.9	3.7	4.9
8	11	3	0.38	1.1	2.1	9.2	5.7	4.9	5.2	6.1
8	15	3	0.29	0.6	1.2	5.0	2.9	3.5	3.0	4.3
8	16	3	0.14	0.5	0.5	2.3	2.3	3.2	2.6	3.9
8	17	3	0.17	0.5	0.8	3.4	2.0	3.1	2.3	3.7
8	36	3	0.15	0.7	0.7	3.0	3.3	3.6	3.4	4.6
8	37	3	0.17	0.6	0.8	3.6	2.6	3.3	2.7	4.0
8	10	4	0.33	0.8	0.6	2.7	3.8	3.8	3.6	4.8
8	11	4	0.36	1.0	1.3	5.7	4.9	4.4	4.5	5.5
8	16	4	0.69	0.7	1.2	5.0	3.4	3.7	3.3	4.6
8	17	4	0.39	0.7	1.3	5.6	3.3	3.5	3.2	4.4
8	21	4	0.26	0.5	0.8	3.3	2.2	3.2	2.4	3.7
8	36	4	0.50	0.7	1.3	5.6	3.5	3.7	3.4	4.6
8	37	4	0.58	1.0	2.1	9.0	5.0	4.4	4.5	5.5
8	10	5	0.29	1.0	1.6	6.7	4.2	4.3	4.7	5.7
8	15	5	0.18	0.5	0.5	2.2	1.6	3.0	2.2	3.6
8	21	5	0.27	0.7	0.7	3.1	3.4	3.4	3.3	4.5
8	35	5	0.28	0.7	0.5	2.2	3.5	3.7	3.4	4.6
8	36	5	0.19	0.5	0.9	3.8	2.0	3.2	2.4	3.8

Continuação do apêndice C.....

8	121	5	0.20	0.7	0.7	2.8	3.3	3.3	3.2	4.4
8	135	5	0.19	0.7	0.5	2.2	3.8	3.7	3.3	4.6
8	136	5	0.19	0.6	0.8	3.4	2.8	3.4	3.0	4.2
8	10	6	0.19	1.2	0.5	2.2	6.0	4.5	5.5	6.3
8	11	6	0.16	0.9	0.8	3.4	4.4	3.7	4.2	5.3
8	15	6	0.12	0.6	0.6	2.7	2.8	3.1	2.9	4.2
8	16	6	0.34	0.6	1.0	4.2	3.1	3.4	2.8	4.1
8	21	6	0.21	0.8	0.8	3.3	4.1	3.8	3.9	5.0
8	35	6	0.35	0.9	1.1	4.6	4.4	4.0	4.1	5.2
8	121	6	0.24	1.0	0.6	2.6	4.9	4.0	4.4	5.5
8	135	6	0.24	1.6	0.6	2.7	8.8	7.2	7.7	8.2
8	10	7	0.28	0.9	0.8	3.6	4.9	4.1	4.4	5.5
8	11	7	0.36	1.0	1.8	7.9	5.1	4.1	4.7	5.7
8	15	7	0.12	0.4	0.6	2.4	1.5	2.8	2.1	3.5
8	21	7	0.17	0.5	1.2	5.0	2.1	3.0	2.3	3.7
8	35	7	0.23	0.6	0.6	2.4	2.7	3.4	2.9	4.2
8	36	7	0.27	1.0	0.8	3.4	4.8	4.3	4.5	5.5
8	121	7	0.28	0.9	1.4	6.2	4.5	3.8	4.1	5.2
8	135	7	0.23	0.5	0.3	1.3	1.9	3.2	2.3	3.7
8	10	8	0.15	0.9	0.5	2.3	4.6	4.0	4.2	5.3
8	11	8	0.23	1.3	1.4	6.1	5.2	5.2	6.1	6.8
8	21	8	0.12	0.7	1.2	5.1	3.7	3.7	3.4	4.6
8	35	8	0.14	0.4	0.5	2.4	1.3	3.0	1.9	3.3
8	36	8	0.25	0.6	2.0	8.7	2.4	3.3	2.7	4.0
8	37	8	0.07	0.3	0.2	0.8	1.2	2.7	1.3	2.8
8	135	8	0.14	0.4	0.8	3.3	1.2	3.0	1.9	3.4