

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA CAMPUS JUVINO OLIVEIRA – ITAPETINGA-BAHIA

MICROBIOTA RUMINAL DE CABRAS LACTANTES ALIMENTADAS COM ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): ANÁLISE FUNCIONAL E MOLECULAR

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO

ITAPETINGA – BA OUTUBRO DE 2007

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO

MICROBIOTA RUMINAL DE CABRAS LACTANTES ALIMENTADAS COM ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): ANÁLISE FUNCIONAL E MOLECULAR

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-Orientadores: João Carlos Teixeira Dias Jurandir Ferreira da Cruz

ITAPETINGA BAHIA – BRASIL 2007 636.39 Argôlo, Lizziane da Silva.

A741m

Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): análise funcional e molecular./ Lizziane da Silva Argôlo. – Itapetinga-BA: UESB, 2007. 106p.

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - Campus de Itapetinga. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e co-orientadores Prof. D.Sc. João Carlos Teixeira Dias e Prof. D.Sc. Jurandir Ferreira da Cruz.

1. Caprinos – Alimentação – Algaroba. 2. Algaroba – Alimentação – Caprinos. 3. Nutrição animal – Caprinos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Campus de Itapetinga. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Dias, João Carlos Teixeira. IV. Cruz, Jurandir Ferreira da. V. Título

CDD(21): 636.39

Catalogação na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

- 1. Caprinos Alimentação
- 2. Algaroba Alimentação Caprinos
- 3. Nutrição animal Caprinos
- 4. Algaroba Análise funcional e molecular

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Área de Concentração em Produção de Ruminantes

Campus de Itapetinga-BA

TERMO DE APROVAÇÃO

Título: "Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): análise funcional e molecular".

Autor: Lizziane da Silva Argôlo

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **Mestre** em **Zootecnia**, área de concentração em **Produção de Ruminantes**, pela Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira – UESB

Presidente

Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira - UESB

Prof^a. Dr^a. Rachel Passos Rezende - UESC

Data da defesa: 17 de setembro de 2007

UESB - Campus Juvino Oliveira, Praça Primavera nº 40 – Telefone: (77) 3261-8628 Fax: (77) 3261-8701 – Itapetinga – BA – CEP: 45.700-000 – E-mail: mestrado.zootecnia@uesb.br

Dedico este trabalho a Deus e aos meus Pais (Ronaldo e Marinez)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Fiel, Justo e Pai Amoroso, por Seu amor eterno, pelos Seus ensinamentos aplicados ao meu coração, e por Sua promessa cumprida, de que estaria comigo todos os dias. *Ebenézer*: "Até aqui o Senhor me ajudou"! Obrigada Pai!

Aos meus pais, Ronaldo e Marinez, que por muito me amarem, renunciaram aos seus próprios sonhos para que os meus fossem realizados, pelo amor, apoio, confiança e carinho em todos os momentos, pelo exemplo que vocês são em minha vida e por terem cuidado de João Pedro durante este período. Amo muito vocês!

Ao meu marido, Thiago Mendes, você é uma benção em minha vida, obrigada pela compreensão na distância, na saudade, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Te Amo!

Ao meu filhote lindo, João Pedro, que mesmo sem saber foi o maior estímulo para que eu fizesse e concluísse este mestrado, você é a minha herança, benção de DEUS! Amo Você!

Aos meus irmãos queridos: Rogério e Ramon, Amo Vocês Demais. A Ronaldo, meu irmão e colega por ter dedicado tempo e paciência comigo neste trabalho, por ter me auxiliado. Muito Obrigada. Eu Te Amo!

Aos amigos, Bianca e Caio que de uma maneira especial sempre me impulsionam, por terem sido o elo entre mim e Professora Mara, obrigada por serem um exemplo de profissionalismo e garra para minha vida. Agradeço a Deus pela vida de vocês.

À Professora e amiga, Rachel que me recebe sempre com carinho. Obrigada por me ajudar a expandir meus horizontes e a aprender cada vez mais. Você está sempre no meu coração. Obrigada por tudo.

Quero agradecer aos meus amigos que sempre intercederam por mim a Deus. E agradecer especialmente, a Viviane, Taline e Maria Olívia, colegas de infância, que sempre estiveram disponíveis e de braços abertos, companheiras em todos os momentos em que passei em Itapetinga, com certeza "amigas para sempre"! Amo Vocês e que Deus derrame infinitas bênçãos sobre vocês.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na pessoa do Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva, muito obrigada por tudo! A todos os professores que participaram desta jornada, sempre solícitos, até mesmo fora do horário do curso, porque sem eles não haveria enriquecedoras idéias. Meus sinceros agradecimentos.

A Professora Mara Lúcia, minha orientadora, que acreditando no meu trabalho deu-me a liberdade e autonomia necessária dividindo comigo as expectativas e conduzindo-me a refletir nas idéias que se transformaram em palavras. Minha especial admiração e gratidão. Que Deus a abençoe sempre!

Aos meus co-orientadores, Professor João Carlos e Jurandir, pela orientação, incentivo e confiança, por terem acreditado que eu era capaz para realizar este trabalho. Obrigada, Deus os abençoe sempre!

Aos colegas da 3ª turma do mestrado que se tornaram amigos: André, Rita, Gesiane, Jacqueline, Luciana, José Nobre, Paulo Valter, José Dantas, Cristiane, Rogério, Fábio, Divane, todos são muito especiais em minha vida, obrigada pelos momentos que passamos juntos!

Aos colaboradores, Carlos ("Boquinha"), Mazzili, Maharishi ("Seu Babinha"), Léo, Paulo ("Barrão"), Grazi, Thaialla, Lucas, Marcos, Luziane, Edílson e Barriga, que muito contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço, especialmente, ao Professor Jorge Del Rei e André Luiz pela assistência técnica para este trabalho e pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada de coração, Deus os abençoe!

Agradeço a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), a GERLAB (Gerência de Laboratórios) e aos Laboratórios de Monitoramento Ambiental e de Genética, pela fundamental contribuição para a realização deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório da UESC: Adriana, Lana, Eduardo, Alex, Wagner, Tharcilla, Jaime, Stênio, Helianna, Gabrielle, Tatiana e Ana Cácia, pelo companheirismo em todas as horas. Aos colegas Cristiano Vilella e Juliano pela importante colaboração neste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

"As sociedades precisam tanto da ciência como da religião. Elas não são incompatíveis, mas complementares."

(Francis Collins, Diretor do Projeto Genoma)

"O temor do Senhor é o princípio da sabedoria." (Salmos 111:10a)

RESUMO

ARGÔLO, L.S. Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): análise funcional e molecular. Itapetinga-BA: UESB, 2007. 106p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia - Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da adição de farelo da vagem de algaroba (FVA) em substituição ao fubá de milho no concentrado sobre a produção microbiana, estimada pela excreção de derivados de purinas com coleta total de urina, e sobre os parâmetros ruminais (pH, N-NH₃ e AGVs). Além de estudar a diversidade microbiana ruminal, aplicando o método de DGGE, e padronizar uma metodologia para extração de DNA microbiano total de fluido ruminal de cabras lactantes. O experimento foi conduzido no setor de Caprinocultura do Departamento de Tecnologia Rural e Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Utilizaram-se 8 cabras adultas lactantes, com aproximadamente 50 kg de PV, distribuídas em 2 quadrados latinos 4x4, cada período experimental foi constituído por 10 dias de adaptação e 7 dias de coletas de dados. Foram utilizados níveis crescentes de FVA de 0, 33,3, 66,7 e 100% da matéria natural do concentrado, em dietas isoprotéicas, tendo como base volumosa a silagem de capim-elefante, na proporção de 40%. Os resultados foram avaliados por meio de análises de variância e regressão, utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG, 8.0, por meio do teste F, a 5% de probabilidade. As médias de estimativa da produção microbiana calculada pelos modelos de Belenguer et al. (2002) e Chen e Gomes (1992), foram comparadas aplicando-se o teste t pareado. Não houve efeito significativo (P>0,05) dos parâmetros ruminais em função dos níveis de substituição do fubá de milho pelo FVA. O pH manteve-se em faixa adequada, entre 6,85 e 7,03 e a concentração média de amônia ruminal foi de 6,97 mg de N/ 100 mL de fluido ruminal. As concentrações de acetato e propionato variaram de 9,47 a 10,54 e de 4,79 a 6,58 mM, respectivamente. As excreções de alantoína (P<0,05), ácido úrico (P<0,01), xantina e hipoxantina (P<0,05) diminuíram linearmente com o nível de substituição. A porcentagem média de alantoína excretada variou de 67,37 a 65,25%, a proporção média de ácido úrico variou de 6,54 a 6,11%, enquanto a de xantina e hipoxantina variaram de 26,09 a 28,28%. A quantidade de purinas absorvidas e o fluxo intestinal de N-microbiano apresentaram comportamento linear decrescente em relação à porcentagem de substituição do fubá de milho pelo FVA. A eficiência de síntese microbiana expressa em g PBmic/ kg de NDT, demonstrou efeito linear negativo com a utilização do FVA (P<0,05). Para a análise molecular da diversidade bacteriana, o líquido ruminal foi coletado com auxílio de sonda esofágica adaptada a uma bomba de vácuo, 6h após a alimentação matinal no 17º dia de cada período experimental. A diversidade genética bacteriana foi determinada por meio da DGGE dos produtos de PCR da região V3 do 16S rDNA (aproximadamente 200 pb) obtidos de primers universais para procariotos. O protocolo desenvolvido incluiu a otimização de: procedimentos na extração do DNA, amplificação pela PCR e, otimização de preparação do gel de DGGE. Apesar da técnica de DGGE não ter sido completamente padronizada, por se tratar de uma comunidade complexa, observou-se variações nos padrões de bandas do gel, indicando alterações das populações bacterianas em função dos tratamentos.

Palavras-chave: Caprinos, *Prosopis juliflora*, parâmetros ruminais, derivados de purinas, PCR, DGGE, produção microbiana.

^{*}Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira, UESB e Co-orientadores: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias, UESC e Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz, UESB.

ABSTRACT

ARGÔLO, L.S. Rumen Microbes of lactating goats fed with mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): functional and molecular analysis. Itapetinga-BA: UESB, 2007. 106p. (Dissertation – Magister Scientiae in Animal Science – Concentration Area in Ruminant Production).*

The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of mesquite pod meal (MPM), in substitution to corn meal in the concentrate on the microbial production, estimated from purine derivatives excretion obtained by urine total collection, and on the ruminal parameters (pH, N-NH₃ and fatty volatile acid-FVA). Beyond studying the microbial ruminal diversity, applying the DGGE method, and standardizing a methodology for total extraction of microbial DNA from ruminal fluid of lactating goats. The experiment was carried out in the sector of Small Ruminants of the Department of Agricultural and Animal Technology of the Southwestern of the Bahia State University. Eight lactating goats had used themselves, with approximately 50 kg, distributed in 2 latin squares 4x4, each experimental period was constituted per 10 days of adaptation and 7 days of collections of data. Increasing levels of MPM of 0, 33.3, 66.7 and 100% of the natural matter had been used, in iso-proteic diets, having as roughage the grass-Elephant silage, in the ratio of 40%. The results had been evaluated by means of analysis of variance and regression, using themselves the System of Statistical and Genetic Analysis - SAEG, 8.0, by means of F test, 5% of probability. The averages estimated of microbial production calculated by the models of Belenguer et al. (2002) and Chen and Gomes (1992), had been compared applying t test. It did not have significant effect (P>0.05) of the ruminal parameters in function of the levels of substitution of corm meal for the MPM. The pH was remained in adjusted band, between 6.85 and 7.03 and 6.97 mg/100 mL was the average concentration of ruminal ammonia. The acetate and propionate contents had varied of 9,47 to 10,54 and 4,79 to 6,58 mM, respectively. The excretion of allantoin (P<0.05), acid uric (P<0.01), xanthine and hypoxanthine (P<0.05) had reduced linearly with the substitution level. The average percentage of allantoin varied of 67.37 to 65.25%, the average ratio of acid uric varied of 6.54 to 6.11%, while of xanthine and hypoxanthine had varied of 26.09 to 28.28%. The amount of absorbed purines and the microbial nitrogen synthesis presented decreasing linear behavior in relation the percentage of substitution of corn meal for the MPM. The efficiency of microbial protein synthesis express in g of microbial Crude Protein/ kg of total digestibles nutrients, when evaluated from samples proceeding from the urine total collection, it demonstrated to have negative linear effect of the use of MPM on this variable (P<0.05). For the molecular analysis of the bacterial diversity, the ruminal liquid was collected with aid of an adapted esophagic sounding lead to a vacuum bomb, 6 hours after the matinal feeding in 17° day of each experimental period. The bacterial genetic diversity was determined by means of the DGGE of the products of PCR of the V3 region of 16S rDNA (approximately 200 bp) gotten of primers universal for prokaryotes. The developed protocol included the standardization of: procedures in the extraction of the DNA, amplification for the PCR and, standardization of preparation of the DGGE gel. Although the technique of DGGE not to have completely been standardized, for itself dealing with a complex community, looked variations in the standards of bands of the gel, indicating changes of the bacterial populations in function of the treatments.

Key Words: Goats, *Prosopis juliflora*, ruminal parameters, purine derivatives, PCR, DGGE, microbial production.

^{*} Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D. Sc.*, UESB and Co-advisers: João Carlos Teixeira Dias, *D. Sc.*, UESC e Jurandir Ferreira da Cruz, *D. Sc.*, UESB.

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1	Produção Microbiana e Parâmetros Ruminais de Cabras Lactantes Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba	
Tabela 1 -	Composição percentual do concentrado, expressa na base da matéria natural	38
Tabela 2 -	Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra bruta em detergente ácido (FDA), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHOT) e cinzas, contidos nos concentrados e na silagem de capim-elefante	39
Tabela 3 -	Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra bruta em detergente ácido (FDA), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHOT) e cinzas contidas nas dietas experimentais	40
Tabela 4 -	Valores médios, coeficientes de variação (CV %) para o pH ruminal e para as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃ ; mg de N/ mL), acetato e propionato (mM) de acordo com a porcentagem (%) de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA) no concentrado	44
Tabela 5 -	Médias, coeficientes de variação (CV) e a determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para as excreções observadas (Obs) de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina e derivados de purinas, de acordo com a porcentagem (%) de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA) no concentrado	51
Tabela 6 -	Médias, coeficientes de variação (CV %) e determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para a quantidade de purinas absorvidas (PA), expressas em mmol/ d, e o fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (NM), expresso em gramas/ d, em função da porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA)	53
Tabela 7 -	Médias, coeficientes de variação (CV %) e determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para a produção de proteína microbiana PBmic, expressas em g/ d e a eficiência de síntese microbiana, expressa em g PBmic/ kg de nutrientes digestíveis totais-NDT), em função da porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA)	54
CAPÍTULO 2	Análise Molecular da População Bacteriana Ruminal de Cabras Lactantes Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba	
Tabela 1 -	Principais espécies bacterianas do rúmen, segundo o tipo de substrato fermentado (Adaptado de YOKOYAMA e JOHNSON, 1988; KAMRA, 2005)	74
Tabela 2 -	Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total para o estudo da diversidade microbiana. (Adaptado de MACIEL, 2004)	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Produção Microbiana e Parâmetros Ruminais de Cabras Lactantes Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba	
Figura 1 - Figura 2 -	Ribose e Desoxirribose (Adaptado de BERG et al., 2004)	13
Figura 3 -	Purina (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) e Pirimidina (timina, citosina, uracila, ácido orótico) (Adaptado de BERG et al., 2004)	14
Figura 4 - Figura 5 -	Inosinato ligado ao nucleosídeo hipoxantina (BERG et al., 2004)	15
Figura 6 -	Degradação de nucleotídeos purínicos e formação de DP. AMP – adenosina 5'-fosfato; AMP AH – AMP aminohidrolase; IMP – Inosina 5'-fosfato; 5-N – 5'-nucleotidase; AD – adenosina deaminase; NF – nucleosídeo fosforilase; G – guanina; GD – guanina deaminase; XO – xantina oxidase; U – uricase (Adaptado de CHEN e GOMES, 1992)	18
Figura 7 -	Diferenças entre ovinos e bovinos na utilização de purinas exógenas (Adaptado de CHEN e GOMES, 1992)	20
Figura 8 -	Baias individuais onde as cabras permaneceram durante o experimento	37
Figura 9 -	Seqüência de fotografias mostrando a colocação da sonda Foley para coleta de urina total. 1 – indica os instrumentos utilizados no procedimento; 2 – assepsia da região da vulva; 3 – abertura do canal vaginal; 4 – introdução da sonda de Foley pelo canal da uretra; 5 – mostra a introdução de soro fisiológico para preencher o balão da sonda; 6 – observação da saída de urina pela sonda; 7 – cabra com sonda acoplada a uma mangueira, e a urina é coletada dentro de um galão de 5 L; 8 – cabra em posição de micção, dentro da baia	42
Figura 10 -	Concentrações médias de acetato e propionato em função dos tratamentos. 1, 2, 3 e 4 – 0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo FVA, respectivamente	47
Figura 11 -	Concentrações de acetato e propionato em função dos tratamentos. 1, 2, 3 e 4 – 0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo FVA, respectivamente	47
CAPÍTULO 2	Análise Molecular da População Bacteriana Ruminal de Cabras Lactantes Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba	
Figura 1 -	Diagrama esquemático mostrando as vias de fermentação do amido, proteína e fibra pelas respectivas bactérias, e os produtos desta fermentação (Adaptado de RUSSELL, 1997)	77
Figura 2 -	Diagrama esquemático mostrando as vias de utilização dos produtos de degradação pelas respectivas bactérias (Adaptado de RUSSELL, 1997)	78

Figura 3 -	Princípio da Reação da Polimerase em Cadeia. Pequenas seqüências específicas de DNA (iniciadores) são utilizadas para se ligarem às fitas de DNA desnaturado pelo aquecimento. Uma enzima termoestável (DNA polimerase) estende os iniciadores para formar a nova fita complementar	
	(Adaptado de KREUZER e MASSEY, 2002)	85
Figura 4 -	Estrutura secundária do rRNA 16S. As regiões conservadas estão representadas pelas linhas em negrito e as variáveis (V1-V9) pelas linhas finas (RODÍCIO e MENDOZA, 2004)	89
Figura 5 -	Sequência de fotos mostrando a coleta do líquido ruminal por meio de	09
riguia 3 -	sonda esofágica acoplada a uma bomba de vácuo e o processamento	0.1
Ei auma 6	inicial para extração de DNA	91
Figura 6 -	Sequência de fotos que mostram a montagem e aplicação das amostras na cuba de DGGE	94
Figura 7 -	Esquema de preparação do gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante utilizando um "gradient maker", sistema para produção do gradiente linear	94
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de amostras de líquido ruminal de cabras leiteiras. (G1 e G2) utilizando os iniciadores F357GC-R518 (200 pb); M, Marcador de peso molecular pGEM® (Promega); A-D representam as cabras do quadrado latino 1; E-H, representam as cabras do quadrado latino 2; I-IV, equivalem aos períodos experimentais; 1-4, os tratamentos (0, 33,3, 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba; C-, controle	71
	negativo; C+, controle positivo (Salmonella sp.)	95
Figura 9 -	DGGE dos produtos da PCR utilizando os iniciadores F357GC-R518. A-D representam as cabras do quadrado latino 1; E-H, representam as cabras do quadrado latino 2; III-IV, equivalem aos períodos experimentais; 1-4, os tratamentos (0, 33,3, 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba; C+, controle positivo	
	(Salmonella sp.)	98

LISTA DE ABREVIAÇÕES

a Taxa de recuperação das purinas absorvidas (eficiência de absorção de purinas

exógenas)

A Adenina AA Aminoácido

AEPA Ácido aminoetilfosfônico

AcN Ácidos nucléicos AGVs Ácidos graxos voláteis

Am Amido

AMP Adenosina monofosfato AS Açúcares solúveis ATP Adenosina trifosfato

b Excreção endógena de derivados de purinas (mmol/d)

BA Bahia

c Excreção endógena inevitável de derivados de purinas (mmol/d)

C Citosina Ca²⁺ Íons de cálcio CH₄ Metano

CHOT Carboidratos totais

CO₂ Gás carbônico ou dióxido de carbono

CNCPS The Cornell Net Carbohydrate and Protein System

CNF Carboidratos não fibrosos

CNFD Carboidratos não fibrosos digestível

CS Carboidratos solúveis

CSDN Carboidratos solúveis em detergente neutro

d Excreção exógena de derivados de purinas expressa em mmol/ d (síntese *de novo*)

que pode ser evitada pela utilização de bases purinas absorvidas

DAPA Ácido diaminopimélico

DGGE Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DHP Dihidroxipiridina

dNTP Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DNA Ácido desoxirribonucléico DP Derivados de purinas

EE Extrato etéreo
ED Entner-Duodoroff
EED Extrato etéreo digestível
EMP Embden-Mayerhof-Parnas
FDA Fibra em detergente ácido
FDN Fibra em detergente neutro

FDND Fibra em detergente neutro digestível FSDN Fibra solúvel em detergente neutro FVA Farelo da vagem de algaroba

G Guanina

GMP Guanosina monofosfato

HCl Ácido clorídrico

HCO₃ Íon hidrogenocarbonato

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

HGPRT Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase HPLC Cromatografia líquida de alto desempenho ID Intestino delgado IMP Inosina monofosfato

KDPGA 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase

kHz Quilohertz

KOH Hidróxido de potássio
MN Matéria natural
MO Matéria orgânica
MS Matéria seca
N Nitrogênio
NaCl Cloreto de sódio

NDT Nutrientes digestíveis totais
NM Nitrogênio microbiano
N-NH₃ Nitrogênio amoniacal
NNP Nitrogênio não protéico
PA Purinas absorvidas
ph Pares de base

pb Pares de base PB Proteína bruta

PBD Proteína bruta digestível
PBS Solução salina tamponada
PCR Reação em cadeia da polimerase

PDR Proteína degradável no rúmen pH Potencial hidrogeniônico
PBmic Proteína bruta microbiana

PPi Pirofosfato

PRPP Fosforibosilpirofosfato

PV Peso vivo

rDNA Dna ribossômico
rRNA Rna ribossômico
RNA Ácido ribonucléico
rpm Rotações por minuto
SDS Sodecil sulfato de sódio

T Timina

TAE Tris-base, ácido acético, EDTA

TE Tris-HCl, EDTA
TESC Tris-base, EDTA, NaCl
TFG Taxa de filtração glomerular

TGI Trato gastrintestinal

UESB Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

UESC Universidade Estadual de Santa Cruz

V Volts

XO Xantina oxidase

X Bases purínicas absorvidas no duodeno (mmol/ d)

Xs Ponto de substituição da síntese de novo de purinas por purinas exógenas

absorvid as

W Watts

Y Excreção de derivados de purinas endógenos e exógenos na urina (mmol/ d)

SUMÁRIO

	Resumo	vii
	Abstract	viii
	CAPÍTULO 1	
	Produção Microbiana e Parâmetros Ruminais de Cabras Lactantes	
	Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba	
1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	Síntese de Proteína Microbiana no Rúmen	9
2.1.1	Origem dos Derivados de Purinas	12
2.1.2	Catabolismo de Purinas	16
2.1.3	Metabolismo das Purinas nos Ruminantes	19
2.1.4	Derivados de Purinas de Origem Endógena	21
2.1.5	Recuperação de Purinas Exógenas como Derivados Purínicos	23
2.1.6	Excreção de Alantoína	26
2.1.6.1	Quantificação dos Derivados de Purinas Totais vs Alantoína	26
2.1.6.2	Utilização da Secreção de Alantoína no Leite	27
2.2	Parâmetros Ruminais	29
2.2.1	pH ruminal	29
2.2.2	Nitrogênio Amoniacal	32
2.2.3	Ácidos Graxos Voláteis	34
,,		
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais e Tratamentos	37
3.2	Parâmetros Ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal, acetato	
	e propionato)	40
3.3	Síntese de Proteína Microbiana	41
3.4	Análise Estatística	43
	Time Estavisvica	
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
•	RESCEITE OS E DISCOSSITO	
5	CONCLUSÕES	57
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	58
Ü		
	CAPÍTULO 2	
	Análise Molecular da População Bacteriana Ruminal de Cabras Leiteiras	
	Alimentadas Com Farelo da Vagem de Algaroba	
1	INTRODUÇÃO	71
1	1.111020 Ç110	, 1
2	DEEEDENCIAL TEÓDICO	72

2.1	Rúmen	73
2.2	Diversidade Microbiana Ruminal	74
2.3	Interações Microbianas	76
2.4	Fatores que Afetam a População Bacteriana	80
2.5	Métodos de Cultivo e Isolamento	82
2.6	Métodos Moleculares	83
2.6.1	Reação em Cadeia da Polimerase	84
2.6.2	Estudo da Diversidade Microbiana por meio da Técnica de	
2.0.2	DGGE	88
3	MATERIAL E MÉTODOS	91
3.1	Amostras	91
3.2	Extração do DNA Total	92
3.3	Amplificação por PCR	93
3.4	Em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	93
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5	CONCLUSÕES	99
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	100

CAPÍTULO 1

Produção de Proteína Microbiana e Parâmetros Ruminais de Cabras Lactantes Alimentadas com Farelo da Vagem de Algaroba

1. INTRODUÇÃO

A produtividade caprina brasileira, apesar do rebanho numericamente representativo, ainda possui índices reduzidos de desempenho, sobretudo quando confrontada a países europeus. Entretanto, a caprinocultura leiteira vem se desenvolvendo amplamente nos últimos anos, embora a tecnologia aplicada no Brasil seja precária, o leite de cabra vem ganhando espaço no mercado, sendo que, a agroindústria especializada em produtos lácteos de caprinos está em larga expansão.

Os caprinos são ruminantes intermediários, entre os selecionadores de alimentos concentrados e pastejadores, ou seja, buscam na planta, por uma questão de seleção natural, as partes em que há maior concentração de nutrientes, em detrimento de outras partes mais fibrosas (VAN SOEST, 1994).

Os animais de alta produção necessitam de dietas balanceadas para maximizar a ingestão de nutrientes. Requerem alimentos ricos em carboidratos não-fibrosos como fonte de energia para os microrganismos ruminais, favorecendo a síntese microbiana para atender suas exigências nutricionais. No entanto, quando os concentrados são utilizados em limites máximos, podem propiciar o aparecimento de distúrbios digestivos que comprometem a saúde animal, levando à redução do desempenho produtivo (MERTENS, 1997).

A alimentação dos animais representa o maior custo da atividade pecuária, principalmente quando se usa fonte suplementar como o milho e o trigo, que, apesar da elevada qualidade nutricional, apresenta, em geral, alto custo. Desta forma torna-se necessária a utilização de fontes alimentares alternativas com melhor relação custo/benefício, sem concorrer diretamente com a alimentação humana. Alimentos disponíveis regionalmente surgem como alternativas viáveis, tanto do ponto de vista nutricional como econômico. Uma alternativa na região Nordeste é a utilização do farelo da vagem de algaroba em substituição ao milho, pois a algarobeira resiste ao fator edafoclimático do semi-árido e produz grande quantidade de vagem. Os valores de carboidratos solúveis descritos por Valadares Filho et al. (2006) foram de 54,16 e 19,90% para o farelo da vagem de algaroba e o fubá de milho, respectivamente.

A suplementação alimentar para uma síntese efetiva de proteína microbiana para os ruminantes tem sido uma importante área de estudo na nutrição protéica destes animais (CHEN e GOMES, 1992). A determinação da contribuição da proteína microbiana para a proteína do hospedeiro e requerimentos de aminoácidos tornou-se muito importante para o desenvolvimento dos sistemas de avaliação, sendo necessária a quantificação da proteína que escapa a degradação e a produção microbiana (STOKES et al., 1991; BRODERICK e MERCHEN, 1992; CHEN e GOMES, 1992).

Nos ruminantes as exigências de proteínas são supridas pelos aminoácidos absorvidos no intestino delgado, os quais são provenientes da proteína microbiana (sintetizada no rúmen) e da proteína alimentar não degradada no rúmen (MERCHEN e BOURQUIN, 1994 – citados por SILVA, R.M.N. et al., 2001; NRC, 2001; VALADARES FILHO et al., 2007).

A proteína microbiana sintetizada no rúmen fornece a maior e mais barata fonte protéica para os ruminantes. Em áreas onde a disponibilidade de suplementação é escassa, a maximização da produção de proteína microbiana por meio de um programa de arraçoamento ótimo, baseado em alimentos concentrados regionalmente disponíveis é uma forma efetiva e sustentável para a melhoria da produtividade dos ruminantes.

Diversos métodos empregados na estimação da quantidade de compostos nitrogenados microbianos baseiam-se em marcadores microbianos. Esses métodos requerem a utilização de animais fistulados e a determinação do fluxo da matéria seca no abomaso. Desta forma, tem sido de grande interesse o desenvolvimento de técnicas não-invasivas para a determinação da proteína microbiana.

O uso de derivados de purinas para estimar a produção de proteína microbiana apresenta-se como uma alternativa viável às técnicas invasivas. O método para estimar a produção microbiana baseado na excreção de derivados de purinas requer coleta total de urina e, portanto, supera as desvantagens dos métodos citados anteriormente, uma vez que não requer qualquer procedimento cirúrgico e tem o potencial de vir a ser simplificado para ser usado em condições de campo (CHEN e GOMES, 1992).

A suplementação protéica para animais é uma ferramenta que permite adequar a dieta. Este suplemento deve ser capaz de propiciar um ambiente adequado para que a fermentação ruminal seja a mais eficiente possível. A suplementação com concentrado protéico altera alguns parâmetros ruminais, como a concentração de compostos nitrogenados amoniacais (N-NH₃), cujo aumento favorece a otimização da síntese microbiana e melhora a digestibilidade da fibra, e de ácidos graxos voláteis (AGVs), que são as principais fontes metabólicas de energia para os ruminantes, e o pH ruminal, que influencia a dinâmica de crescimento da população microbiana.

Os produtos da fermentação diferem entre os alimentos, pois os microrganismos têm maior especificidade em digerir determinados nutrientes. Entre os componentes da ração, as fontes de proteína e carboidratos, são os substratos que mais influenciam o processo

fermentativo, tanto de nitrogênio quanto de energia no rúmen (NOCEK e RUSSELL, 1988). Devido a atividade dos microrganismos ruminais, os diversos componentes de uma dieta são gradualmente degradados no rúmen com a produção de massa microbiana, gases da fermentação, amônia e ácidos graxos voláteis. No entanto, o padrão de fermentação ruminal de caprinos alimentados com o farelo da vagem de algaroba é desconhecido. Acredita-se que por ser um alimento que apresenta maior quantidade de carboidratos solúveis do que o fubá de milho haja uma interferência tanto no pH quanto nas concentrações de amônia e AGVs.

Neste contexto e por serem escassos estudos desta natureza envolvendo caprinos, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba no concentrado sobre a produção de proteína microbiana em cabras lactantes, estimada por meio da técnica da excreção urinária de derivados de purinas, com coleta total de urina, somada à secreção de alantoína no leite, e sobre os parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e relação acetato: propionato).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A atividade de criação de cabras está atrelada ao homem desde o início das civilizações e foi um importante fator para a fixação dos primeiros núcleos de assentamentos, fornecendo leite, carne e pele. Também foi de grande relevância na colonização do Brasil, porque deixou em nosso país uma extraordinária fonte de suprimentos de leite, carne e pele, sobretudo naquelas áreas mais inóspitas quanto ao clima (CORDEIRO, 2006).

A caprinocultura é uma atividade que vem se desenvolvendo muito nos últimos anos. A população mundial é de 790 milhões 028 mil 397 caprinos (FAO, 2004). O Brasil possui um rebanho efetivo de caprinos de 10 milhões 306 mil 722, segundo o IBGE (2005) e 92,6% do rebanho caprino nacional (9 milhões 542 mil 910) encontra-se na região Nordeste, onde a maioria dos animais é criada em condições precárias, sendo exportadas apenas a carne e a pele, seguida pelas regiões Sudeste, Sul, Norte e Centro-Oeste, 2,44%, 2,35%, 1,5% e 1,1%, respectivamente (IBGE, 2005). Há um contraste expressivo quando se compara o efetivo do rebanho de caprino brasileiro ao de bovino, especialmente quando se considera a área territorial e a capacidade de adaptação dos pequenos ruminantes domésticos, e percebe-se que a capacidade reprodutiva e produtiva dos caprinos está aquém das suas potencialidades (SIMPLÍCIO e SIMPLÍCIO, 2006).

A ovino-caprinocultura é uma atividade de relevância no Nordeste, principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Pernambuco, proporcionando uma fonte alternativa de proteína animal e contribuindo, significativamente, na oferta de alimentos e peles de excelente qualidade, sendo a exploração do rebanho caprino basicamente para carne e pele, embora a caprinocultura leiteira também venha se desenvolvendo. O produto que mais tem sido procurado e que tem impulsionado esse processo é o leite para uso terapêutico e paralelamente, vem se criando um mercado consistente para atividade.

A caprinocultura desde que racionalmente explorada e conduzida em sintonia com os aspectos ambientais, econômicos e sociais, é, sem dúvida, uma excelente alternativa para as regiões mais pobres do Brasil, particularmente daquelas do meio rural na região Nordeste. Nesta região se registra um grande número de habitantes analfabetos, agravado pela descapitalização e pela má distribuição de terra e renda, representando forte entrave para se implantar trabalhos na agropecuária que tragam, em seu programa, a necessidade do uso de tecnologia (SIMPLÍCIO, 2001). A exploração caprina voltada, preferencialmente, para a produção de leite e seus derivados, pode favorecer muito as populações de baixa renda e, mesmo nessas condições, é uma alternativa com amplas perspectivas de sucesso.

A caprinocultura leiteira tem aumentado significativamente sua participação no cenário agropecuário brasileiro, em 1996 a produção de leite, no Brasil, foi de 21 mil 900 litros (IBGE, 1996) aumentando para 40 mil 694 litros em 2004 (FAO, 2004). Além disto, vem superando o constante desafio de conquistar e manter novos mercados para o leite de cabra e seus derivados, e dentre os produtos lácteos caprinos industrializados mais freqüentes estão o leite integral pasteurizado e/ou congelado, leite em pó, queijos de variados tipos, sorvetes e cosméticos (ALCALDE et al., 2005; CORDEIRO, 2006).

Os caprinos são mais eficientes como produtores de leite do que carne e, ao serem explorados com aquela finalidade, favorecem o aumento da disponibilidade de alimentos, gerando riqueza mais rápida em função do curto período de circulação do capital financeiro. Contudo, na maioria das explorações, a produtividade ainda é baixa, devido às indefinições quanto aos objetivos, metas e estratégias, além da ausência de melhorias no regime de manejo e de sistemas de produção compatíveis com a exploração leiteira (PIMENTA FILHO E SIMPLÍCIO, 1994).

Apesar de a caprinocultura ser uma atividade econômica explorada em todo o mundo, sendo exercida em ecossistemas com os mais diversos climas, solos e vegetação, evidencia-se que a exploração apresenta expressão econômica em poucos países, uma vez que, na maioria dos casos, a atividade é desenvolvida em sistema extensivo e com baixo nível de tecnologia (SIMPLÍCIO, 2001).

A nutrição tem um papel essencial no sistema de criação de caprinos, por diversas razões, primeiro, é um fator produtivo em que os proprietários podem agir mais fácil e rapidamente, e por ter um efeito marcante sobre os custos de produção. O impacto relacionado à alimentação é outra razão para o desenvolvimento do sistema de criação de caprinos, como condições patológicas e o desempenho reprodutivo do rebanho. Além disso, um programa nutricional para caprinos deve ser sempre estabelecido levando em consideração as características genéticas ou mesmo genotípicas (*e.g.* potencial de produção, habilidade de adaptação) (MORAND-FEHR, 2005). No entanto, pesquisas sobre nutrição de caprinos permanecem limitadas quando comparadas a bovinos e ovinos.

Geralmente os caprinos procuram uma diversidade em sua ingesta, provavelmente para manter o ambiente ruminal dentro de certo arranjo fisiológico e microbiológico, mas muito do comportamento seletivo é um componente essencial para caprinos porque costumam permanecer em áreas de difícil acesso, por isso se tornaram mais adaptados às mais variadas espécies de planta (DUCAN e YOUNG, 2002). Estudos indicaram que caprinos podem escolher sua ingesta em sistema de alimentação em livre escolha de acordo com a energia e a necessidade protéica (FEDELE et al., 2002).

A algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma planta xerófita da família Leguminoseae, subfamília Mimosoideae (PIRES, 1985; QUINTANS, 2001), nativa do Peru,

Chile e Argentina. Tem sido disseminada pela América Central e do Norte, introduzida em áreas áridas onde os índices pluviométricos estão em torno de 200 mm/ ano. É utilizada no combate à desertificação como um fixador de nitrogênio e para alimentação de rebanhos (MAHGOUB et al., 2005b). Foi introduzida no Brasil em 1942, na região Nordeste, onde se apresenta bastante promissora tanto para fins madeireiros como forrageiros (PIRES, 1985), tornando-se uma importante produtora de alimento de alto valor nutritivo, existindo cerca de 150.000 ha de área plantada (QUINTANS, 2001).

A excepcional importância e valor das prosopis residem no fato e na capacidade que elas apresentam em transformar terras áridas em terras produtivas. A algarobeira é resistente as secas drásticas e bem adaptada a temperaturas elevadas e solos pobres. Seu sistema radicular é capaz de buscar água a mais de 50 metros de profundidade (FIGUEIREDO, 1995). Por outro lado, se não for bem manejada, a algaroba é capaz de invadir *habitats* naturais e inibir a regeneração de outras espécies de planta da caatinga, reduzindo a biodiversidade vegetal (MAHGOUB et al., 2005b). No entanto, se as vagens forem coletadas e utilizadas na alimentação de rebanhos, a possibilidade de disseminação, diminuirá.

As vagens de algarobeira fazem parte da alimentação humana desde a pré-história, nas regiões onde esta leguminosa é nativa. São palatáveis, aromáticas lembrando baunilha e doces em função do elevado teor de sacarose, que pode chegar a 30% de matéria seca (FIGUEIREDO, 2000). A partir das vagens processadas podem ser obtidos diversos tipos de alimentos como: farinha, pão, bolos, bebidas alcoólicas, xaropes, geléia e substituto do café (GROSSI E FIGUEIREDO, 2000).

A algarobeira produz grande quantidade de vagens de excelente palatabilidade e boa digestibilidade, esta produção pode variar até valores acima de 400 kg por árvore por ano (BATISTA et al., 2002). As vagens da algaroba apresentam em sua composição química 25-28% de glicose, 11-17% de amido, 7-11% de proteínas e 14-20% de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias (SILVA, S.A. et al., 2001).

As vagens de algaroba contêm cerca de 930 g de matéria seca (MS)/ kg, 120 g de proteína bruta (PB)/ kg, 317 g de fibra em detergente ácido (FDA)/ kg, 402 g de fibra em detergente neutro (FDN)/ kg, 26 g de extrato etéreo (EE)/ kg e 40 g de cinza/ kg (MAHGOUB et al., 2005b). Um estudo realizado com ovelhas verificou-se que a ingestão das vagens e a digestibilidade da fibra e da proteína foram baixas, possivelmente, devido à presença de grandes quantidades de taninos e outros compostos fenólicos (HORTON et al., 1993). No entanto, de acordo com Sawal et al. (2004), as vagens de algaroba apresentam baixos níveis de tanino tóxico ao animal. Sabe-se que o tanino forma complexo com a proteína dietética e enzimas endógenas, reduzindo o suprimento de nitrogênio (N) ao animal. Porém, poucas pesquisas sobre os efeitos destes polifenólicos sobre a função ruminal têm sido realizadas.

O farelo da vagem de algaroba apresenta 40,2% de FDN, 50,0-64,0% de carboidratos

solúveis em detergente neutro (CSDN), sendo que açúcares e amido perfazem 43% da matéria seca (MS) total (SILVA, S.A. et al., 2001; MAHGOUB et al., 2005a), consistindo, dessa forma, uma fonte importante de CSDN para formulação de dietas para cabras leiteiras mais especializadas.

Pesquisas apontaram resultados encorajadores da utilização das vagens de algaroba na dieta de rebanhos de várias espécies animais em muitos países. Estudos no Brasil mostraram que o farelo de vagem de algaroba poderia substituir até 600 g/ kg do farelo de trigo para vacas em lactação, esses estudos indicaram aumento do ganho de peso e produção de leite com o aumento na proporção do farelo da vagem. Outro trabalho, substituindo o melaço de cana-deaçúcar pelas vagens de algaroba a 0, 150, 300, 450 e 600 g/ kg mostrou efetivo ganho de peso quando se utilizou níveis de 300 e 450 g/ kg (HABIT e SAAVEDRA, 1988; MAHGOUB et al., 2005b). No México, a substituição do farelo de sorgo pelo farelo da vagem de algaroba até 450 g/ kg aumentou o ganho de peso corporal de ovinos (MAHGOUB et al., 2005b). Mahgoub et al. (2005b) relataram que quando incorporaram níveis até 200 g/ kg não houve comprometimento do desempenho dos animais, verificaram ainda, que houve um aumento linear na ingestão do alimento quando os níveis encontravam-se entre 100 e 200 g/ kg, observaram também que os caprinos ganharam peso consideravelmente com o nível de 200 g/ kg por um período de oito semanas, enquanto aqueles alimentados com nível de 300 g/ kg a ingestão foi reduzida e obtiveram menor peso.

Leguminosas, incluindo as espécies do gênero *Prosopis*, contêm um alto teor de proteína, em geral maior do que o das gramíneas. Porém, o valor nutritivo das leguminosas forrageiras é prejudicado devido à presença de toxinas e fatores antinutricionais, como polifenólicos (taninos) e aminoácidos não-protéicos, que limitam sua utilização como alimento para animais (SATISH et al., 1999; BHATTA et al., 2007). Desta forma, além dos estudos sobre os efeitos desta fonte de alimento sobre a produção de leite e de carne, é muito importante também avaliar seus efeitos sobre a microbiota ruminal, a qual pode interferir na saúde do rebanho, uma vez que a algarobeira apresenta várias classes de substâncias tóxicas capazes de induzir toxicidade sistêmica em animais. Entretanto, faltam informações científicas sobre os microrganismos ruminais capazes de metabolizar estes compostos e reduzir seus efeitos tóxicos.

Extratos das sementes e folhas de *Prosopis juliflora* têm demonstrado diversos efeitos farmacológicos *in vitro* como propriedade antibacteriana (AQUEEL et al., 1989; SATISH et al., 1999), antifúngica (AHMAD et al., 1989; KAUSHIK et al., 2002) e antiinflamatória (AHMAD et al., 1989). Estas propriedades foram atribuídas a presença de substâncias alcalóides (AHMAD et al., 1989), que foram isoladas como 3'-oxo-juliprosopina, secojuliprosopinal, uma mistura de 3-oxo- e 3'-oxo-juliprosina (NAKANO et al., 2004a), além da juliprosina e juliprosopina que são inibidoras de crescimento de plantas (NAKANO et al., 2004b). Um outro alcalóide isolado da *P. juliflora* denominado julifloricina exerce atividade antimicrobiana

significante principalmente sobre bactérias Gram positivas. Este efeito foi comparado à ação da benzil penicilina, gentamicina e trimetropina (AQEEL et al., 1989; NAKANO et al., 2004b).

A intoxicação com *P. juliflora* já foi relatada nos Estados Unidos, Peru e no Brasil. Primeiramente descrito por Figueiredo et al. (1995) uma doença conhecida como "cara-torta", caracterizada por alterações neuromusculares, incluindo atrofia muscular do masséter, gliose, lesões dos neurônios do núcleo do nervo trigêmeo. Igualmente, Tabosa et al. (2000) relataram que caprinos alimentados com 600 e 900 g de vagem de algaroba por kg de ração apresentaram tremores mandibulares, principalmente durante a ruminação. Estes autores concluíram que isso foi causado pela toxicidade seletiva aos neurônios de núcleos de nervos cranianos. No entanto, Mahgoub et al. (2005b) não observaram manifestação da doença em caprinos, provavelmente devido ao curto período de alimentação e/ou à utilização de menor proporção da vagem na dieta, que foi no máximo de 300 g/ kg.

Recentemente, um estudo realizado na Universidade Federal da Bahia avaliando a atividade biológica do extrato de alcalóides de vagens de *P. juliflora* verificou efeito tóxico direto destes sobre os astrócitos, células gliais responsáveis pela homeostase e detoxificação no Sistema Nervoso Central (SILVA et al., 2007) e uma possível conexão com os fenômenos observados por Figueiredo et al. (1995) e Tabosa et al. (2000). Além disso, Choudhary et al. (2005) mostraram que o alcalóide juliflorina é um inibidor não-competitivo da acetilcolinesterase e também apresenta atividade bloqueadora dos canais de Ca²⁺ que poderia envolver espasmos neuromusculares observados em animais intoxicados por *P. juliflora*. Em estudo realizado por Mazzuca et al. (2003), avaliando o extrato de três espécies de *Prosopis*, verificaram que todos os extratos obtidos com éter apresentavam atividade antibacteriana, e a atividade antifúngica foi percebida quando a extração foi realizada com metanol e água. No entanto, não existe conhecimento sobre a ação real que estes alcalóides exercem sobre a microbiota ruminal.

McSweeney et al. (2001) ao estudarem os efeitos da leguminosa *Calliandra calothyrsus* sobre a síntese e diversidade microbiana no rúmen, concluíram que esta fonte de alimento causou alterações significativas na população microbiana, sem afetar a eficiência de síntese de proteína ruminal.

Krause et al. (2004), avaliando os efeitos de *Acacia angustissima*, também uma leguminosa, sobre a diversidade microbiana no rúmen de ovinos, observaram que as populações fibrolíticas de *Fibrobacter* e *Ruminococcus* aumentaram com a utilização de acácia na dieta. As cepas de *Selenomonas* tenderam a ser resistentes ao tanino presente nesta leguminosa e *Butyrivibrio fibrisolvens* foi sensível. Por outro lado, cepas de *Streptococcus bovis* foram sensíveis, enquanto *Streptococcus gallolyticus* foi resistente.

O metabolismo microbiano pode ser explorado para assegurar que os nutrientes dos alimentos sejam utilizados eficientemente pelo animal e/ou que as substâncias tóxicas sejam

eliminadas e seus efeitos sobre o animal reduzidos. Para tanto, existe a necessidade de um diagnóstico para monitorar a adequação da nutrição protéica para otimizar a eficiência da utilização de nitrogênio (PINA et al., 2006).

Na prática, o ajuste da ingestão de proteína e energia é complexo. Perdas durante o armazenamento e seleção da dieta pelo animal podem explicar porque os alimentos analisados não são completamente representativos dos alimentos realmente consumidos. Portanto, outros parâmetros facilmente mensuráveis podem ser de grande valor prático, como indicadores adicionais para a manipulação do suprimento de proteínas (PINA et al., 2006).

2.1. Síntese de Proteína Microbiana no Rúmen

Quantidades adequadas de proteína degradável no rúmen (PDR) são necessárias para ótima eficiência de síntese microbiana (NRC, 2001). Para que a síntese de proteína microbiana não seja prejudicada, é necessário, além da disponibilidade de N em quantidades suficientes, o sincronismo com a disponibilidade energética no rúmen.

Na nutrição protéica de ruminantes, é fundamental a estimativa acurada da síntese de proteína microbiana ruminal e de sua contribuição em aminoácidos digestíveis para o animal. Esquemas de alimentação que alteram a produção de proteína microbiana afetam a quantidade e a qualidade da proteína que chega ao intestino delgado (MOSCARDINI et al., 1998). A quantidade e a qualidade da proteína absorvida no intestino podem limitar a produção de leite (LONDOÑO HERNÁNDEZ et al., 2002; PINA et al., 2006).

A síntese de proteína microbiana no rúmen supre de 60 a 85% das exigências para manutenção, crescimento, gestação e lactação em ruminantes (DALY et al., 2001; TIMMERMANS Jr. et al., 2000). Uma estratégia de alimentação voltada para a maximização da fermentação ruminal pode aumentar o consumo de MS como também permitir o uso eficiente da PDR. A produção de proteína microbiana é diretamente relacionada à quantidade de carboidratos fermentescíveis, de PDR (ERASMUS, 1999) e de minerais (MACKIE e THERION, 1984).

Muitas técnicas usadas para mensurar o fluxo de N-microbiano requerem animais preparados cirurgicamente. Em conseqüência disso, tem havido interesse crescente no desenvolvimento de técnicas não invasivas. A excreção de derivados de purinas pode constituir um método simples, não invasivo para estimar a produção de proteína microbiana.

Os ruminantes são animais diferentes dos animais não ruminantes, no que diz respeito ao valor da proteína ingerida, pois para os ruminantes a proteína ingerida está submetida ao

ataque da população microbiana presente no rúmen, onde sofre degradação e síntese antes da sua passagem ao abomaso e intestino delgado (SILVA et al, 2005).

As exigências de proteína dos ruminantes são atendidas pelos aminoácidos absorvidos no intestino delgado, sendo estes provenientes, principalmente, da proteína microbiana sintetizada no rúmen, da proteína de origem alimentar não degradada no rúmen e da proteína endógena. Para atender as exigências de proteína metabolizável dos ruminantes é necessário conhecer a quantidade de proteína microbiana que chega diariamente ao intestino delgado (VALADARES FILHO, 1995). A proteína microbiana que alcança o intestino delgado depende da eficiência de produção microbiana e do fluxo microbiano (CAVALCANTE et al., 2006). Trabalhos de pesquisa indicaram que a proteína microbiana corresponde, em média, por 59% da proteína que chega ao intestino delgado (CLARK et al., 1992).

A quantidade de aminoácidos disponíveis para a absorção deve ser igual às necessidades de aminoácidos para atender os requerimentos de mantença e produção dos ruminantes. Contudo, quando o objetivo é atingir níveis elevados de produção, para tanto ocorre um aumento nas exigências protéicas e, para atender esta condição, há necessidade de maximizar a eficiência de síntese protéica microbiana, contanto que parte da proteína dietética ingerida não seja degradada no rúmen (BRODERICK et al., 1991).

A quantidade e qualidade da proteína que chega ao intestino delgado são moduladas pelos efeitos combinados de degradação e síntese no rúmen. Considerando que os aminoácidos representam aproximadamente 80% da proteína bruta microbiana (PBmic), os cálculos do valor biológico da PBmic sugerem que o valor das proteínas verdadeiras presentes nesta fração é quase 100 (OWENS e ZINN, 1988). Quando o valor biológico da proteína da dieta é baixo, a proteína que chega ao intestino delgado é complementada pela ação microbiana, pelo fato da fonte dietética ser modificada, havendo uma compensação pela síntese de proteína microbiana (OWENS e ZINN, 1988; SILVA et al., 2005). No entanto, quando é elevado o valor biológico da proteína da dieta, a degradação microbiana que ocorre no rúmen pode reduzir esse valor biológico, pois em dietas altamente protéicas, a proteína excedente é transformada em amônia, que é absorvida e perdida como uréia na urina (OWENS e ZINN, 1988; VAN SOEST, 1994). Por esta razão diz-se que ação microbiana modifica e reduz a quantidade de proteína que chega ao intestino.

No rúmen a amônia é convertida em compostos nitrogenados para manter o metabolismo dos microrganismos e seu hospedeiro. Os microrganismos do rúmen têm grande importância como fonte de nitrogênio (N) para a síntese de proteínas. As principais fontes de N para síntese protéica consistem tanto da proteína da dieta como em nitrogênio não protéico (NNP) e, N reciclado para ser reutilizado no rúmen (OWENS e ZINN, 1988). A importância do metabolismo de nitrogênio no rúmen se deve às alterações qualitativas e quantitativas dos aminoácidos das proteínas ingeridas (SILVA et al., 2005). Os sistemas mais utilizados para

estimar os requerimentos de proteína dos ruminantes requerem a estimativa desta que é digerida e absorvida no intestino delgado. Esta estimativa deve diferenciar entre N de origem alimentar que escapa a degradação ruminal e o N de origem microbiana (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999).

Os compostos nitrogenados totais presentes no abomaso são constituídos de compostos amoniacais e não-amoniacais (CAVALCANTE et al., 2006). Os compostos nitrogenados não-amoniacais representam a maior parte dos compostos nitrogenados totais, variando de 34 a 89%, incluindo o nitrogênio proveniente da dieta e o N-microbiano, além de uma pequena fração de proteína endógena, constituída principalmente pela descamação de células epiteliais e de secreção abomasal (CLARK et al., 1992). O N-microbiano representa cerca de 40% do N amoniacal que penetra no intestino delgado em dietas com altos níveis de proteína, e representa cerca de 60% e 100% em dietas pobres, aumentando, assim, a porcentagem de proteína procedente da PBmic (OWENS e ZINN, 1988).

Para a estimação do aporte de N-microbiano se tem utilizado diversas técnicas baseadas no uso de diferentes marcadores ou indicadores microbianos. Os marcadores internos estão naturalmente presentes na célula microbiana: ácido diaminopimélico – DAPA, ácidos nucléicos – purinas e pirimidinas, ácido aminoetilfosfônico – AEPA, ou são introduzidos na célula microbiana durante seu crescimento, que são os marcadores externos: isótopos radioativos, ¹⁵N, ³⁵S para marcação de proteínas e ³²P para marcação de fosfolipídios (BRODERICK e MERCHEN, 1992; SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999).

Gomes et al. (1991) compararam os métodos do DAPA, das bases purinas e do perfil de aminoácidos (AA), utilizando ovinos alimentados com dietas à base de forragem, constituindose em três tratamentos (dieta controle, com cationomicina ou com lasalocida). Com base nos resultados, relataram que o método do DAPA superestimou a fração N-microbiana duodenal. O método das bases purinas forneceu valores mais próximos do padrão esperado para este tipo de dieta controle fornecida. Concluíram então que, estes dois marcadores foram os mais adequados para comparar a ação da lasalocida e cationomicina sobre o metabolismo de N no rúmen. Já o método baseado no perfil de AA que fluem ao duodeno, neste estudo, não pôde ser considerado, tendo em vista que houve a perda da acurácia na determinação da proteína microbiana e da proteína dietética por meio da interação dos coeficientes no modelo matemático, devido à composição em AA das proteínas microbianas terem sido muito semelhante ao perfil de AA proveniente da dieta nas amostras duodenais. Ocorrendo isto, o DAPA pode superestimar a produção de N-microbiano, pela excessiva concentração de parede celular bacteriana na digesta duodenal, ocasionada pela lise celular no ambiente ruminal.

Comparando o método direto, do DAPA e das bases purinas, Valadares Filho et al. (1990) concluíram que o método das bases purinas, descrito por Zinn e Owens (1982) e modificado por Ushida et al. (1985), foi adequado para estimar a produção de biomassa

microbiana. Aqueles autores observaram que os resultados obtidos com o DAPA não foram consistentes com alguns dados relatados na literatura.

Broderick e Merchen (1992) afirmaram que nenhum indicador microbiano é totalmente adequado, consequentemente, as estimativas são relativas e não absolutas.

Como estas técnicas requerem o uso de animais fistulados no abomaso ou duodeno para a coleta das amostras e o uso simultâneo de marcadores de fluxo da digesta (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999), existe um grande interesse em desenvolver métodos não-invasivos para a determinação da proteína microbiana. Rennó et al. (2000a), trabalhando com bovinos fistulados, observaram que não houve diferenças entre a produção microbiana determinada pelo método das bases purinas no abomaso e pela excreção de derivados de purinas.

O uso dos derivados de purinas como indicador para estimar a síntese microbiana no rúmen foi primeiramente proposto por Blaxter e Martin em 1962, citados por Fujihara et al. (1987). Sendo que, Topps e Elliott, em 1965, demonstraram que existia uma correlação positiva entre a quantidade de alantoína e ácido úrico excretados na urina e o fluxo de ácidos nucléicos no duodeno (FUJIHARA, 1987; SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999; VALADARES FILHO et al., 2007).

As pesquisas no decorrer dos anos confirmaram a relação entre o fluxo duodenal de bases púricas e a excreção urinária de derivados de purinas (CHEN et al., 1990b; BALCELLS et al., 1991; GIESECKE et al., 1994; PEREZ et al., 1996; GONZALEZ-RONQUILLO et al., 2003; MOORBY et al., 2006). Então, assumiu-se que a absorção de purinas estaria condicionada à quantidade de proteína microbiana, estimada a partir da excreção urinária de derivados de purinas: alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina (GIESECKE et al., 1994).

Puchala e Kulasek (1992), Vagnoni et al. (1997), Funaba et al. (1997) e Johnson et al. (1998) observaram correlação positiva entre o fluxo de N-microbiano no duodeno e a excreção urinária de derivados de purinas em carneiros, em vacas com fístulas ruminais, novilhos e vacas fistuladas no rúmen e duodeno, respectivamente.

2.1.1. Origem dos Derivados de Purinas

Os derivados de purinas têm origem a partir dos ácidos nucléicos que são formados por uma pentose (ou *ose*) no ácido desoxirribonucléico (DNA) que é uma desoxirribose. O prefixo *desoxi* indica que o átomo de carbono 2 da *ose* não tem o átomo de oxigênio que está ligado ao átomo de carbono 2 da ribose (*ose* do ácido ribonucléico, RNA) como mostrado na Figura 1. As

oses nos ácidos nucléicos são ligados umas as outras por pontes fosfodiéster. Especificamente, a hidroxila 3' (OH 3') da fração ose de um nucleotídeo é esterificada a um grupamento fostato, que, por sua vez, junta-se à hidroxila 5' da ose adjacente. A cadeia de oses ligadas por pontes fosfodiéster é chamada de arcabouço ou espinha dorsal do ácido nucléico (Figura 2). Enquanto o arcabouço é constante no DNA e RNA, as bases variam de um monômero para o seguinte (NELSON e COX, 2002; BERG et al., 2004).

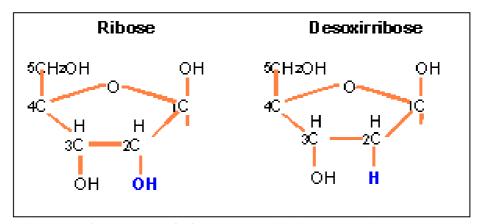


Figura 1 – **Ribose e Desoxirribose** (Adaptado de BERG et al., 2004).

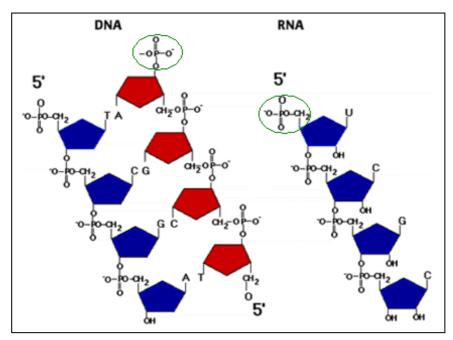


Figura 2 – **Arcabouços de DNA e RNA.** Os arcabouços destes ácidos nucléicos são formados por ligações fosfodiéster de 3' para 5'. Uma *ose* está destacada em vermelho e azul no DNA e de azul no RNA, e o fosfato circulado em verde (Adaptado de BERG et al., 2004).

Os nucleotídeos são necessários para muitos processos vitais, eles são os precursores ativados dos ácidos nucléicos (BERG et al., 2004). Os nucleotídeos contêm resíduos de ácido fosfórico, em geral de uma pentose (ribose ou 2'-desoxirribose) e de uma base púrica ou pirimidínica. Quer bases púricas quer pirimidínicas são anéis heterocíclicos aromáticos contendo átomos de azoto e carbono (Figura 3). As bases azotadas contêm informação genética, enquanto a *ose* e o fosfato possuem funções estruturais. As bases púricas podem ser entendidas como constituídas por um anel pirimidina (anel com 6 átomos: 4 de carbono e 2 de nitrogênio) ligado a um anel imidazol (anel com 5 átomos: 3 de carbono e 2 de nitrogênio), como mostra a Figura 3. São bases púricas a adenina (6-aminopurina), a guanina (2-amino-6-oxipurina), a hipoxantina (6-oxipurina) e a xantina (2,6-dioxipurina). São bases pirimidínicas a citosina (2-oxi-4-aminopirimidina), a uracila (2,4-dioxipirimidina), a timina (2,4-dioxi-5-metilpirimidina) e o ácido orótico (2,4-dioxi-6-carboxipirimidina) (NELSON e COX, 2002; BERG et al., 2004).

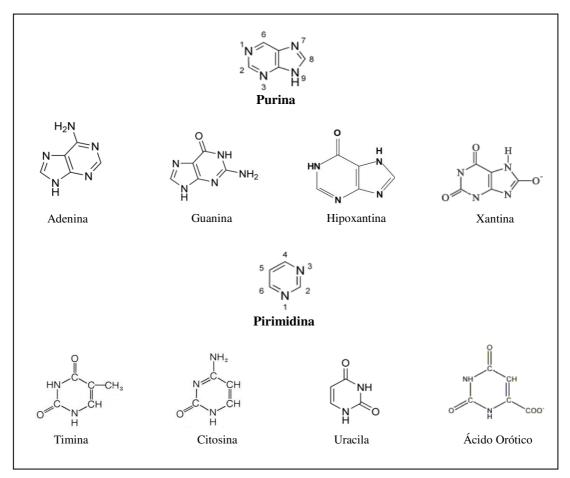


Figura 3 – Purina (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) e Pirimidina (timina, citosina, uracila, ácido orótico) (Adaptado de BERG et al., 2004).

Os nucleotídeos purínicos podem ser sintetizados de dois modos distintos. Primeiro, as bases purínicas livres, derivadas da renovação de nucleotídeos ou da dieta, podem ser ligadas ao fosforibosilpirofosfato (PRPP) formando monofosfatos purínicos. Existem duas vias de recuperação com especificidades diferentes para recuperação de bases purínicas. A *adenina fosforibosil* catalisa a formação de adenilato:

ao passo que a *hipoxantina-guanina fosforribosil transferase* (HGPRT) catalisa a formação de guanilato, bem como inosinato (inosina monofosfato, IMP, que é o nucleosídeo que contém hipoxantina (Figura 4) (BERG et al., 2004):

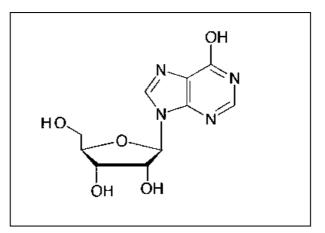


Figura 4 – Inosinato ligado ao nucleosídeo hipoxantina (BERG et al., 2004).

Segundo, na síntese *de novo* das purinas, os intermediários contêm ribose-5'-fosfato e o primeiro nucleotídeo formado é a inosina-5'-fosfato (IMP) cuja base é a hipoxantina. Na primeira reação a ribose-5'-fosfato, funciona como um aceitador dos fosfatos $\beta - \gamma$ do ATP que se ligam no carbono um (1) da ribose gerando o PRPP, esta reação é catalisada pela PRPP sintetase. Para as purinas o PRPP fornece a "fundação" sobre a qual as bases são construídas, sendo ligadas diretamente à ribose (NELSON e COX, 2002).

2.1.2. Catabolismo de Purinas

Hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína são os produtos finais do catabolismo das purinas, em ruminantes, são excretados na urina e leite, e coletivamente são conhecidos como derivados de purinas (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999).

Os derivados de purinas excretados são originados de três possíveis fontes: bases purínicas de microrganismos ruminais; purinas dietéticas e, purinas de origem endógena, esta última fonte resulta das alterações teciduais dos animais (Figura 5) (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999). Segundo esses autores os derivados de purinas em ruminantes são provenientes principalmente dos ácidos nucléicos de microrganismos ruminais que fluem e são digeridos e absorvidos no duodeno. A partir de diversos estudos foi considerado que ácidos nucléicos de origem alimentar são degradados no rúmen, por esta razão quase não contribuem na excreção urinária dos derivados de purinas. Embora, Perez et al. (1996) relataram que derivados de purinas podem ter origem de purinas dietéticas que escapam da digestão ruminal, o fluxo destas purinas depende da natureza da dieta. Observaram que 10% de farinha de peixe ou de carne na dieta de ovinos resultaram em 6 a 10% de purinas de origem dietética no duodeno. Já animais em pastejo e com baixo nível de suplementação, a contribuição de purinas da dieta foi nula ou mínima.

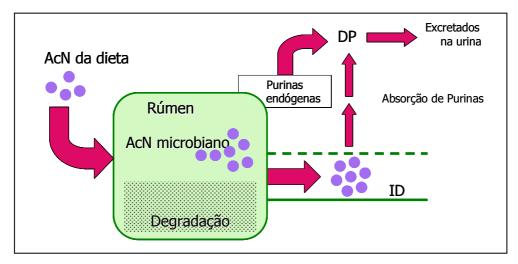


Figura 5 – Apresentação esquemática do princípio do método. AcN – ácidos nucléicos; DP – derivados de purinas; ID – intestino delgado (Adaptado de CHEN e GOMES, 1992).

Os ácidos nucléicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana justamente porque os alimentos sofrem extensa degradação no rúmen, resultado da fermentação microbiana. Absorvidos estes ácidos nucléicos são degradados e excretados na urina como seus derivados (hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína) (Figura 6). A excreção dos derivados de purinas está diretamente relacionada à absorção de purinas. Com o conhecimento da razão N-purina: N-total na biomassa microbiana, a absorção de N-microbiano pode ser calculado a partir da quantidade de purina absorvida que é estimada da excreção urinária de derivados de purina (CHEN e GOMES, 1992).

Os dois nucleotídeos purínicos originais dos ácidos nucléicos são adenosina 5'-monofosfato (AMP), também chamado de adenilato e guanosina 5'-monofosfato (GMP), ou guanilato. Estes nucleotídeos contêm, respectivamente, adenina e guanina. Os nucleotídeos das purinas são degradados e o grupo fosfato é perdido. O adenilato produz adenosina (Figura 6), que pode ser deaminada a inosina por ação catalítica de uma hidrolase, a adenosina deaminase (adenosina + $H_2O \rightarrow$ inosina + NH_3). A inosina por ação de uma fosforilase perde a pentose e gera a hipoxantina e a D-ribose (inosina + $Pi \rightarrow$ hipoxantina + ribose-1-fosfato) (NELSON e COX, 2002). As oxidações da hipoxantina a xantina e de xantina a ácido úrico são responsabilidade de uma mesma enzima, a xantina oxidase (XO), uma flavoproteína contendo ferro e molibdênio (Figura 6) (CHEN e GOMES, 1992; NELSON e COX, 2002).

O metabolismo do guanilato também produz ácido úrico (uma substância que contém o anel purina intacto) como produto final. O GMP é hidrolisado, produzindo o nucleosídeo guanosina, que é clivado em guanina pela ação da enzima nucleosídeo fosforilase (guanosina + Pi → guanina + ribose-1-fosfato) (Figura 6). A guanina é deaminada produzindo a xantina, que

é convertida em ácido úrico. A transformação da guanina em xantina é responsabilidade da guanina deaminase que catalisa a deaminação hidrolítica (guanina + $H_2O \rightarrow xantina + NH_3$) (NELSON e COX, 2002).

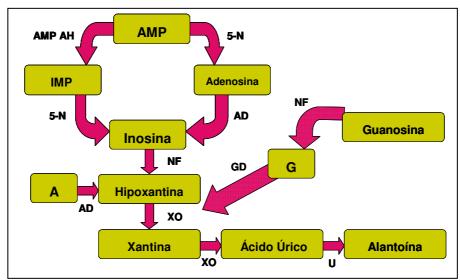


Figura 6 - Degradação de nucleotídeos purínicos e formação de DP. AMP – adenosina 5'-fosfato; AMP AH – AMP aminohidrolase; IMP – Inosina 5'-fosfato; 5-N – 5'-nucleotidase; AD – adenosina deaminase; NF – nucleosídeo fosforilase; G – guanina; GD – guanina deaminase; XO – xantina oxidase; U – uricase (Adaptado de CHEN e GOMES, 1992).

Algumas das bases são reutilizadas formando nucleotídeos por vias de recuperação. Outras são degradadas a produtos que são excretados (CHEN e GOMES, 1992). Na evolução da espécie humana, uma enzima produzida no fígado foi perdida, a uricase e só restou a xantina oxidase. As aves, répteis, peixes e os ruminantes que conservaram a uricase conseguem oxidar o urato em alantoína, uma substância 80 a 100 vezes mais solúvel que o urato e que é facilmente excretada pelo rim. Isto permite que esses animais tenham níveis muito baixos de ácido úrico (BUSATO, 2007).

Chen et al. (1990a) estudando as diferenças entre bovinos e ovinos, observaram que não havia metabolismo de ácido úrico no plasma tanto de bovinos quanto de suínos, indicando ausência da ação da uricase. Entretanto, com o plasma de ovinos, houve um sutil decréscimo de ácido úrico o valor médio equivalente à atividade da uricase foi de 29 nmol/ minuto por L de plasma. Em 1999, Moriwari et al. relataram que a uricase também está presente nos rins de bovinos.

Em um estudo realizado em ratos mostrou que não há qualquer atividade da uricase em tecidos extrahepáticos, incluindo a glândula mamária (MOTOJIMA e GOTO, 1990). Em uma

tentativa de encontrar uma enzima capaz de ser usada como um marcador para os componentes da membrana do tecido mamário de vacas, foi identificado alguma atividade da uricase neste tecido (BAUMRUCKER e KEENAN, 1975 – citados por GIESECKE et al., 1994), indicando que a oxidação enzimática de ácido úrico tem um importante papel na secreção de alantoína no leite. Embora, ainda não tenha sido possível a quantificação da atividade da uricase na glândula mamária (GIESECKE et al., 1994).

2.1.3. Metabolismo das Purinas nos Ruminantes

Os microrganismos ruminais são ricos em ácidos nucléicos: cerca de 18% do N total estão presentes nos ácidos nucléicos, sendo que, destes, 11% estão nas purinas (VALADARES FILHO et al., 2007). Os ácidos nucléicos microbianos deixam o rúmen e são submetidos à digestão extensiva no intestino delgado. No intestino, os nucleotídeos purínicos são hidrolisados em nucleosídeos e bases livres. Ambas as formas podem ser absorvidas no intestino. A digestibilidade de ácidos nucléicos é acima de 85% (CHEN e GOMES, 1992), sendo que o valor mais comumente usado nesta técnica é de 91% (CHEN et al., 1990a).

Existem diferenças entre as diversas espécies animais, na Figura 7, observa-se diferença entre ovinos e bovinos. Em bovinos, há uma maior atividade da enzima XO na mucosa intestinal, que converte praticamente todas as purinas absorvidas em ácido úrico. O resultado é que o ácido úrico absorvido pelo fígado não é utilizado pelo animal para incorporação nos ácidos nucléicos teciduais. Em ovinos, a atividade da XO é insuficiente e por isso, as purinas absorvidas podem entrar inalteradas no fígado e serem disponibilizadas para incorporação pelos ácidos nucléicos teciduais, este processo é conhecido como "salvação" ou recuperação. Ambas as vias de recuperação e degradação enzimática são muito ativas e podem ser competidoras pelos substratos. O resultado é que, aquelas absorções de purinas que não foram incorporados aos ácidos nucléicos teciduais são completamente convertidas aos seus metabólitos e produtos finais, hipoxantina xantina, ácido úrico e alantoína (CHEN e GOMES, 1992).

A marcante diferença da atividade de xantina oxidase e a ausência de uricase ou baixa atividade de uricase no sangue destas espécies animais pode explicar o porquê da concentração de ácido úrico no plasma de bovinos ser consideravelmente mais alta do que aquelas no plasma de ovinos (CHEN et al., 1990a).

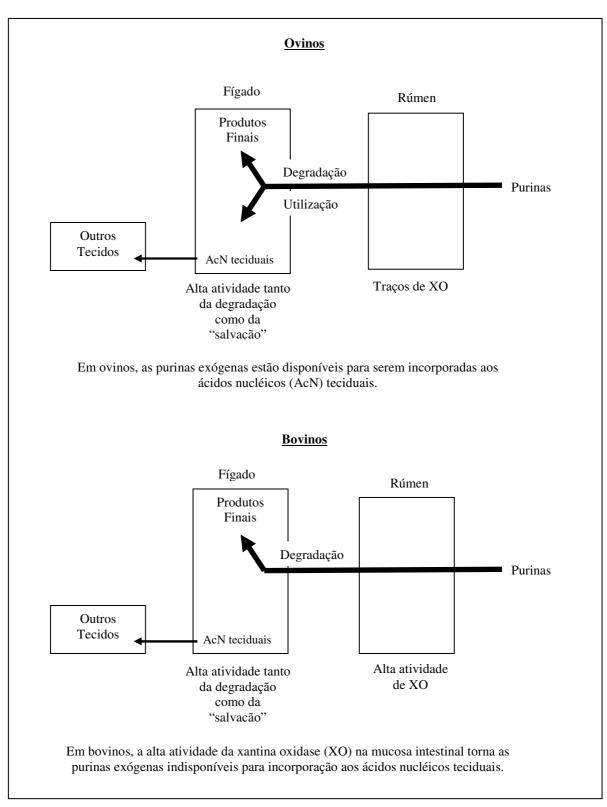


Figura 7 – Diferenças entre ovinos e bovinos na utilização de purinas exógenas (Adaptado de CHEN e GOMES, 1992).

2.1.4. Derivados de Purinas de Origem Endógena

Os derivados de purinas que entram na circulação sanguínea podem também ser provenientes da degradação de ácidos nucléicos teciduais, esta fração é chamada de "derivado de purina endógena". A excreção de derivados de purinas endógena é três vezes maior em bovinos que ovinos por quilo de peso metabólico (150 e 530 µmol/ kg PV^{0,75} por dia para ovinos e bovinos, respectivamente) (CHEN et al. 1990a). Ovinos, caprinos, porcos e humanos são muito similares na proporção da excreção endógena sobre a base de peso metabólico. A diferença em distribuição tecidual de XO pode ser a razão para as diferenças entre estas espécies (CHEN e GOMES, 1992). A fração endógena também não é constante entre as espécies e dentro das espécies (CHEN et al. 1990a; ORELLANA BOERO et al., 2001). Bovinos têm alta atividade de XO na maioria dos tecidos, incluindo o sangue, enquanto os ovinos têm baixa atividade de XO na maioria dos tecidos e nenhuma no sangue. A alta atividade de XO desviará mais purinas para a degradação (CHEN et al., 1990a; CHEN e GOMES, 1992).

Inicialmente, a excreção endógena foi estimada em animais em jejum, obtendo-se resultados variados (32-208 μmol de alantoína/ kg PV^{0,75}, em ovinos), o que resultou em algumas críticas sobre o efeito do jejum prolongado em relação à atividade metabólica do animal e a taxa de degradação de ácidos nucléicos (CHEN e ØRSKOV, 2003). A medida da intensidade da excreção endógena tem sido feita com auxílio da técnica de infusão intragástrica ou técnica de substituição de digesta que entra no intestino delgado (CHEN e GOMES, 1992). Com esta técnica, a fermentação microbiana é eliminada, mas a nutrição do animal mantida pelo fornecimento de nutrientes como ácidos graxos voláteis e caseína, infundidos continuamente no rúmen e no abomaso, respectivamente (VALADARES FILHO et al., 2007). Essa técnica apresentou resultados menos variáveis (165-209 μmol de derivados de purinas/ kg PV^{0,75}, em ovinos) em relação à anterior, sendo que Chen et al. (1990b) sugeriram valores de 168 μmol/ kg PV^{0,75} para ovinos e 514 μmol/ kg PV^{0,75} para bovinos. Uma marcada diferença foi observada entre as duas espécies, a qual foi atribuída pelos autores a uma diferença na atividade da enzima XO.

Durante a abstinência alimentar evidencia-se que não há estagnação no fluxo de bases purinas, no entanto este poderia ser o método de escolha para reduzir o aporte de bases purinas de origem exógena, porquanto não há outra metodologia disponível (BELENGUER et al., 2002). Esses autores trabalhando com excreção de derivados de purinas e predição do fluxo microbiano ruminal em caprinos, observaram uma baixa atividade de XO na mucosa intestinal, fígado e plasma, determinaram uma baixa extensão de oxidação de derivados de purinas irreversíveis de nucleotídeos teciduais, o que justificaria o nível de excreção endógena

encontrado, 202 μ mol/ kg PV^{0,75}, similar ao encontrado para ovinos, 158 μ mol/ kg PV^{0,75} (BALCELLS et al., 1991).

A existência de uma fração endógena nos derivados de purinas excretados foi confirmada em diversos experimentos, utilizando diferentes metodologias, e mostrou-se variável. Valores, em mmol/ kg PV^{0,75}, de 0,259 a 0,530 para vacas lactantes foram citados por Gonzalez-Ronquillo et al. (2003), que encontraram média de 0,512 para vacas em diferentes estádios de lactação. Orellana Boero et al. (2001) estimaram menores valores de excreções endógenas em vacas secas (0,236 mmol/ kg PV^{0,75}) em relação aqueles citados para vacas em lactação. Em novilhos ou novilhas, Fujihara et al. (1987) e Giesecke et al. (1994), encontraram médias de 0,455 e 0,489 mmol/ kg PV^{0,75}, respectivamente. As diferenças entre as observações encontradas na literatura são provavelmente pela utilização de diferentes técnicas e a possíveis variações no metabolismo dos ácidos nucléicos em animais em diferentes estádios fisiológicos (crescimento, lactação, gestação e mantença). Entretanto, Chen et al. (1990a) obtiveram resultados que sugeriram não haver diferenças entre bovinos em diferentes estádios fisiológicos, trabalharam neste experimento com novilhos, novilhas e vacas em lactação.

Quando se usa a excreção de derivados de purinas para calcular a quantidade de purina exógena absorvida pelo animal, precisa-se corrigir para a contribuição de derivados de purinas de origem endógena. Em ovinos, quando se leva em consideração a contagem de purinas exógenas utilizadas pelo animal, a contribuição endógena (por exemplo, a perda endógena menos purinas exógena utilizada) é reduzida, porque há uma disponibilidade para o crescimento animal, daí a contribuição endógena decresce para praticamente zero. A resposta da curva de excreção de derivados de purinas vs absorção de purina não é linear como mostram Chen et al. (1990a) e Balcells et al. (1992). Em bovinos, desde que as purinas exógenas não estejam disponíveis para utilização pelo animal, a perda de purina deve ser substituída pela síntese de novo. Como um resultado, há sempre uma contribuição endógena para excreção total na urina. A resposta da curva de excreção de derivados de purinas vs purinas absorvidas é linear. Agora está claro que há necessidade de se usar equações diferentes para as diversas espécies animais para que seja possível calcular a absorção de purina por meio da excreção diária de derivados de purinas (CHEN e GOMES, 1992).

Os derivados de purinas, tanto de origem endógena quanto exógena são absorvidos para o sangue rapidamente. Sendo que a rota primária para o destino dos produtos finais das purinas é a excreção urinária. A alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina estão presentes na urina de ovinos, mas somente a alantoína e ácido úrico estão presentes na urina de bovinos (CHEN e GOMES, 1992). Alguns dos derivados de purinas no sangue também estão disponíveis por rotas não renais, como pela secreção estomacal, saliva e secreção do leite. Uma vez que a alantoína e ácido úrico são secretados dentro do estômago eles não retornam ao sangue para serem, então, secretados pela urina (CHEN e GOMES, 1992).

2.1.5. Recuperação de Purinas Exógenas como Derivados Purínicos

Existem informações e vários modelos quantitativos de resposta para bovinos, ovinos e caprinos que permitem o uso desta técnica. Segundo Chen et al. (1990b), a excreção urinária de derivados de purinas pelos ruminantes pode ser usada para estimar o fluxo intestinal de proteína microbiana, uma vez que a relação quantitativa entre a excreção de derivados de purinas e absorção de purinas tenha sido determinada.

Alguns parâmetros usados nos modelos não foram ainda definidos ou confirmados, entre eles a eficiência da recuperação de purinas exógenas absorvidas, que de acordo com Sandoval-Castro e Herrera-Gomes (1999), envolvem três fatores de correção: a taxa de recuperação do indicador (derivados de purinas excretado: N-purinas absorvidas); a excreção real de origem microbiana (derivados de purinas endógenos: derivados de purinas exógenos); a digestibilidade do indicador; N-purínico: N-total dos microrganismos ruminais e, proporção do indicador no substrato.

A relação entre as purinas excretadas na urina e o fluxo das bases purínicas ao duodeno tem sido determinada mediante a infusão pós-ruminal de purinas, RNA e proteína microbiana (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999). A eficiência de recuperação é aparentemente muito variável para ovelhas (0,15 a 1,0) e apresenta uma resposta não linear (CHEN et al, 1990b; BALCELLS et al., 1991). Em bovinos devido à alta atividade de xantina oxidase distribuída no intestino delgado e plasma, as bases purinas absorvidas são catabolizadas, resultando numa relação linear entre purinas exógenas e derivados de purinas na urina com uma recuperação maior (0,65 a 0,77) (CHEN et al. 1990b; VERBIC et al., 1990b).

A variabilidade encontrada inicialmente nos estudos sobre recuperação, foi devido à falta do conhecimento do aporte endógeno e da capacidade de utilização de purinas exógenas em substituição à síntese *de novo*. Tanto para bovinos quanto para ovinos, a recuperação média na base molar em nível urinário é de 0,84 após a correção da contribuição de derivados de purinas endógenos e da digestibilidade (SANDOVAL-CASTRO e HERRERA-GOMES, 1999). Da mesma forma, Pimpa et al. (2001) afirmaram que a relação entre a excreção urinária de derivados de purinas e o fluxo de proteína microbiana no duodeno estimada em zebuínos, foi linear, com uma taxa de excreção urinária estimada de 0,85, valor também relatado para bovinos por outros autores. Semelhantemente a recuperação das purinas absorvidas em novilhos foi de 0,87 (BECKERS e THÉWIS, 1994) e de 0,85 (CHEN e GOMES, 1992). Em vacas secas, Orellana Boero et al. (2001) relataram recuperação de 0,84, enquanto Vagnoni et al. (1997) encontraram recuperações de 0,83 a 0,86. Em vacas lactantes, Gonzalez-Ronquillo et al. (2003) relataram recuperação de 0,56 a 0,70.

Em experimento conduzido por Belenguer et al. (2002), realizado em caprinos, revelou uma recuperação urinária de derivados de purinas de 0.76, resultado próximo àqueles obtidos em ovinos, por Chen et al. (1990a) e Balcells et al. (1991), de 0.84 - 0.80, e em vacas, por Verbic et al. (1990a), de 0.77 - 0.73.

Tebot et al. (2002), testando duas dietas para ovinos que forneceram 17,4 e 7,5 g de N/ dia e utilizando teste de função renal para estudos de excreção da uréia e a excreção de alantoína como método indireto para estimar a produção de proteína microbiana, observaram que na dieta deficiente em N, o fluxo plasmático reduziu, assim como a taxa de filtração glomerular (TFG). Isto provocou uma queda na excreção urinária de alantoína e de uréia, o que pode ter subestimado os compostos nitrogenados no intestino delgado, neste experimento.

Inversamente, Valadares et al. (1999), observaram que a TFG não foi afetada pela ingestão de matéria seca (MS) em um estudo utilizando vacas em lactação com níveis crescentes de concentrado na dieta. Esses autores verificaram que a maior concentração de alantoína no plasma coincidiu com a produção mais elevada de N-microbiano e que a proporção de alantoína urinária em relação à excreção total de derivados de purinas não foi afetada pelo nível de concentrado, a qual situou entre 90,2 e 90,7%.

Para ovinos, Lindberg et al. (1989), Chen et al. (1990b) e Balcells et al. (1991) demonstraram que existem variações nas proporções de derivados de purinas excretados na urina, que são devido ao estado nutricional e/ ou ao fluxo de bases purínicas no duodeno. Em dietas fornecendo 80% das necessidades de mantença, ocorreu um aumento na proporção de xantina-hipoxantina e ácido úrico em relação à alantoína.

A relação de 85: 15 para as rotas de excreção de derivados de purinas na urina: saliva, glândula mamária, pode mudar drasticamente em vacas lactantes, do início da lactação ao período seco, devido às mudanças fisiológicas que ocorrem durante o período da lactação. Além disso, as variações nas proporções de alantoína e ácido úrico excretados na urina poderia ser resultado de mudanças na rota de excreção (JOHNSON et al., 1998).

Tendo em vista que existem variações nas proporções de derivados excretados na urina é recomendável quantificar os derivados de purinas totais para obter maior precisão na quantificação dessa excreção (CHEN e GOMES, 1992).

Alguns modelos são propostos para a estimativa da quantidade de bases púricas absorvidas no duodeno:

Para Ovinos:
$$Y = 0.84^a X + (0.150^b PV^{0.75} e^{-0.25*X}) \rightarrow \text{Chen et al. (1990b)}$$

$$Y = 0.938^a X + (0.2076^b PV^{0.75} e^{-0.14*X})$$

$$Y = 0.8015^a X - 0.0437, X > Xs \rightarrow \text{Balcells et al. (1991)}$$

$$Y = 0.1326 PV^{0.75}$$
 , $X < Xs$
 $Y = 0.57 X + 2.3$ \rightarrow Perez et al. (1991)

Para Bovinos:
$$Y = 0.77 \, ^a X + (0.333 \, ^c + 0.95 \, ^d e^{-0.16*X}) \, PV^{0.75}$$

$$Y = 0.85 \, ^a X + (0.385 \, ^b PV^{0.75}) \qquad \rightarrow \quad \text{Verbic et al. (1990a)}$$

$$Y = 0.84 \, ^a X + (0.236 \, ^b PV^{0.75}) \qquad \rightarrow \quad \text{Orellana Boero et al. (2001)}$$

$$Y = 0.847 \, ^a X + (0.275 \, ^b PV^{0.75}) \qquad \rightarrow \quad \text{Pimpa et al. (2001)}$$
Para Caprinos: $X = \underbrace{Y}_{0.76 \, ^a}$.

Em que:

Y → excreção de derivados de purinas endógenos e exógenos na urina (mmol/ d)

 $X \rightarrow$ bases purínicas absorvidas no duodeno (mmol/ d)

 $Xs \rightarrow ponto de substituição da síntese <math>de \ novo$ de purinas por purinas exógenas absorvidas

 $a \rightarrow taxa$ de recuperação das purinas absorvidas (eficiência de absorção de purinas exógenas)

b → excreção endógena de derivados de purinas (mmol/ d)

c → excreção endógena inevitável de derivados de purinas (mmol/d)

 $d \rightarrow$ excreção exógena de derivados de purinas expressa em mmol/ d (síntese *de novo*) que pode ser evitada pela utilização de bases purinas absorvidas

 $* \rightarrow$ constante que define a taxa de substituição da síntese de novo por purinas exógenas absorvidas

Segundo Chen e Gomes (1992), as principais limitações do método são:

- No cálculo, assume-se que há pouco ácido nucléico de origem alimentar alcançando o intestino delgado. Isto poderia ser verdadeiro para a maioria das dietas, mas não seria quando os animais são alimentados com quantidade elevada de farinha de peixe.
- 2) O cálculo do fluxo de N-microbiano de conteúdo purínico assume que a razão de N-purina: N-total em *pools* de população microbiana é constante.
- 3) As equações são espécies específicas. Isto está claramente explicitado, pois as diversas espécies possivelmente diferem em seu metabolismo de purinas, impedindo a utilização de uma mesma equação para as várias espécies.

- 4) Os valores dos fluxos de N-microbiano obtidos com a excreção de derivados de purinas na urina não devem ser tomados como absolutos. Embora, os valores obtidos com o método tenham sido concordantes com os encontrados por outros métodos, estes devem ser utilizados para comparar diferenças no fluxo intestinal de N-microbiano entre tratamentos, não devendo ser assumidos como valores absolutos.
- 5) A incompleta recuperação das purinas absorvidas tem sido uma limitação da técnica. Sendo que a saliva e o leite são as principais rotas não-renais para excreção de derivados de purinas que, na maioria das vezes, não são calculados (BECKERS e THÉWIS, 1994).

2.1.6. Excreção de Alantoína

2.1.6.1. Quantificação dos Derivados de Purinas Totais vs Alantoína

Chen et al. (1990a), Balcells et al. (1991) e Puchala e Kulasek (1992) sugeriram que a medição única de alantoína é suficiente para obter os valores estimados da síntese de N-microbiano, devido a pouca variação encontrada entre as proporções de alantoína: ácido úrico, xantina-hipoxantina. Ao contrário, Fujihara et al. (1987), Lindberg et al. (1989) e Giesecke et al. (1994) sugeriram que quando todos os derivados de purinas excretados na urina são considerados, a estimativa do N-microbiano é mais preciso do que utilizando unicamente a alantoína. Deve-se considerar que Lindberg et al. (1989) relataram que em algumas ocasiões o ácido úrico representou até 50% dos derivados de purinas. Sandoval-Castro e Herrera-Gomez (1999) também encontraram que a proporção de ácido úrico urinário excretado não é constante de um experimento para outro.

A excreção dos derivados de purinas, na maioria, representada pela alantoína, foi evidenciada pelos experimentos de Vagnoni et al. (1997), Oliveira et al. (2001) e Mendonça et al. (2004) em que as excreções de alantoína representaram, 86,6, 87,8 e 90,8%, respectivamente, do total de derivados de purinas excretados. Pereira (2003) também observou uma proporção média de alantoína em relação aos derivados de purinas totais excretado na urina semelhante, de 88,41 em vacas leiteiras no terço inicial da lactação e 90,06% no terço médio da lactação.

Em bovinos, alantoína e ácido úrico são os principais derivados de purinas presentes na urina, em razão da alta atividade da enzima XO no sangue e nos tecidos, que converte xantina e

hipoxantina em ácido úrico antes da excreção. Caprinos, ovinos e suínos, no entanto, excretam quantidades substanciais de xantina e hipoxantina, em virtude da menor atividade da enzima XO no plasma (CHEN et al., 1990a; BELENGUER et al. 2002).

Em um experimento realizado por Belenguer et al. (2002) a quantidade de perdas basais de derivados de purinas foi de 11,34 mg de N-purina/ kg PV^{0,75}, em caprinos, durante o período de abstinência alimentar, apresentando valores consistentes e mais altos que os encontrados por Fujihara et al. (1991), citados por Belenguer et al. (2002), de 8,2 mg de N-purina/ kg PV^{0,75}. A excreção de alantoína observada naquele experimento foi de 128,8 μmol/ kg PV^{0,75}, representando 80 a 92% do total de derivados de purinas excretados por cabras (BELENGUER et al., 2002). Fujihara et al. (2007) encontraram resultados semelhantes em ovinos e caprinos, de 130 μmol/ kg PV^{0,75}, e observaram que a excreção urinária de alantoína decresceu durante o período de abstinência alimentar, mas que os níveis dos outros derivados purínicos não diferiram entre os períodos de alimentação, em ambas as espécies.

Lindberg (1989) trabalhando com cabritos alimentados com leite, encontraram valores médios para a excreção urinária de derivados de purinas totais de 242 μmol/ kg PV^{0,75}, constituindo a excreção de alantoína a principal proporção, 60%, seguido pela hipoxantina 26%, ácido úrico 13% e a xantina não foi detectada nas amostras de urina. Fonseca et al. (2006), recentemente, encontraram porcentagem média de alantoína excretada variando de 64,5 a 75,9 nas amostras de coleta total de urina e de 73,9 a 85,2 nas amostras de coleta *spot*. Considerando o valor observado por meio da coleta total e o estimado pela coleta *spot*, a proporção média relativa de ácido úrico variou entre 9,6 e 19,9% e a de xantina-hipoxantina, entre 5,2 e 15,6%. Valores próximos também foram encontrados por Chen e Gomes (1992), em ovinos, que relataram as proporções de 60 a 80% de alantoína, 10 a 20% de ácido úrico e 5 a 10% de xantina e hipoxantina. Em outro trabalho Chen et al. (1990a) observaram, em ovinos, que a contribuição de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina foram, respectivamente, 55, 33 e 14%.

2.1.6.2. Utilização da Secreção de Alantoína no Leite

A determinação quantitativa dos derivados de purinas no leite de ruminantes se mostra como um método prático e aplicável para uma rápida avaliação da dieta e consumo de forragens em condições de pastoreio, que necessariamente, requer mais estudos e aprimoramento nos métodos laboratoriais (ARREZA et al., 2004).

Giesecke et al. (1994) e Vagnoni et al. (1997) descreveram altas correlações entre concentrações de alantoína no plasma e no leite e a excreção urinária total de alantoína em vacas lactantes. Já Gonda e Lindberg (1997) relataram que existe pouca correlação entre a quantidade de alantoína secretada no leite com a sua excreção na urina, alegando depender da produção de leite. Esses mesmos autores observaram que quando a produção de leite é alterada por meio da proteína que escapa a degradação há um aumento concomitante na excreção da alantoína no leite sem que tenha havido um incremento do fluxo de bases purinas no duodeno. Concluindo que, a produção de leite talvez seja o fator mais importante na determinação da concentração e secreção da alantoína no leite.

Shingfield e Offer (1998) também encontraram alta correlação entre a secreção e concentração de alantoína no leite com a produção de leite, adicionalmente, relataram que a secreção de alantoína no leite foi altamente correlacionada com excreção de derivados de purinas na urina quando a produção de leite foi incluída como uma covariável no modelo estatístico.

Na maioria dos trabalhos citados na literatura, a excreção de derivados de purinas esteve positivamente correlacionada à produção de leite, provavelmente porque as mudanças na síntese microbiana ruminal estão associadas a alterações nas quantidades de proteína e energia fornecidas ao animal hospedeiro, conseqüentemente aumentando ou diminuindo o aporte de nutrientes para a produção de leite. A correlação entre a produção de leite e alantoína no leite pode certamente limitar o uso da alantoína ou derivados lácteos de purinas como índice para a predição do suprimento de proteína microbiana (GONZÁLEZ-RONQUILLO et al., 2003; PINA et al., 2006). Por isso, a secreção de derivados de purinas no leite não pode ser considerada um substituto para a excreção urinária de derivados de purinas, como índice para estimativa da síntese de proteína microbiana ruminal (GONZÁLEZ-RONQUILLO et al., 2003).

Pereira (2003) não encontrou efeito significativo dos níveis de crescentes de proteína bruta (PB) dietéticos sobre a alantoína no leite em vacas nos terços inicial e médio da lactação, com respectivos valores, 3,83 e 3,24%. Valadares et al. (1999) observaram relação média de 4,2 a 5,7% entre alantoína no leite e excreção total de derivados de purinas, semelhantes às relações encontradas por Mendonça et al. (2004), de 3,5%, Silva, R.M.N. et al. (2001), de 4,5%, Oliveira et al. (2001), de 3,37 a 4,49% e Chen e Gomes (1992), de 5%. Segundo Pina et al. (2006) a relação média relatada foi de 0,75%, dentro da amplitude de variação observada por Giesecke et al. (1994), de 0,6 a 2,4% e por Gonda e Lindberg (1997), de 0,63 a 1,34%.

Também foi relatado que a secreção de alantoína no leite tem uma correlação positiva com a ingestão de MS (PETERSON, 2006; GONDA e LINDBERG, 1997), e energia (GIESECKE et al., 1994; LEBZIEN et al. 1993 - citados por GONDA e LINDBERG, 1997; PETERSON, 2006) bem como com o fluxo de compostos nitrogenados microbianos (TIMMERMANS Jr. et al. 2000).

Em ovinos, a secreção de alantoína no leite não foi correlacionada com a excreção em urina (MARTIN-ORÚE et al. 1996), esta informação está condizente aos resultados encontrados por Fonseca et al. (2006), em estudo realizado em cabras leiteiras, os quais relataram que a secreção de alantoína no leite não diferiu entre os tratamentos e não acompanhou a tendência observada na excreção urinária de alantoína e de derivados de purinas. Esses autores, observaram os valores médios em mmol/ dia, de 0,22, 0,23, 0,21, 0,27, para os respectivos níveis de 11,5, 13,5, 15,5, 17,5% de proteína bruta (PB) da dieta. Também foi notado nesse experimento, que ocorreu aumento do consumo de MS, PB e NDT com elevação da PB dietética, enquanto a excreção relativa de alantoína diminuiu.

De acordo com Yu et al. (2002), as excreções de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina podem ser afetadas pelas fontes de proteína dietética e energia, pelos consumos de MS, energia e proteína, pelo peso vivo, pelos aditivos alimentares e pela espécie animal.

2.2. Parâmetros Ruminais

2.2.1. pH ruminal

O rúmen constitui um ecossistema dependente da ingestão alimentar, composição química dos ingredientes da ração, nível de ingestão, freqüência de alimentação, qualidade da forragem, tamanho de partícula e relação volumoso: concentrado. Segundo Hoover e Stokes (1991), todos estes fatores influenciam o pH, que é um dos principais modificadores químicos e fisiológicos da fermentação ruminal.

A fermentação no rúmen é o resultado de atividades físicas e microbiológicas que transformam os componentes da dieta em produtos que são úteis (ácidos graxos voláteis – AGVs, proteína microbiana, vitaminas do complexo B), inúteis (CH₄, CO₂) ou nocivos (amoníaco, nitrato) para o animal hospedeiro. Os ruminantes mantêm a população microbiana no rúmen ao ingerir e mastigar alimentos com regularidade, adicionando tampões e eliminando os ácidos produzidos, retirando os produtos microbianos e os resíduos alimentícios não digestíveis e mantendo condições apropriadas para o crescimento microbiano, como pH, anaerobiose, temperatura e umidade (COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979; OWENS e GOETSCH, 1988; VAN SOEST, 1994).

O pH ruminal está inteiramente relacionado com os produtos finais da fermentação, bem como com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais. Isto é demonstrado com o uso

de dietas ricas em volumosos que proporcionam pH ruminal mais elevado, permitindo o crescimento de bactérias celulolíticas (YOKOAMA e JOHNSON, 1988). Experimentos têm comprovado que a efetividade do crescimento das bactérias predominantes no rúmen se altera consideravelmente com o pH. As bactérias celulolíticas e as bactérias metanogênicas são afetadas intensamente uma vez que o pH do rúmen decresce para abaixo de 6,0. Os protozoários também são afetados pelo decréscimo do pH determinado por um consumo excessivo de concentrados da dieta. Mantendo o pH em 5,5 aproximadamente, podem aparecer no rúmen um elevado número de protozoários, principalmente *Isotrichia e Entodinia*, até que as concentrações destas espécies decrescem quando o pH atinge valores abaixo de 5,5 (YOKOAMA e JOHNSON, 1988).

O pH do rúmen pode oscilar de 5,5 a 7,2, o abaixamento do pH ruminal acontece pouco depois da ingestão de uma dieta rica em concentrados, isto ocorre por causa da sua rápida fermentação (ØRSKOV, 1986; OWENS e GOETSCH, 1988). Durante a adaptação a uma dieta rica em concentrados, o pH exerce uma pressão seletiva contra os microrganismos que são intolerantes a um pH mais baixo. Quando há um declínio no pH, aumentam as bactérias amilolíticas e ácidos tolerantes, enquanto diminuem os microrganismos celulolíticos, aumentando a atividade da amilase em relação ao da celulase. O pH considerado ótimo para amilase do rúmen é de aproximadamente 5,6. Com essas reduções, a inibição da digestão da fibra pode ser um problema durante a adaptação de uma dieta a base de concentrado, já que a fibra pode se acumular no rúmen (OWENS e GOETSCH, 1988).

A redução do pH reduz a degradabilidade de proteína, celulose, hemicelulose e pectina, embora seus efeitos sejam menores sobre a digestão do amido (HOOVER e STOKES, 1991). Mertens (1992), sugeriu que a digestão da fibra declinaria, quando o pH estivesse abaixo de 6,7, confirmando os dados obtidos por Strobel e Russell (1986), que afirmaram que quando o pH declina de 6,7 para 6,0, a taxa de utilização dos carboidratos é diminuída. Os mesmos autores também concluíram que pequenos declínios do pH, típicos dos eventos ruminais de vacas leiteiras, poderiam prejudicar a síntese de proteína microbiana, pois encontraram redução de 69% na síntese quando o pH era igual a 6,0. Hoover e Stokes (1991) também admitiram que a redução do pH de 6,5 para 5,5 diminuiu a eficiência de síntese protéica.

Segundo Mould et al. (1983), o efeito do pH é bifásico. Na primeira fase, pode haver acidificação de 6,8 para 6,0, provocando redução na digestão da porção fibrosa do alimento. Após o pH do ambiente ruminal alcançar valores inferiores a 6,0, a segunda fase se caracteriza por ocorrer uma parada na digestão devido a sensibilidade das bactérias celulolíticas neste nível de acidez.

Cecava et al. (1991) verificaram redução do pH ruminal de 6,1 para 5,8 quando forneceram níveis altos e baixos de fibra para novilhos, sendo este comportamento reflexo da substituição progressiva da fibra em detergente neutro (FDN) para carboidratos solúveis, cuja

fermentação é mais rápida. Do mesmo modo, Dias et al. (2000), trabalhando com novilhos, observaram um decréscimo linear, quando os níveis de concentrado variaram de 25 a 75%, independente do horário de coleta, provavelmente, devido à intensificação do processo de fermentação pós-prandial e ao conseqüente aumento nas concentrações de ácidos graxos voláteis. Uma lenta queda no pH ruminal de novilhos, foi igualmente observada por Ítavo et al. (2002), com o aumento do tempo de coleta. O valor mínimo encontrado por estes autores foi de 6,22, estimado com 43,86% de concentrado e 10,76 horas após a alimentação, registrando o efeito do nível de concentrado sobre o pH.

Contudo, Cardoso et al. (2000) encontraram que os valores de pH estimados sob o efeito de rações e tempos de coleta após alimentação variaram de 5,76 a 6,83, em novilhos alimentados com feno de capim-*coastcross* à vontade e porcentagens de 25 a 75% de concentrado. O menor valor de pH obtido por estes autores foi de 5,76 com 75% de concentrado na dieta, às 7,46 horas após a alimentação. Os valores encontrados nesse experimento equivalem aos valores citados por Owens e Goetsch (1988), que obtiveram valores de pH de 6,5 a 5,5 em rações contendo acima de 70% de alimentos concentrados na matéria seca. Entretanto, Cavalcante et al. (2006), avaliando o pH ruminal em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de proteína bruta, com base na matéria seca, constituída de 65% de feno de capim-Tifton 85 e 35% de concentrado, observaram que o pH máximo de 6,54 no tempo de 4,17 horas após a alimentação, considerando esse resultado atípico, visto que, normalmente são citados valores mínimos de pH para 4 horas após a alimentação.

Silva et al. (1997), trabalhando com a substituição parcial na dieta a base de palma forrageira por diferentes níveis de capim-elefante (0; 12,5 e 25%), e 40% de concentrado, em bovinos, não encontraram diferenças significativas para o pH com valores médios de 6,55; 6,57 e 6,5, respectivamente.

Estudando o pH ruminal de ovinos alimentados com diferentes tipos de silagem, Lavezzo et al. (1998) observaram um pH de 6,98 no tempo zero. Segundo os autores isto aconteceu devido ao fato de que o animal quando em jejum, seu pH eleva-se a valores próximos da neutralidade. Os mesmos autores encontraram pH médio de 6,69, este resultado se aproxima ao de Ítavo et al. (2000), quando adicionou a alimentação de ovinos silagem do bagaço de laranja, e obtiveram um valor médio de 6,97, com variação de 6,5 a 7,4.

Em cabras leiteiras recebendo dietas compostas por diferentes relações volumoso: concentrado, Gonçalves et al. (2001) observaram pH de 6,5 a 6,9 ao longo de 24 horas nos animais que receberam 40 e 20% de concentrado, respectivamente. Estes dados foram superiores aos encontrados por Lana et al. (2007), em experimento com cabras multíparas, secas, alimentadas por uma dieta composta de 67% de silagem de milho e 33% de concentrado à base de fubá de milho e farelo de soja e adição de níveis crescentes de óleo de soja, extrato

etanólico de própolis e própolis bruta moída, que encontraram valores de pH de 6,6 a 5,6 no decorrer de 9 horas após a alimentação.

2.2.2. Nitrogênio Amoniacal

A amônia oriunda principalmente da fermentação do alimento no rúmen, da autólise de células e da uréia reciclada e dietética, penetra na célula microbiana por difusão passiva, especialmente na forma de NH₃ (NOLAN, 1993). Se a concentração de amônia é baixa, a eficiência do crescimento microbiano é reduzida, pelo fato de o ATP ser desviado do crescimento para o processo de captação de compostos nitrogenados (N) pela glutamina/ glutamato-sintetase. Quando se tem alta concentração de amônia, a principal via de captação de N é a glutamato-desidrogenase (CHURCH, 1988 – citado por RENNÓ et al., 2000b).

A maior parte dos microrganismos presentes no rúmen utiliza a amônia como fonte de N para o seu crescimento. A uréia é rapidamente hidrolisada pelas bactérias aderidas ao epitélio ruminal e a amônia resultante é incorporada ao N bacteriano, sendo a disponibilidade de energia o fator principal que determina a taxa de assimilação desse N (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999 – citados por MAGALHÃES et al., 2005). Muitas bactérias do rúmen necessitam de amoníaco mais que aminoácidos ou peptídeos como fonte de N. Em geral, o amoníaco é a fonte de N mais importante para aquelas bactérias do rúmen que digerem carboidratos complexos em lugar de açúcares simples. A produção de amoníaco mediante a deaminação de aminoácidos é realizada, especialmente, pela *Prevotella ruminantium*, *Megasphaera elsdenii, Selenomonas ruminantium* e poucas espécies de *Butyrivibrio*. (YOKOAMA e JOHNSON, 1988).

A amônia que não é utilizada pelos microrganismos é absorvida pela parede ruminal (NOLAN, 1993) e vai ao fígado por meio da circulação sangüínea, onde entra no ciclo da uréia (COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979).

Entre os componentes da ração, as fontes de proteína e carboidratos influenciam a magnitude da fermentação de nitrogênio (N) e da energia do rúmen (NOCEK e RUSSEL, 1988). Segundo os mesmos autores a fermentação é dependente da taxa de hidrólise da proteína, que, por sua vez, determina a disponibilidade de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos de cadeia ramificada para o crescimento microbiano. O fato de que o catabolismo de proteínas produz amônia aponta a um interesse especial, pois pode ocasionar economia de proteína, por meio da reciclagem, bem como problemas pelo excesso. Dessa maneira, é necessário que alguma proteína seja degradada no rúmen para suprir as necessidades

de peptídeos e aminoácidos. A disponibilidade de carboidratos estimula o uso de amônia na síntese de aminoácidos e no crescimento microbiano (VAN SOEST, 1994).

Segundo Ribeiro et al. (2001), a determinação da concentração de amônia permite avaliar o balanceamento da energia com a proteína da dieta. Altas concentrações de amônia estão relacionadas ao excesso de proteína degradada no rúmen e/ ou às baixas concentrações de carboidratos degradados no rúmen (RIBEIRO et al., 2001).

Satter e Slyter (1974), citados por Cardoso et al. (2000) e Ítavo et al. (2002), estabeleceram que 5 mg de N/ 100 mL de fluido ruminal seriam o mínimo ideal para a ocorrência de máxima fermentação microbiana no rúmen, além disso, revelaram que concentrações de amônia inferiores a esse valor limitariam a atividade de bactérias celulolíticas do rúmen, diminuindo a síntese microbiana. A redução na concentração de N amoniacal, com níveis crescentes de concentrado, pode ser justificada pelo aumento na disponibilidade de energia ruminal, que possibilita maior utilização da amônia para crescimento microbiano (CARVALHO et al., 1997). No entanto, Mehrez et al. (1977), citados por Ítavo et al. (2002), afirmaram que o máximo de atividade fermentativa é obtido quando o N amoniacal alcança valores entre 19-23 mg N/ 100 mL de líquido ruminal. Já Van Soest (1994) citou como nível ótimo 10 mg/ 100 mL. Contudo, esses valores não devem ser considerados como números fixos, devido à capacidade de síntese de proteína e captação de amônia pelas bactérias depender da taxa de fermentação dos carboidratos (ÍTAVO et al., 2002). Normalmente, a concentração de amônia ruminal varia com o tempo decorrido da alimentação, o local de amostragem no rúmen, o balanço entre proteína e energia na dieta, solubilidade e o nível de proteína da ração (EARDMAN et al., 1986).

Dias et al. (2000), avaliando os níveis de concentrado nas rações de novilhos, observaram influência do tempo de coleta sobre as concentrações de N amoniacal (N-NH₃), sendo máximas 2,92 horas após o fornecimento das rações. As concentrações máximas estimadas nesse experimento foram de 12,47; 14,82; 17,17; 19,52 e 21,87 mg de N-NH₃/ 100 mL, para as rações com 25; 37,5; 50; 62,5; e 75% de concentrado, respectivamente. Da mesma maneira, Cavalcante et al. (2006) obtiveram valor máximo de 17,43 mg de N-NH₃/ 100 mL de líquido ruminal 3,62 horas após alimentação, o que segundo o autor não era esperado, pelo fato de a concentração de amônia tender a aumentar com o incremento de proteína bruta à dieta. Já Cardoso et al. (2000) observaram que as concentrações de N-NH₃ ruminal não foram alteradas pelos níveis de concentrado nas rações, uma vez que todas as dietas apresentaram quantidades semelhantes de proteína bruta, com média de 11,63% de PB na MS da ração. A concentração máxima encontrada por estes autores foi de 17,56 mg N-NH₃/ 100 mL estimada às 2,77 horas após alimentação.

Entretanto, Fregadolli et al. (2001) encontraram valor médio observado de 8,5 mg de N-NH₃ / 100 mL de líquido ruminal, e variou de 3,1 a 14,5 mg de N-NH₃ / 100 mL, estes valores

foram inferiores aos supracitados. Enquanto Ítavo et al. (2002) e Sarti et al. (2005) estimaram concentrações máximas de N amoniacal em 22,93 e 22,63 mg de N-NH₃/ 100 mL de fluido ruminal, respectivamente, concordando com o valor encontrado por Mehrez et al. (1977), citados por Ítavo et al. (2002).

Segundo Ladeira et al. (2002), em ovinos alimentados com feno de *Stylosanthes guianensis*, as concentrações de N-NH₃ estavam nas faixas consideradas ótimas para uma boa fermentação ruminal, de 5 a 15 mg de N-NH₃/ 100 mL de fluido ruminal. Ítavo et al. (2000), analisando a adição de silagem de bagaço de laranja na dieta de ovinos, obtiveram valores máximos para silagens, com ou sem aditivos, que variaram de 9 a 14 mg de N-NH₃/ 100 mL de fluido ruminal. Igualmente, Lana et al. (2007) encontraram, em cabras, concentração média de amônia ruminal de 15,77 mg/ 100 mL e o valor mínimo observado foi de 10,6 mg/ 100 mL, os valores de ambos os experimentos foram inferiores aos observados por Merchen et al. (1986) de 25,0 e 21,7 mg de N-NH₃/ 100 mL de ovinos alimentados com 25 e 75% de concentrado, respectivamente.

2.2.3. Ácidos Graxos Voláteis

Os produtos finais mais importantes da fermentação ruminal são os ácidos graxos voláteis (AGVs), principalmente acético, propiônico e butírico, com pequenas quantidades de isobutírico e isovalérico (NUNES, 1998; TEIXEIRA, 2001). De um modo geral, observa-se que os produtos finais da fermentação ruminal são similares em suas proporções molares em diferentes espécies.

A proporção molar dos diferentes AGVs depende da composição da dieta. Com dietas baseadas em forragens, os AGVs proporcionam de 50 a 85% de energia metabolizável utilizada pelos ruminantes (OWENS e GOETSCH, 1988; FAHEY e BERGER, 1988). A capacidade de absorção dos AGVs supera em seis a oito vezes as necessidades de energia para mantença de ovelhas em crescimento e aproximadamente nove vezes as necessidades de mantença de vacas lactantes (OWENS e GOETSCH, 1988).

Os produtos da fermentação diferem segundo a composição da dieta porque determinados microrganismos têm maiores afinidades e preferências para digerir carboidratos específicos (OWENS e GOETSCH, 1988; TEIXEIRA, 2001). As dietas a base de forragem são ricas em celulose e pobres em amido, acionam a atividade microbiana, especialmente as bactérias celulolíticas e sacarolíticas. Com a digestão intensa da celulose por esses microrganismos e a fermentação dos carboidratos solúveis pelas bactérias sacarolíticas, resulta

em uma elevada produção de acetato. Pelo contrário, com dietas ricas em amido, a população bacteriana é principalmente amilolítica. Os microrganismos amilolíticos competem pelos carboidratos solúveis e pelos produtos da hidrólise do amido e da hemicelulose, especialmente com um pH mais baixo e produzem maiores quantidades de propionato (OWENS e GOETSCH, 1988), estas dietas geralmente resultam na produção de leite com baixa porcentagem de gordura. Há, também, um aumento nas concentrações de ácido propiônico quando existe um alto nível de ingestão de proteínas (TEIXEIRA, 2001).

Durante a adaptação a uma dieta rica em concentrados, o pH exerce uma pressão seletiva contra os microrganismos que são intolerantes a um pH mais baixo. Quando diminui o pH, aumentam as bactérias amilolíticas e ácidos tolerantes enquanto diminuem os microrganismos celulolíticos, produzindo pouco acetato e favorecendo a multiplicação de microrganismos produtores de ácido propiônico (OWENS e GOETSCH, 1988; TEIXEIRA, 2001). Além da composição da dieta, as concentrações de AGVs total ou individual no rúmen são altamente variáveis e dependentes da freqüência da alimentação e tempo após a alimentação (BERGMAN, 1990).

Segundo Blaxter (1962), citado por Lana et al. (1998), há uma relação inversa entre a razão acetato: propionato e a quantidade de concentrado de uma dieta, freqüentemente, isto têm sido utilizado para explicar a tendência que bactérias fermentadoras da porção fibrosa têm em produzir acetato e aquelas fermentadoras de amido têm em produzir propionato. Entretanto, isto não pode ser generalizado, pois não há suporte pelas características de culturas puras de bactérias. Por exemplo, as bactérias fibrolíticas, *Ruminococcus albus* produz ampla quantidade de acetato, porém, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* produz succinato, um intermediário na conversão do propionato. E algumas bactérias fermentadoras de amido podem produzir succinato ou propionato, mas possuir uma maior habilidade para produzir extensas quantidades de acetato (HUNGATE, 1966 – citado por LANA et al., 1998).

Quase a totalidade dos AGVs produzidos são absorvidos por difusão pela parede do rúmen, chegando uma pequena quantidade ao abomaso (NUNES, 1998), as suas taxas de absorção aumentam com o comprimento da cadeia carbônica (TEIXEIRA, 2001). A maior parte do acetato e todo o propionato são transportados sem modificações para o fígado, mediante a circulação porta, mas a maioria do butirato é convertida na parede ruminal em corpos cetônicos chamados de β-hidroxibutirato, forma na qual é metabolizado pelo fígado. Aproximadamente 80% do acetato que chega ao fígado escapam da oxidação e passam para a circulação periférica. Uma vez absorvido pelo sangue, a maior parte do acetato é utilizado para a síntese de ácidos graxos do leite, sendo este ácido o principal precursor para a lipogênese nos ruminantes. A produção em níveis adequados de acetato no rúmen resulta na manutenção de quantidades adequadas de gordura no leite (FAHEY e BERGER, 1988).

Durante sua absorção através do epitélio ruminal, 2 a 5% do propionato é convertido em ácido lático e o restante penetra na circulação porta como propionato. A maior parte do ácido propiônico metabolizado no fígado contribui para a síntese de glicose, pela via glicogênica e é quantitativamente, seu principal precursor (FAHEY e BERGER, 1988; TEIXEIRA, 2001).

O fator mais importante na determinação da velocidade de absorção dos AGVs é o pH do fluido ruminal. Em valores de pH baixo, entre 5,6-5,8 verifica-se uma absorção maior que em valores mais altos, entre 7,0-7,5 (FAHEY e BERGER, 1988; TEIXEIRA, 2001), provavelmente, porque quando o pH encontra-se baixo ocorre um aumento das papilas ruminais aumentando, assim, a superfície de absorção, as papilas alcançam seu máximo com pH próximo a 5,5 (FAHEY e BERGER, 1988; RUSSELL, 1998). Quando há um decréscimo de pH do conteúdo ruminal, os ácidos parecem ser absorvidos tanto na forma dissociada quanto na não dissociada (FAHEY e BERGER, 1988; TEIXEIRA, 2001). Além disso, o pH do fluido ruminal pode influenciar bactérias produtoras de AGV específico. A proporção molar dos AGVs individuais no rúmen é consideravelmente interessante, pois o padrão de fermentação e a concentração total de AGVs são os principais determinantes da utilização dos alimentos pelos ruminantes (FRANCE e SIDDONS, 1993).

Em um estudo realizado na China, An et al. (2005) encontraram, em gado Jinnan alimentado com pasto natural, concentrações de AGVs no fluido ruminal de 78,20; 15,11 e 9,60 mM de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente. Já Rocha Filho et al. (1999), utilizando vacas não lactantes, fistuladas, alimentadas com polpa cítrica e milho, obtiveram os respectivos valores médios de acetato, propionato e butirato de 54,34; 20,01; 11,52 mM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local, Animais e Tratamentos

O experimento foi conduzido no setor de Caprinocultura do Departamento de Tecnologia Rural e Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-BA. Foram utilizadas oito cabras da raça Saanen, com aproximadamente 60 dias de lactação, produção de 2 litros de leite ao início do experimento, peso vivo médio de 50 kg e escore corporal 3, confinadas em baias individuais com dimensões de 1,5 x 1,0 m com piso ripado de madeira (Figura 8).



Figura 8 – Baias individuais onde as cabras permaneceram durante o experimento.

Os animais foram distribuídos em dois quadrados latinos balanceados 4 x 4 para avaliar os efeitos de níveis crescentes de farelo da vagem de algaroba em dietas isoprotéicas, tendo como base volumosa a silagem de capim-elefante na proporção de 40%. A substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba no concentrado foi a variável independente utilizada para caracterizar os tratamentos, que foram constituídos por quatro níveis do farelo da vagem de algaroba em substituição ao milho, quais foram: 0; 33,3; 66,7 e 100% na matéria natural. A proporção dos ingredientes nos concentrados encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição percentual do concentrado, expressa na base da matéria natural.

Ingrediente		Nível de far	elo da vagem de al	garoba			
	(% da MN)						
	0	33,3	66,7	100			
Fubá de milho	78,10	52,51	26,48	0,00			
Farelo de algaroba	0,00	25,42	51,28	77,60			
Farelo de soja	13,3	13,24	13,19	13,13			
Farelo de algodão	4,92	4,96	5,00	5,05			
Mistura mineral	3,681	$3,85^2$	$4,03^3$	4,204			
Total	100	100	100	100			

¹Fosfato bicálcico 39,9%, Sal comum 20,1%, Sal mineral comercial 40,0%.

O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais, com duração de 17 dias cada, sendo os primeiros 10 dias de adaptação e sete dias de coletas de dados. As dietas foram fornecidas às 7:30h e 15:00h *ad libitum*, em quantidade suficiente para garantir 10% de sobras. Foram feitas pesagens diárias da dieta fornecida e das sobras, de todos os animais para estimar o consumo de NDT. Durante os cinco dias de coleta de cada período, foram recolhidas as amostras de alimentos e sobras. Foram feitas coletas totais de fezes no 16º dia de cada período experimental. As coletas de fezes foram efetuadas com auxílio de bolsas coletoras que foram colocadas nos animais. As amostras de alimentos, sobras e fezes foram conservadas a uma temperatura de -20°C para análises posteriores.

Ao término de cada período de coletas, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas e foi pré-secas em estufa de ventilação forçada a temperatura de 60 a 65°C, durante 72 horas, processadas em moinho tipo *Willey* com peneira de malha de 1mm e acondicionadas individualmente em vasos plásticos, para posteriores análises bromatológicas (MS, cinzas, PB, EE, FDN e FDA) segundo os procedimentos descritos por Silva e Queiroz (2002).

A porcentagem de carboidratos totais (CHOT) foi obtida pela equação proposta por Sniffen et al. (1992):

$$CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%CINZAS)$$

²Fosfato bicálcico 42,3%, Sal comum 19,2%, Sal mineral comercial 38,5%.

³Fosfato bicálcico 44,4%, Sal comum 18,6%, Sal mineral comercial 37,0%.

⁴Fosfato bicálcico 46,4%, Sal comum 17,9%, Sal mineral comercial 35,7%.

e os teores de CNF em amostras de alimentos, sobras e fezes foram estimados por meio da equação:

$$CNF = (100 - \%FDN_{CP} - \%PB - \%EE - \% CINZAS)$$

Para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes MS, MO, PB, EE, FDN, FDA, CNF e CHOT foi utilizado o método *in vivo*.

Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados pelo somatório da proteína bruta digestível (PBD); fibra em detergente neutro digestível (FDND); extrato etéreo digestível (EED) multiplicando por 2,25; e carboidratos não fibrosos digestíveis (CNFD), segundo Weiss (1999):

$$NDT = PBD + 2,25 \times EED + CNFD + FDND$$

A composição químico-bromatológica dos concentrados e da silagem de capim-elefante das dietas experimentais, encontra-se nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra bruta em detergente ácido (FDA), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHOT) e cinzas, contidos nos concentrados e na silagem de capim-elefante.

Parâmetros (% da MS)	Concentr	ado (% de FVA	em substituição	ao milho)	Silagem de Capim-
	0	33,3	66,7	100	elefante
MS	89,73	90,19	91,64	92,25	29,11
MO	94,08	93,59	92,79	91,15	85,59
PB	13,87	13,77	13,54	13,44	3,07
EE	3,94	2,90	2,50	1,87	2,49
FDN	26,14	29,83	33,02	34,76	81,96
FDA	9,64	13,30	19,06	23,58	58,59
CNF	50,13	47,10	43,78	41,09	-
СНОТ	76,27	76,93	76,80	75,85	80,46
Cinzas	5,92	6,40	7,20	8,84	14,40

Tabela 3 – Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra bruta em detergente ácido (FDA), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHOT) e cinzas contidas nas dietas experimentais.

Parâmetros		% de FVA em sub	ostituição ao milho	
(% da MS)	0	33,3	66,7	100
MS	65,48	65,76	66,63	66,99
MO	90,68	90,39	89,91	88,93
PB	9,55	9,49	9,35	9,29
EE	3,36	2,74	2,50	2,12
FDN	48,47	50,68	52,60	53,64
FDA	29,22	31,42	34,87	37,58
CNF	30,08	28,26	26,27	24,7
CHOT	77,95	78,34	78,26	80,46

3.2. Parâmetros Ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal, acetato e propionato)

Para determinação da concentração de amônia (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGVs) no rúmen, amostras de fluido ruminal foram coletadas utilizando sonda esofágica adaptada a uma bomba de vácuo e o fluido ruminal foi filtrado utilizando-se gaze dobrada em 4 camadas, no 17º dia de cada período experimental, 6 horas após a alimentação da manhã. O pH foi mensurado imediatamente após a coleta do material, com potenciômetro digital. Para análise de amônia e ácidos graxos voláteis (AGVs), as amostras foram acidificadas com ácido fosfórico 25% imediatamente após a coleta (1 mL de ácido: 5 mL fluido), as amostras foram centrifugadas a 13 400 rpm (rotação por minuto) por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado com membrana com 0,2 μm de porosidade e as amostras foram armazenadas em *freezer* à -20°C.

Ao final do experimento, as amostras foram descongeladas e a concentração de N-NH₃ obtida após destilação com KOH 2N, conforme técnica descrita por Vieira (1980).

A determinação e quantificação de AGVs foram realizadas por intermédio da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Alíquota de 100 μL de cada amostra foi aplicada em coluna de exclusão iônica Bio-Rad Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm em fluxo de

0,7 ml por min⁻¹ através de uma solução aquosa móvel de 4 mM de H_2SO_4 a 25°C no HPLC para análise e detecção do ácido acético e ácido propiônico. Os dados da cromatografia foram integrados e analisados com o software UNICORNTM v. 5,0. O ácido acético e propiônico foram mensurados a 210 nm (R_t = 14,2). Alíquotas destes ácidos a concentrações conhecidas (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312 mM) foram usadas para construção da curva padrão, para verificar as similaridades com as concentrações obtidas das amostras.

3.3. Síntese de Proteína Microbiana

Para se estimar a síntese microbiana ruminal, as análises de derivados de purinas (alantoína, ácido úrico, xantina-hipoxantina) foram realizadas nas amostras de urina e de leite, conforme metodologias descritas por Chen e Gomes (1992).

As amostras de leite foram coletadas com base em duas ordenhas diárias e em quatro amostragens durante o período de coleta: ordenha vespertina no primeiro dia; ordenha da manhã no segundo dia; ordenha da tarde no quinto dia; e ordenha da manhã no sexto dia, sendo agrupadas em amostras compostas proporcionais a 10% da produção de cada ordenha (tarde/manhã). Uma alíquota de 10 mL de cada amostra composta foi retirada, misturada a 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, filtrada em papel-filtro e armazenada a -20°C para posteriores análises de alantoína.

As coletas totais de urina foram realizadas no 6º dia do período de coleta. Por meio do cateterismo utilizando sonda de Foley 10, a urina foi coletada em galões plásticos de 5 L contendo 20 mL de H₂SO₄ a 40% (Figura 9) e, ao final de cada coleta, foi pesada, homogeneizada e filtrada em gaze, retirando-se uma alíquota de 10% do volume diário em cada período.

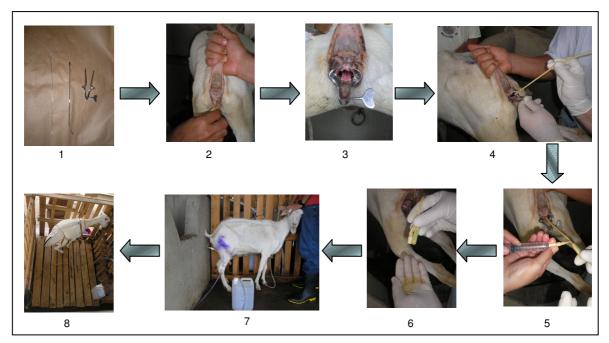


Figura 9 – Seqüência de fotografias mostrando a colocação da sonda Foley para coleta de urina total. 1 – indica os instrumentos utilizados no procedimento; 2 – assepsia da região da vulva; 3 – abertura do canal vaginal; 4 – introdução da sonda de Foley pelo canal da uretra; 5 – mostra a introdução de soro fisiológico para preencher o balão da sonda; 6 – observação da saída de urina pela sonda; 7 – cabra com sonda acoplada a uma mangueira, e a urina é coletada dentro de um galão de 5 L; 8 – cabra em posição de micção, dentro da baia.

Alíquotas de 10 mL das amostras foram diluídas em 40 mL de H₂SO₄ a 0,036N. Estas amostras foram elaboradas com pH abaixo de três para evitar a destruição bacteriana dos derivados de purinas urinários e a precipitação de ácido úrico. Posteriormente, foram armazenadas a -20°C, sendo submetidas às análises de alantoína, xantina-hipoxantina e ácido úrico.

A excreção total de derivados de purina foi calculada pela soma das quantidades de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina presentes na urina e alantoína secretada no leite e, expressas em mmol/ dia.

As purinas absorvidas (X, mmol/ dia) foram estimadas a partir da excreção de derivados de purinas (Y, mmol/ dia), por intermédio da equação proposta por Chen e Gomes (1992), para ovinos:

$$Y = 0.84X + (0.150 \text{ PV}^{0.75} \text{e}^{-0.25X})$$

onde, 0.84 é a eficiência de absorção de purinas exógenas, $0.150~{\rm PV}^{0.75}$ refere-se a excreção endógena de derivados de purinas e ${\rm e}^{-0.25{\rm X}}$, a taxa de substituição da síntese *de novo* por purinas endógenas.

A síntese ruminal de proteína microbiana (g NM/ dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/ dia), utilizando-se a equação descrita por Chen e Gomes (1992):

$$NM = \frac{70X}{0,83 \times 0,116 \times 1000}.$$

em que 70 é o conteúdo de N de purinas (mg N/ mmol), 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116 e a relação N purina:N total nas bactérias.

Foram empregadas também as equações propostas por Belenguer et al. (2002), para caprinos, nas quais a quantidade de purinas absorvidas (X, mmol/dia) pode ser estimada como a excreção de derivados de purina (Y) dividida pela taxa de recuperação de purinas (0,76):

$$X = Y .$$

Assumindo que 0,92 é a digestibilidade verdadeira das bases purinas no duodeno e 1,97 (mmol de bases purinas/ g N) a razão entre as bases purinas (164 mmol/ g MS) e o conteúdo de N (83,8 mg/ g MS) na população microbiana extraída do rúmen de cabras, Belenguer et al. (2002) propuseram a seguinte equação:

NM (g/d) =
$$X$$
 . (0.92×1.97)

3.4. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por meio de análises de variância e regressão, utilizandose o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG 8.0 (RIBEIRO Jr., 2001). Os critérios utilizados para escolha dos modelos foram o coeficiente de determinação (r²) e a significância observada por meio do teste F, a 5% de probabilidade. As médias de estimativa da produção microbiana calculada pelos modelos de Belenguer et al. (2002) e Chen e Gomes (1992), foram comparadas aplicando-se o teste t pareado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios observados para pH ruminal, concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e quantidade dos ácidos graxos voláteis (AGVs): acetato e propionato e de suas razões.

Tabela 4 – Valores médios, coeficientes de variação (CV) para o pH ruminal e para as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃; mg de N/ 100 mL), quantidades de acetato e propionato (mM) de acordo com a porcentagem (%) de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA) no concentrado.

	% de subst	ituição do Fu	bá de Milho	pelo FVA			
Item	0	33,3	66,7	100	CV%	Regressão*	
рН	7,03	6,89	6,85	7,02	3,35	$\hat{Y} = 6.95$	
N-NH ₃ (mg/ 100 mL)	6,96	7,16	7,14	6,60	36,99	$\hat{Y} = 6.97$	
Acetato (mM)	10,54	9,47	10,02	9,76	33,82	Y=9,95	
Propionato (mM)	4,79	6,58	6,55	6,37	39,61	Y=6,07	
Acetato: Propionato (mM)	2,49	1,52	1,58	1,72	50,38	Y=1,83	
AGV totais (mM)	15,33	16,05	16,57	16,13	30,39	Y=16,02	

^{*} Não significativo, P>0,05

Não houve regressão significativa (P>0,05) do pH ruminal em função dos níveis de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA) no concentrado. O pH do fluido ruminal de caprinos sofre variações com o tipo de alimento, o período de tempo transcorrido entre o fornecimento da ração até a coleta do líquido ruminal, bem como a época do ano (FIGUEIREDO et al., 2000). Os resultados médios de pH obtidos no fluido ruminal de cabras leiteiras deste experimento, na sua totalidade, estão na faixa considerada normal entre 5,5 e 7,0, situado entre 6,85 e 7,03. Estes foram, entretanto, superiores aos valores obtidos por Lana et al. (2007), de 6,6 a 5,6 no decorrer de 9 horas após a alimentação, quando forneceram às cabras multíparas e secas, uma dieta contendo 67% de silagem de milho e 33% de concentrado à base de fubá de milho e um aditivo alimentar a base própolis. Lana et al. (2007) observaram que na maior parte do tempo o pH manteve-se acima de 5,9, e obteve uma média de 6,2.

O FVA utilizado neste experimento apresentou em média 86,4% de CHOT, 29,7% de fibra em detergente neutro (FDN) 56,7% de carboidratos não fibrosos (CNF), sendo que deste total de CNF aproximadamente 36% correspondem aos açúcares e ácidos orgânicos e os 23% restantes compreendem o amido e fibra solúvel em detergente neutro (FSDN).

Segundo Bomfim (2003) o aumento na proporção de amido e açúcares em relação à FSDN reduz o pH ruminal e aumenta o tempo que esta variável fica abaixo de 6,2 ao longo do dia. No entanto, neste estudo o pH ruminal apresentou valores bem superiores a 6,2 com 6 horas após a alimentação em todos os tratamentos.

Gonçalves et al. (2001) trabalhando com cabras da raça Parda Alpina, não gestantes e não lactantes, recebendo dietas compostas por diferentes relações volumoso: concentrado, observaram pH de 6,5 a 6,9 nos animais que receberam 40 e 20% de concentrado, respectivamente. Foi observado por esses autores que houve um decréscimo quadrático (P>0,05) do nível de concentrado sobre o pH e que o pH atingiu seu ponto mínimo entre 2 a 4 horas após cada alimentação. Segundo Van Soest (1994), isto acontece devido à maior taxa de produção de ácidos graxos voláteis, provenientes da fermentação da fração não fibrosa do alimento.

Esses valores de pH estão de acordo com Rihani et al. (1993) e Ítavo et al. (2000), os quais estudaram a utilização de bagaço de laranja desidratado e peletizado, e silagem de bagaço de laranja, respectivamente, com ovinos. Rihani et al. (1993) encontraram valores médios de pH variando de 6,1 a 7,0 e Ítavo et al. (2000) obtiveram valor médio igual a 6,97, da mesma forma Lavezzo et al. (1998) encontraram pH médio de 6,69 para ovinos alimentados com silagem de milho e Fonseca (2004) obteve valor máximo de pH de 6,78 para o nível de 15,48% de PB na dieta de cabras leiteiras. Tais resultados aproximam-se dos observados neste experimento, cuja média foi de 6,95.

Segundo Campos et al. (2006), a determinação do pH do rúmen apresenta alguns inconvenientes derivados da dificuldade de obter uma amostra representativa do líquido ruminal uma vez que dentro do compartimento, existem diferentes estratos alimentares e concentrações de AGVs.

A concentração média de amônia ruminal foi de 6,97 mg de N/ 100 mL de fluido ruminal, sendo o valor mínimo obtido de 6,60 mg/ 100 mL (Tabela 4). O nível de substituição de fubá de milho pelo FVA não influenciou esta variável. Observou-se que os valores de N-NH₃ para todos os tratamentos foram maiores que 5 mg de N/ 100 mL de líquido ruminal, nível mínimo necessário para manter as funções normais do rúmen como sugeriram Satter e Slyter, 1974 – citados por ÍTAVO et al., 2002. Estes valores concordam com os valores médios encontrados por Ítavo et al. (2000) e Lavezzo et al. (1998), de 6,78 mg/ 100 mL e 7,02 mg/ 100 mL, respectivamente, estes autores trabalharam com ovinos alimentados com silagem de bagaço de laranja e silagem de milho, individualmente. No entanto, os resultados apresentados neste

experimento foram inferiores aos valores médios de concentração de amônia ruminal demonstrados por Rihani et al. (1993) em ovinos fistulados, de 15 a 50 mg de N/ 100 mL de fluido ruminal, e por Fonseca (2004) e Lana et al. (2007) que obtiveram de cabras fistuladas o valor mínimo de 8,8 mg/ 100 mL em dietas contendo 11,5% de PB e valor médio de 15,77 mg/ 100 mL, respectivamente. Fernandez et al. (1997) observaram que o conteúdo ruminal de N-NH₃ variou de 6,3 mg/ 100 mL em cabras alimentadas com 9,5% de PB e 27,5 mg/ 100 mL em cabras alimentadas com 14% de PB na dieta. Neste estudo, as dietas experimentais apresentaram em média 9,4% de PB na MS.

As concentrações de N amoniacal e AGVs estão inversamente relacionadas com o comportamento do pH, esta relação foi igualmente observada por Ítavo et al. (2000). Nos tratamentos em que o pH apresentou valores mínimos, os valores de N amoniacal e AGVs atingiram seu ponto máximo, o que é de se esperar, visto que o pH do líquido ruminal é o resultado das concentrações de produtos finais da digestão do alimento (CHURCH, 1979 – citado por ÍTAVO et al., 2000).

Os trabalhos na literatura não têm mostrado dados conclusivos a respeito da alteração do perfil de carboidratos solúveis em detergente neutro (CSDN) sobre os AGVs ruminais. As comparações com este trabalho são prejudicadas, porque nenhum estudo semelhante foi realizado utilizando dietas com alta proporção de algaroba.

As concentrações relativas de acetato e de propionato em mM (Figura 10) indicam que as dietas com adição de FVA resultaram em maiores valores de concentração de acetato em relação ao propionato. Embora a adição do FVA tenha reduzido a relação acetato: propionato comparada à dieta sem adição de FVA, não houve efeito estatístico (P>0,05) atribuído ao elevado coeficiente de variação. A técnica de coleta de fluido ruminal por sonda esofagiana apresenta resultado válido, mas, todas as vezes que se reduz o número de coletas, perde-se precisão, ou seja, amplia-se a variação aleatória (Figura 11). Entretanto, há evidências de redução da relação acetato: propionato pela adição de FVA.

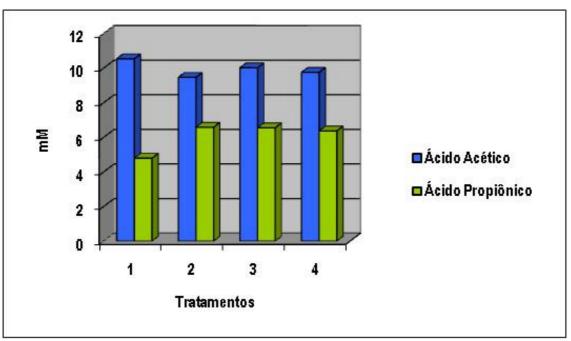


Figura 10 – Concentrações médias de acetato e propionato em função dos tratamentos. 1, 2, 3 e 4 – 0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo FVA, respectivamente.

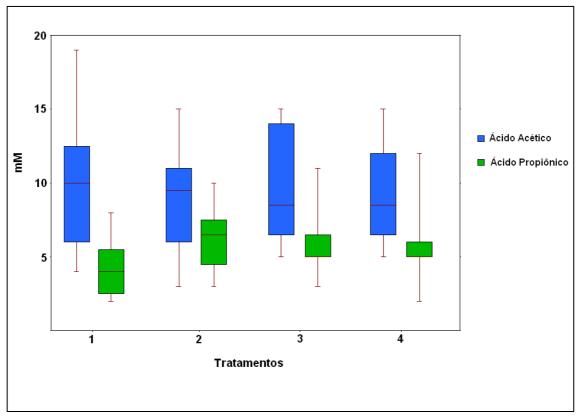


Figura 11 – Concentrações médias de acetato e propionato e suas flutuações em função dos tratamentos. 1, 2, 3 e 4 – 0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo FVA, respectivamente.

Embora não tenha havido efeito dos tratamentos sobre o perfil dos ácidos graxos voláteis, a relação acetato: propionato (Tabela 4) sugere que o efeito da alta proporção de concentrado provavelmente se sobrepôs ao da adição de algaroba. Da mesma forma, Bomfim (2003) também não observou efeito de dietas contendo 0,84 e 3,82 de razão amido/ açúcares solúveis: fibra solúvel em detergente neutro (AmAS: FSDN) sobre o perfil dos ácidos graxos voláteis, cuja média de 1,84 para a relação acetato: propionato se aproxima ao valor médio de 1,72 encontrado para a dieta com 100% de adição de FVA, que não diferiu estatisticamente das dietas contendo 33,3 e 66,7% de FVA (média de 1,55). O referido autor também verificou teores semelhantes de gordura no leite de cabras de 2,65 e 2,92% para as respectivas dietas à base de 63 e 59,3% de concentrado, com alta proporção de CSDN, que são similares à média de 2,83% obtida por Oliveira et al. (2007) utilizando as mesmas dietas do presente trabalho para cabras Saanen em lactação.

Danelón et al. (2001) não observaram influência do perfil de CSDN (amido de sorgo, trigo ou FSDN) sobre a produção de leite, concentração ou produção de gordura e proteína do leite em cabras Saanen. Estes autores, trabalhando com alfafa e dietas com 36,6% de fibra, obtiveram médias de produção de leite de 1,67 kg/d, conteúdo de gordura de 3,6% e 3,22% de proteína bruta.

A fermentação ruminal pode ser caracterizada quantitativamente pelas concentrações e proporções relativas dos produtos da fermentação produzidos, pela quantidade e eficiência de síntese de proteína microbiana e pela quantidade de matéria orgânica fermentada (NAGARAJA et al., 1997). No ecossistema anaeróbio do rúmen, a maior parte da energia da matéria orgânica fermentada é retida nos produtos do processo fermentativo (AGVs e células microbianas), com menor perda de energia como metano e calor. Os componentes intermediários de fermentação da MO também servem de monômeros para síntese de material celular. Entretanto, existe uma relação inversa entre produção de AGVs e síntese de célula microbiana. Os AGVs predominantes são acetato, propionato e butirato e suas proporções relativas são influenciadas pela dieta.

A fermentação da pectina tem sido relacionada à elevação da concentração de ácido acético ruminal, enquanto amido e açúcares, geralmente, aumentam a proporção de ácido propiônico e butírico, sendo estes aspectos relacionados à alteração no percentual de gordura láctea (BELISAKIS e TSIRGOGIANNI, 1996). De acordo com Aqeel et al. (1989) a presença de substâncias alcalóides, como a julifloricina isolada da algarobeira (NAKANO et al., 2004a), exercem atividade antimicrobiana principalmente sobre bactérias Gram positivas.

Os valores de carboidratos solúveis (CS) descritos por Valadares Filho et al. (2006) foram de 54,16 e 19,90% para o FVA e o fubá de milho, respectivamente. Para o FVA, o amido (11-17%) não é o principal componente energético sendo constituído pelos açúcares (mono e oligossacarídeos-28%) somados aos ácidos orgânicos e pectina (20%). De acordo com o The

Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), os açúcares e ácidos orgânicos pertencem à fração "A", com rápida degradação ruminal. Porém, o amido representa 91,45% dos carboidratos não-estruturais do fubá de milho e pertence à fração "B1", com degradação intermediária, da mesma forma que a pectina.

Ao fracionar os carboidratos, aumenta-se a descrição de como e onde estes podem ser digeridos e que quantidades e tipos de nutrientes protéicos e energéticos podem ser fornecidos aos ruminantes. O estudo destas frações nutricionalmente relevantes é imprescindível para predizer o metabolismo ruminal e assim predizer o desempenho animal (HALL et al., 1999).

Desde que mantidos outros parâmetros como suprimento de proteína degradável no rúmen e minerais, dentre outros, em patamares não limitantes, espera-se, em função do perfil de fermentação dos CSDN, que o crescimento microbiano obtenha eficiência máxima. Neste trabalho, a concentração de amônia e o potencial hidrogeniônico foram mantidos em patamares adequados e não diferiram entre os tratamentos (Tabela 4), as dietas foram isoprotéicas e foram utilizadas as mesmas fontes protéicas em todos os tratamentos. No entanto, os teores de CNF das dietas não foram os mesmos (Tabela 3), o que refletiu em menor consumo de CNF em função dos níveis de substituição do fubá de milho pelo FVA (OLIVEIRA et al., 2007). Além disso, CNF é um grupo nutricionalmente diverso, inclui tanto carboidratos estruturais (parede celular), como carboidratos não-estruturais (conteúdos celulares) e carboidratos fibrosos e não fibrosos (HALL, 2001). O cálculo de CNF coloca todos os carboidratos solúveis em detergente neutro (CSDN) em um único pool. Os CSDN também diferem em suas características de fermentação. Ácidos orgânicos, não sustentam o crescimento microbiano. Acúcares, amido e frutanas podem ser fermentados a ácido lático e podem continuar a fermentar em baixo pH ruminal, enquanto substâncias pécticas possam sofrer uma redução marcante em sua fermentação em pH baixo.

Os microrganismos tendem a produzir, relativamente, mais propionato, quando o amido é fermentado, mais acetato a partir de substâncias pécticas e mais butirato a partir da sacarose (STROBEL e RUSSELL, 1986). Não importa a fonte de carboidrato, seu efeito no pH ruminal será, provavelmente, mais intimamente relacionado à sua taxa de produção de ácidos orgânicos (LEIVA et al., 2000).

Lavezzo et al. (1998) observaram no fluido ruminal de ovinos, concentrações médias de acetato de 37,05; 35,28 e 38,11 mM de fluido ruminal nos tempos de 1, 3 e 6 horas após a alimentação, respectivamente. Ítavo et al. (2002), utilizando feno de aveia e silagem de bagaço de laranja na alimentação de ovinos, verificaram concentrações médias para acetato e propionato de 40,83 e 12,77 mM. Lana et al. (2007), trabalhando com cabras alimentadas com dietas constituídas da adição de níveis crescentes de óleo de soja, extrato etanólico de própolis e própolis bruta moída, obtiveram para os respectivos tratamentos valores médios de 43,17; 48,06 e 45,36 mM de ácido acético e 12,04; 12,39, 9,42 mM de ácido propiônico.

Neste estudo as médias observadas para acetato variaram de 9,47 a 10,54 mM de AGVs totais e para propionato de 4,79 a 6,58 mM. Porém, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas (P>0,05), constatando-se que não houve efeito dos níveis crescentes de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba sobre as concentrações dos ácidos graxos ruminais.

Oliveira et al. (1999) mencionaram que dependendo do método de coleta de líquido ruminal poderia interferir nos resultados, principalmente dos parâmetros ruminais (pH, concentrações de N amoniacal e AGVs), de acordo com os mesmos autores o método de coleta por meio da sonda esofagiana poderia contaminar o conteúdo com excesso de saliva, provocando, com isso, uma elevação no pH e diminuição nas concentrações de N-NH3 e de AGVs. Segundo Lane et al. (1968 – citados por OLIVEIRA et al., 1999), a análise do conteúdo ruminal proveniente de um só local proporcionou uma idéia irreal das condições prevalentes no rúmen, salientaram que existe uma heterogeneidade do conteúdo ruminal, além disso, que a distribuição dos compostos no fluido ruminal são distribuídos de forma desigual e estratificado e as amostras provenientes de local único poderiam causar variações nos resultados.

Para avaliação do pH ruminal, os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados em outros experimentos utilizando sonda esofagiana, como Ítavo et al. (2000), resultado já mencionado anteriormente e Figueiredo et al. (2000), cujo valor médio de pH ruminal encontrado foi de 6,70 em caprinos alimentados em pastagem artificial. Entretanto, quando se compara estes resultados aos obtidos por meio da coleta manual em animais fistulados não se observa diferenças. Contudo, na análise das concentrações dos ácidos graxos analisados, observou-se um decréscimo em relação àqueles estudos cuja coleta foi efetuada por meio de coleta manual.

A partir das amostras de coleta total de urina, durante um período de 24 horas, foi mensurado o volume urinário total por animal, sendo que, estatisticamente o volume não diferiu entre os tratamentos ($\hat{Y}=1,95$; P>0,05).

As excreções observadas de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina e derivados de purinas totais a partir de amostras de coleta total de urina, são descritas na Tabela 5. Pode ser observado um comportamento linear decrescente em todas as variáveis estudadas, conforme o aumento na porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba. Fonseca et al. (2006) notaram que ocorreu um aumento na quantidade de alantoína excretada na urina com o aumento do teor de proteína bruta na dieta, enquanto houve um decréscimo da contribuição relativa de alantoína à medida que a excreção total de derivados de purinas (DP) aumentou (P<0,01), esse resultado divergiu de Chen et al. (1995), que observaram o inverso em ovinos que excretaram proporções crescentes de alantoína e decrescentes de ácido úrico e xantina e hipoxantina à medida que a excreção total de derivados de purinas aumentou.

Tabela 5 – Médias, coeficientes de variação (CV) e a determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para as excreções observadas (Obs) de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina e derivados de purinas, de acordo com a porcentagem (%) de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA) no concentrado.

% de substituição do Fubá de Milho pelo FVA							
Item	0	33,3	66,7	100	CV%	r^2	Equação Ajustada
		Alantoína	a na urina				
Obs (mmol/d)	12,51	11,47	9,72	8,73	34,78	0,99	$\hat{Y} = 12,57-0,039*x$
Obs %	67,37	65,73	65,25	65,61	7,16	-	$\hat{Y} = 65,99$
		Ácido	úrico				
Obs (mmol/ d)	1,21	1,18	0,96	0,81	33,05	0,94	$\hat{Y} = 1,25-0,0042**x$
Obs %	6,54	6,76	6,42	6,11	34,58	_	$\hat{Y} = 6.46$
	ŕ	Xantina e I	Hipoxantina	•	,		,
Obs (mmol/d)	4,84	4,80	4,22	3,76	29,94	0,92	$\hat{Y} = 4,97-0,0011*x$
Obs %	26,09	27,50	28,33	28,28	12,13	-	$\hat{Y} = 27,55$
		Derivados	de Purinas				
Obs (mmol/ d)	18,93	17,80	15,27	13,58	31,0	0,98	$\hat{Y} = 19,18-0,056*x$
		Alantoín	a no leite				
Obs (mmol/d)	0,36	0,36	0,38	0,28	16,25	_	$\hat{Y} = 0.34$

^{**} e * significativo, respectivamente, a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F.

A porcentagem média de alantoína excretada variou de 65,25 a 67,37% em relação aos derivados de purinas, nas amostras de coleta total. A proporção de ácido úrico situou entre 6,11 e 6,76% e a de xantina e hipoxantina entre 26,09 e 28,33% (Tabela 5). Os valores de alantoína encontrados neste estudo estão próximos aos citados por Chen e Gomes (1992) para ovinos, que relataram as proporções de 60 a 80% de alantoína. De acordo com Chen et al. (1990a), a contribuição relativa de alantoína para ovinos foi de 55%. Para cabras leiteiras, Fonseca et al. (2006) encontraram variação da porcentagem média de 64,5 a 75,9% de alantoína.

Chen e Gomes (1992) e Chen et al. (1990a) reportaram para ovinos as proporções de 10 a 20% e 33% de ácido úrico, respectivamente. Igualmente, Fonseca et al. (2006) relataram uma proporção média entre 9,6 a 19,9% de ácido úrico para cabras. Esses resultados foram superiores aos observados neste estudo. No entanto, a proporção média relativa de xantina e hipoxantina foram superiores aos citados por aqueles autores, de 10 a 20% (CHEN e GOMES, 1992), 14% (CHEN et al., 1990a) e de 5,2 e 15,6% (FONSECA et al., 2006) de xantina e hipoxantina.

As escassas publicações a respeito de excreção de derivados de purinas em caprinos têm levado a diversas comparações com outras espécies. Mas, segundo Belenguer et al. (2002) a excreção basal de derivados de purinas em caprinos parece mostrar comportamento similar à de ovinos.

Belenguer et al. (2002) observaram que a alantoína representou de 80 a 92% do total de derivados de purinas excretado por cabras, valor superior ao relatado por Lindberg (1989), que observou porcentagens relativas ao total de derivados de purinas excretados de 54 a 76% de alantoína, 13 a 33% de ácido úrico e 10 a 13% de xantina e hipoxantina, em cabritos em aleitamento, essas porcentagens divergiram daquelas obtidas neste trabalho, exceto para as proporções relativas de alantoína.

Os valores médios obtidos para xantina e hipoxantina variaram de 4,84 a 3,76 mmol/ d, enquanto, os valores de ácido úrico variaram de 1,21 a 0,81 mmol/ d. Quando expressos em µmol/ kg PV^{0,75}, estes valores variaram de 296,52 a 232,80 e de 73,69 a 49,52 para xantina-hipoxantina e ácido úrico, respectivamente. Este resultado foi superior aos encontrados por Belenguer et al. (2002), de 23,5 a 55,0 µmol/ kg PV^{0,75} para xantina-hipoxantina e de 8,7 a 37,7 µmol/ kg PV^{0,75} para ácido úrico, e por Yáñez Ruiz et al. (2004), que trabalharam com cabras secas não gestantes e com cabritas alimentados com folhas de oliveira e uma suplementação a base de cevada e feijão forrageiro, estes autores observaram, respectivamente, os valores médios de 52,4 e 79,9 µmol/ kg PV^{0,75} de xantina e hipoxantina e de 20,4 e 22,6 µmol/ kg PV^{0,75} de ácido úrico. Expressos em mg/ d, foram obtidos neste estudo as seguintes médias, que variaram de 1977,69-1380,37 mg/ d de alantoína, 204,07-136,65 mg/ d de ácido úrico e 1395,80-1084,39 mg/ d de xantina-hipoxantina. Ots e Kärt (2003), trabalhando com carneiros alimentados com silagem de alfafa, obtiveram médias inferiores às relatadas no presente estudo, de 812-782, 68-73, 92-86 mg/ d para alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina, respectivamente.

Entretanto, Belenguer et al. (2002), trabalhando com cabras em abstinência alimentar, obtiveram as respectivas proporções médias relativas de 63,7, 9,15 e 27,2% de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina. Estes autores observaram que as concentrações de alantoína diminuíram significativamente com a restrição de alimento, a excreção de ácido úrico não foi afetada com a restrição e a excreção urinária de xantina e hipoxantina independe do tratamento. Eles atribuíram esta maior proporção de xantina e hipoxantina à baixa atividade da xantina oxidase em caprinos, principalmente, no intestino, fígado e plasma. Este fato deveria, segundo os autores, sugerir que as bases púricas exógenas podem passar através do trato gastrintestinal sendo disponibilizadas para incorporação direta no nucleotídeo tecidual pela via de salvamento das purinas, isto justificaria o baixo nível de excreção endógena determinada para caprinos 202,2 µmol/ kg PV^{0,75}, similar a ovinos (158 µmol/ kg PV^{0,75}) (BALCELLS et al. 1991).

Semelhante a Fonseca et al. (2006) a secreção de alantoína no leite não diferiu (P>0,05) entre os tratamentos e não acompanhou a tendência observada na excreção urinária de alantoína e de derivados de purinas. Concordando que a secreção de alantoína no leite parece não ser um bom estimador da produção microbiana em cabras.

A quantidade de purinas absorvidas (PA) e o fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (NM) estimados pela equação de Belenguer et al. (2002) e Chen e Gomes (1992) estão

apresentados na Tabela 6. A quantidade de purinas absorvidas, expressa em mmol/ d, apresentaram comportamento linear decrescente em relação a porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba, independentemente da equação utilizada. A estimativa da quantidade de PA pela equação proposta por Belenguer et al. (2002) apresentou-se superior (P<0,01), pelo teste t pareado, àquela estimativa calculada pela equação de Chen e Gomes (1992), este resultado é consistente com os valores observados por Andrade-Montemayor et al. (2004) e Fonseca et al. (2006).

Tabela 6 – Médias, coeficientes de variação (CV %) e determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para a quantidade de purinas absorvidas (PA), expressas em mmol/ d, e o fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (NM), expresso em gramas/ d, em função da porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA).

	% de subs	stituição do F	ubá de Milho	pelo FVA	A			
Item	0	33,3	66,7	100	CV%	r^2	Equação Ajustada	
			Coleta Total					
PA^1	24,91	23,42	20,10	17,87	31,0	0,98	$\hat{Y} = 25,23-0,073*x$	
PA^2	22,52	21,17	17,95	15,97	32,35	0,98	$\hat{Y} = 22,83-0,068*x$	
NM^1	13,74	12,92	11,09	9,86	31,0	0,98	$\hat{Y} = 13,92-0,040*x$	
NM^2	16,37	15,39	13,05	11,61	32,35	0,98	$\hat{Y} = 16,60-0,050*x$	

^{*} significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Apesar de a estimativa da quantidade de purinas absorvidas ter sido superior com o uso da equação de Belenguer et al. (2002), o fluxo intestinal de N-microbiano estimado pela equação de Chen e Gomes (1992) apresentou superioridade, pelo teste t pareado quando comparado àquele estimado pela equação de Belenguer et al. (2002). Esta informação está em concordância aos resultados encontrados por Fonseca et al. (2006) e por Andrade-Montemayor et al. (2004). A divergência entre os resultados referentes à quantidade de PA e fluxo de N-microbiano obtidos com a equação dos diferentes autores, possivelmente se deva, em parte, a digestibilidade considerada na elaboração das equações (FONSECA et al., 2006). Chen e Gomes (1992) e Belenguer et al. (2002) consideram a digestibilidade de 83 e 92%, respectivamente. Além disso, Andrade-Montemayor et al. (2004) relataram que a estimativa do fluxo de N-microbiano depende, sobretudo, da digestibilidade de purinas absorvidas no duodeno e que a razão entre o conteúdo de N-microbiano do rúmen e purinas absorvidas não é absoluta e pode variar de acordo com a dieta experimental. Esses autores ainda afirmaram que os modelos

¹ Belenguer et al. (2002), ² Chen e Gomes (1992).

propostos por Chen e Gomes poderiam superestimar o fluxo de N-microbiano em caprinos, informação que pode ser aceita para este estudo, visto que foi proposto por Belenguer et al. (2002) um modelo específico para caprinos e Chen e Gomes (1992) sugeriram um modelo para ovinos.

O fluxo de N-microbiano apresentou resposta linear decrescente à porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba.

Segundo Yu et al. (2002), as excreções de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina podem ser afetadas pela fonte de proteína dietética, fonte de energia, consumo de MS, consumo de energia, consumo de proteína, peso vivo, aditivos alimentares e espécies.

Neste estudo, os teores de CNF das dietas com adição de FVA como fonte de energia foram menores (Tabela 2), o que pode ter contribuído para a redução das excreções de alantoína, ácido úrico e xantina mais hipoxantina.

As respostas da produção de proteína bruta microbiana e a eficiência de síntese microbiana em relação aos níveis de substituição do fubá de milho pelo FVA no concentrado, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Médias, coeficientes de variação (CV %) e determinação (r²) e equações de regressão ajustadas para a produção de proteína microbiana PBmic, expressas em g/ d e a eficiência de síntese microbiana, expressa em g PBmic/ kg de nutrientes digestíveis totais-NDT), em função da porcentagem de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba (FVA).

	% de subs	ubá de Milho					
Item	0	33,3	66,7	100	CV%	r^2	Equação Ajustada
Coleta Total							
PBmic ¹	85,89	80,77	69,30	61,63	31,01	0,98	$\hat{Y} = 87,03-0,253*X$
PBmic ²	102,32	96,21	81,57	72,57	32,35	0,98	$\hat{Y} = 103,75-0,312*X$
PBmic/NDT ¹	91,30	81,26	69,79	67,14	28,81	0,95	$\hat{Y} = 89,96-0,252*X$
PBmic/NDT ²	108,77	96,78	82,24	78,57	30,24	0,95	$\hat{Y} = 107,36-0,315*X$

^{*} significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

A adição do FVA influenciou a produção e eficiência de síntese microbiana. A análise de regressão demonstrou ter havido efeito linear negativo da utilização do FVA sobre estas variáveis (P<0,05).

O valor para produção de PBmic das dietas contendo 0 e 33,3% de FVA (85,89 e 80,77 g/ d) foram semelhantes à dieta contendo 13,5% de PB (81,2 g/ d) no trabalho de Fonseca et al. (2006), enquanto para a eficiência de síntese microbiana os níveis de 66,7 e 100% de FVA foram aqueles que mais assemelharam com a dieta com 13,5% de PB do referido trabalho (66,7

¹Belenguer et al. (2002); ²Chen & Gomes (1992).

g de PBmic/ kg de NDT). Fonseca et al. (2006), trabalhando com cabras lactantes e dietas com teores crescentes de proteína bruta (PB), compostas por 47% de silagem de milho e 53% de concentrado à base de fubá de milho como fonte de energia e uréia e farelo de soja como fontes de proteína, observaram eficiência de síntese microbiana variando de 65,7 a 83,1, utilizando a equação de Belenguer et al. (2002) e de 69,2 a 85 g de PBmic/ kg de NDT, com a equação de Chen e Gomes (1992).

As produções de PBmic observadas por Bomfim (2003) foram inferiores quando comparadas com os valores obtidos neste experimento, que variaram de 52,07 a 76,87 g/d obtidas por meio da técnica das bases púricas (relação N-total/ N-RNA), ao estudar o efeito da razão AmAS: FSDN (0,82 a 5,35% na MS) em dietas de cabras lactantes.

Grande número de fatores pode limitar taxas máximas de crescimento dos microrganismos. A síntese de proteína parece ser o fator mais importante. Diferentes substratos podem requerer diferentes rotas metabólicas (enzimas, proteínas transportadoras e outras) e considerável quantidade de aminoácidos pode ser desviada das atividades de crescimento para este metabolismo específico. Este fato foi demonstrado por Russell et al. (1979), ao observarem que o crescimento de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Gram negativa) foi maior em maltose, celobiose e sacarose, quando comparado com glicose ou pentose. Acredita-se que certos substratos podem causar a ativação e síntese de certas enzimas que podem reduzir a produção de 5'-adenosina trifosfato por unidade de tempo.

No rúmen de cabras alpinas alimentadas com dietas de relação volumoso: concentrado de 63: 37, de um total de 44 cepas de bactérias isoladas, 70% das espécies foram classificadas como *B. fibrisolvens* (DEHORITY e GRUBB, 1977). Marounek e Dusková (1999) estudaram o metabolismo da pectina em bactérias *B. fibrisolvens* e observaram alta atividade da enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase (KDPGA), quando a pectina era fermentada, porém, quando o substrato era glicose, não foi detectada atividade desta enzima no meio. Isto indica que a fermentação dos resíduos de pectina não é feita pela via das pentoses acoplada à via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), como se acreditava, mas sim pela via Entner-Duodoroff (ED).

Embora a via ED difira da EMP, ambas produzem dois moles de piruvato por mol de hexose, mas, uma vez que 1 ATP é gasto para fosforilar a hexose e 2 ATP são formados quando a hexose é convertida em piruvato, a produção líquida de ATP por mol de hexose é de 1 na via ED, em contraste à produção líquida de 2 ATP na via EMP (BURROWS, 1973). Estas evidências são confirmadas por Russell (1988), quando afirma que o uso da via EMP é vantajosa aos microrganismos anaeróbios, porque maximizam a produção de ATP.

Na via ED, o ácido galacturônico, convertido a ácido 6-fosfoglucônico, não é transformado em ribulose-5-P, que, na sequência, seguiria a via das pentoses até frutose-6-P, mas é convertido a ácido 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, que por ação da enzima KDPGA,

resultaria em uma molécula de piruvato e outra de gliceraldeído-3-P. O gliceraldeído é, então, convertido em piruvato no mesmo esquema da via EMP (BURROWS, 1973).

Assim, na fermentação de um mol de glicose até ácido acético, há ganho líquido de 4 ATP (RUSSELL, 1988), enquanto a fermentação de resíduos de pectina apenas 3, ou seja, 25% menos energia a partir de uma hexose, sem contar o custo energético da síntese de enzimas específicas como a KDPGA. A eficiência de síntese de proteína microbiana estimada em g NMic/ kg de NDT, neste estudo, para o tratamento com 100% de FVA no concentrado foi aproximadamente 27% inferior àquele em que se utilizou 100% de fubá de milho no concentrado.

Estas evidências podem explicar parcialmente a redução na síntese de proteína do leite, observada em estudos com dietas ricas em FSDN (BOMFIM, 2003) e a resposta em produção de leite ao suprimento de proteína de baixa degradabilidade em dietas com maior proporção de FSDN em relação ao amido, como observado por Mertens et al. (1994). Portanto, sugere-se que dietas com alta proporção de FSDN na forma de pectina podem limitar o suprimento de proteína metabolizável de origem microbiana para o intestino delgado e requerer suplementação dietética de fontes protéicas de baixa degradabilidade ruminal.

5. CONCLUSÕES

- A utilização do farelo da vagem de algaroba não alterou os parâmetros de fermentação ruminal em cabras lactantes. Sugere-se a realização de mais pesquisas com adição de algaroba na dieta de animais ruminantes, pois existem evidências de que seu fornecimento a esses animais reduz a relação acetato: propionato no líquido ruminal.
- A adição de farelo da vagem de algaroba na dieta proporcionou excreção decrescente de derivados de purinas e fluxo intestinal decrescente de compostos nitrogenados microbianos.
- Considerando a secreção de alantoína no leite sugere-se que não seja um bom indicador para estimar a produção microbiana em cabras, mas deve ser somada à excreção urinária de derivados de purinas para não subestimar a absorção intestinal de bases púricas.
- A estimativa da produção de proteína microbiana em cabras deve ser calculada por meio da excreção de derivados de purinas a partir de equações obtidas com caprinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. AHMAD, A.; KHURSEED, A.K.; SABIHA, Q. et al. Antifungial activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**. v.60, n.1, p.86-89. 1989.
- 2. ALCALDE, C.R.; ZAMBOM, M.A.; BORGHI, E.L. et al. Variação do custo e da receita de produção de leite de cabras Saanen, recebendo rações com diferentes relações de volumoso:concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences.** Maringá. v.27, n.4, p. 547-553, 2005
- 3. AN, D.; DONG, X.; DONG, Z. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. **Anaerobe**. v.11, p.207-215. 2000.
- 4. ANDRADE-MONTEMAYOR, H.; HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J. et al. Comparison of different models to estimate purine bases absorbed in goats. **South African Journal of Animal Science**. *Peer-reviewed paper: 8th International Conference on Goats*. v.34. 2004. (supl. 1).
- 5. ARREZA, L.C; JIMÉNEZ, H.R; SÁNCHEZ, D.E et al. Determinación de la excreción total de alantoína en suero de leche por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en vacas Holstein alimentadas con pasto kikuo (*Pennisetum clandestinum*). **Revista Corpoica**. v.5, n.1, p.64-69. 2004.
- 6. AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A. et al. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Arzneimittelforschung.** v.39, n.6, p.652-655. 1989.
- 7. BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; CASTRILLO, C. et al. Urinary excretion of allantoin and allantoin precursors by sheep after defferent rates of purine infusion into the duodenum. **Journal of Agricultural Science Cambridge.**v.116, p.309-317. 1991.
- 8. BATISTA, A.M.; MUSTAFA, A.F.; McKINNON, J.J. et al. In situ ruminal and intestinal nutrient digestibilities of mesquite (*Prosopis juliflora*) pods. **Animal Feed Science and Technology.** v.100, p.107-112. 2002.
- 9. BECKERS, Y. e THÉWIS, A. Excretion of purine in urine of Belgian blue bulls following duodenal infusion from Torula yeast. **Proceedings of the Society for Nutrition Physiology**. v.3, p.235. 1994.
- 10. BELENGUER, A.; YANEZ, D.; BALCELLS, J. et al. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. **Livestock Production Science**. v.77, p.127-135. 2002.
- 11. BELIBASAKIS, N.G. e TSIRGOGIANNI, D. Effects of dried citrus pulp on milk composition and blood components of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology.** v.60, p.87-92. 1996.
- 12. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Koogan, 2004. cap. 25, p.716-738.
- 13. BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**. v.70, n.2 567-590. 1990.

- 14. BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P. et al. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.
- 15. BOMFIM, M.A.D. **Carboidratos solúveis em detergente neutro em cabras leiteiras.** 2003. 120p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- 16. BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J.; ØRSKOV, E.R. Control of rate and extent of protein degradation. *In*: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (eds.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York, Academic. 1991. p.542-292.
- 17. BRODERICK, G.A. e MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v.75, n.9, p. 2618-2632. 1992.
- 18. BUSATO, Otto. Ácido úrico. **ABC SAÚDE**. Disponível em: http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php>. Acesso em: 23 de maio de 2007.
- 19. BURROWS, W. **Textbook of microbiology.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1973. 1035p.
- 20. CALDERON, I.E.J.; DePETERS, N.E.; SMITH, N.E. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Animal Science**. v.67, p.1905. 1983.
- 21. CAMPOS, R.; GONZÁLEZ, F. COLDEBELLA, A. et al. Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção. **Ciência Rural**. v.36, n.2, p.525-530. 2006.
- 22. CARDOSO, R.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Síntese microbiana, pH e concentração de amônia ruminal e balanço de compostos nitrogenados, em novilhos F1 Limousin x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.6, p.1844-1852. 2000.
- 23. CARVALHO, A.U.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 3. Eficiência microbiana e população de protozoários ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.26, n.5, p.1007-1015. 1997.
- 24. CAVALCANTE, M.A.B.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.1, p.203-210. 2006.
- 25. CECAVA, M.J.; MERCHEN, N.P.R.; BERGER, L.L. et al. Effect of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. **Journal Animal Science**. v.69, p.2230-2243. 1991.
- 26. CHEN, X.B.; ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F.D.DeB. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. **British Journal of Nutrition.** v.63, p.121-129. 1990a.
- 27. CHEN, X.B.; HOVELL, F.D.DeB.; ØRSKOV, E.R. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. **British Journal of Nutrition.** v.63, p.131-142. 1990b.

- 28. CHEN, X.B. e GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: on overview of technical details. **International feed research unit**. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. (Occasional publication) 21 p. 1992.
- 29. CHEN, X.B.; MEJIA, A.T.; ØRSKOV, E.R. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. **Journal of Agricultural Science**. v.125, p.137-143. 1995.
- 30. CHEN, X.B. e ØRSKOV, E.R. Research on urinary excretion of purine derivatives on ruminants: past, present and future. **International Feed Research Unit**, United Kingdom. p.1-34, 2003.
- 31. CHOUDHARY, M.I.; NAWAY, S.A.; ZAHEER-UL-IIAQ, A. et al. Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communication.** v.332, n.4, p.1171-1179. 2005.
- 32. CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.75, n.8, p.2304-2323. 1992.
- 33. COELHO DA SILVA, J.F.C. e LEÃO, M.I. **Fundamentos de Nutrição dos Ruminantes**. Piracicaba: Livroceres. 1979. 384p.
- 34. CORDEIRO, P.R.C. Mercado do leite de cabra e de seus derivados. **Revista CFMV.** Brasília. Ano XII, n.39, p.19-23. 2006.
- 35. DANELÓN, J.L.; ALLOCATI, P.; WAWRZIEWICZ, M. et al. Performance of dairy goats to alfalfa silage based diets supplemented with different sources of carbohydrates. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, São Paulo, Anais... São Paulo, 2001, CD ROM.
- 36. DEHORITY, B. A. e GRUBB, J.A. Characterization of the predominant bacteria occurring in the rumen of goat (*Capra hircus*). **Applied and Environmental Microbiology.** v.33, n.5. 1977.
- 37. DIAS, H.L.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Eficiência de síntese microbiana, pH e concentração ruminais de amônia em novilhos F1 Limousin x Nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.2, p.555-563. 2000.
- 38. EARDMAN, R.A.; PROCTOR, G.H.; VANDERSALL, J.H. Effect of rumen ammonia concentration on 'in situ' rate an extent of digestion of foodstuffs. **Journal of Dairy Science**. v.29, n.9, p.2312-2320. 1986.
- 39. FAHEY, G.C. e BERGER, L.L. Los carbohidratos em la nutrición de los ruminantes. *In:* CHURCH, D.C (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Acribia, S.A. 1993. cap. 14, p.305-323.
- 40. FEDELE, V.; CLAPS, S.; RUBINO, R. et al. Effect of free-choice and traditional feeding systems on goat feeding behavior and intake. **Livestock Production Science**. v.74, p.19-31, 2002.

- 41. FERNANDEZ, J.M.; SAHLU, T.; LU, C.D. et al. Production and metabolic aspects of nonprotein incorporation in lactation rations of dairy goats. **Small Ruminant Research**. v.26, p.105-117. 1997.
- 42. FIGUEIREDO, L.J.C.; FERREIRA, M.M.; TÁVORA, J.P.F. et al., Estudo clínico e anatomomorfológico da doença "cara-torta" em bovinos no nordeste brasileiro. **Arquivo de Medicina Veterinária UFBA**. v.18, n.1, p.175-183. 1995.
- 43. FIGUEIREDO, A.A. e SILVA, A.F. Construction of o pilot-scale forced hot air dryer aiming at drying of mesquite (*Prosopis juliflora* DC) pods. Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Fortaleza, Ceará. Agosto. 2000.
- 44. FIGUEIREDO, M.P.; QUADROS, D.G.; CRUZ, J.F. Acidez total titulável, pH e tempo de redução do azula de metileno no fluido ruminal de caprinos mantidos em pastagens artificiais, exclusiva de gramíneas, ou em caatinga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.37; n.5. 2000.
- 45. FONSECA, C.E.M. **Proteína bruta em dietas de cabras em lactação**. 2004. 108p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- 46. FONSECA, C.E.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimativa da produção microbiana em cabras lactantes alimentadas com diferentes teores de proteína na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.3, p.1169-1177. 2006 (supl.).
- 47. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **FAOSTAT**, Data Base. 2004. Disponível em: <>. Acesso em: 07 de abril de 2007.
- 48. FRANCE, J.; SIDDONS, R.C. Volatile fatty acids productions. *In*: FORBES, J.M. e FRANCE, J. (eds.) Quantitative aspects of ruminal digestion and metabolism. Cambridge, UK: University Press. P.107-121.
- 49. FREGADOLLI, F.L.; ZEOLA, L.M.; BRANCO, A.F. et al. Efeito das fontes de amido e nitrogênio de diferentes degradabilidades ruminais. 2. pH, concentração de amônia no líquido ruminal e eficiência de síntese microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.3, p.870-879. 2001.
- 50. FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**. v.109, p.7-12. 1987.
- 51. FUJIHARA, T.; SHEM, M.N.; MATSUI, T. Urinary excretion of purine derivatives and plasma allantoin level in sheep and goats during fasting. **Animal Science Journal**. v.78, n.2, p.129-134. 2007.
- 52. FUNABA, M.; KAGIYAMA, K.; IRIKI, T. et al. Duodenal flow of microbial nitrogen estimated from urinary excretion of purine derivatives in calves after early weaning. **Journal Animal Science**. v.75, p.1965-1973. 1997.
- 53. GIESECKE, D.; EHRENTREICH, L.; SATANGASSINGER, M. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.77, p.2376-2381. 1994.
- 54. GOMES, L.; BOGAERT, C.; JOUANY, J.P. et al. The influence of lasalocid and catinomicin on nitrogen digestion in sheep: comparison of methods for estimating microbial nitrogen. **Canadian Journal of Animal Science**. v.71, n.2, p.389-399. 1991.

- 55. GONDA, H.L. e LINDBERG, J.E. Effect of diet on milk allantoin and its relationship with urinary allantoin in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.80, n.2, p.364-373. 1997.
- 56. GONÇALVES, A.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T. et al. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.6, p.1886-1892, 2001.
- 57. GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A et al. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**. v.86, n.4, p.1282-1291. 2003.
- 58. GROSSI, J.L.S. e FIGUEIREDO, A.A. Elaboração e composição de uma geléia formulada com polpa de vagens de algarobeira (*Prosopis juliflora* DC). Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Fortaleza, Ceará. Agosto. 2000.
- 59. HABIT, M.A. e SAAVEDRA, J.C. (eds.) **The current state of knowledge on** *Prosopis juliflora*. FAO, Plant Production and Protection Division, Rome, Italy. 1988.
- 60. HALL, M.B.; HOOVER, W.H.; JENNINGS, J.P. et al. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal Science Food and Agriculture.** v.79, n.15, p.2079-2086. 1999.
- 61. HALL, M.B. Recentes avanços em carboidratos não fibrosos na nutrição de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE, 2., 2001, Lavras, MG. Anais... Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras-FAEPE., 2001. p.149-159.
- 62. HOOVER, W.H. e STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**. v.74, n.10, p.3630-3644. 1991.
- 63. HORTON, G.M.J.; CHESWORTH, J.M.; SRIKANDAKUMAR, A. et al. Nutritional value of *Acacia fortilis* and *Prosopis cineraria* pods for sheep. **Journal Animal Science.** v.71, p.271. 1993 (resumo).
- 64. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal. **IBGE**. 1996. Disponível em: <<ht><<htp://www.ibge.gov.br>>>. Acesso em: 07 de abril de 2007.
- 65. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal. **IBGE**. 2005. Disponível em: <<ht><<ht><htp://www.ibge.gov.br>></h>>. Acesso em: 07 de abril de 2007.
- 66. ÍTAVO, L.C.V.; SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C. et al. Avaliação da silagem de bagaço de laranja com diferentes aditivos por intermédio dos parâmetros de fermentação ruminal de ovinos e contribuição energética dos ácidos graxos voláteis. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.5, p.1491-1497. 2000.
- 67. ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. et al. Produção microbiana e parâmetros ruminais de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n.3, p.1553-1561. 2002 (supl.).
- 68. JOHNSON, L.M.; HARRISON, J.H; RILEY, R.E. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science**. v.81, n.9, p.2408-2420. 1998.

- 69. KAUSHIK, J.C.; SANJAY, A.; TRIPATHI, N.N. Antifungial properties of some plant extracts against the damping-off fungi of forest nurseries. **Indian Journal For.** v.25, n.3 e 4, p.359-361. 2002.
- 70. KRAUSE, D.O.; SMITH, W.J.M.; McSWEENEY, C.S. Use of community genome (CGAs) to assess the effects of *Acacia angustissima* on rumen ecology. **Microbiology**. v.150, p.2899-2909, 2004.
- 71. LADEIRA, M.M.; RODRIGUEZ, N.M.; BORGES, I. et al. Balanço de nitrogênio, degradabilidade de aminoácidos e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen de ovinos alimentados com feno de *Stylosanthes guianensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n.6, p.2357-2363. 2002.
- 72. LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal Animal Science**. v.76, p. 2190-2196. 1998.
- 73. LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; RODRIGUES, M.T. et al. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.1, p.191-197. 2007.
- 74. LAVEZZO, O.E.N.M.; LAVEZZO, W.; WESCHSLER, F.S. Estado de desenvolvimento do milho. 3. Avaliação de ensilagens por intermédio de parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.27, n.1, p.171-178. 1998.
- 75. LEIVA, E.; HALL, M.B.; VAN HORN, H.H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrate. **Journal of Dairy Science.** v.83, p.2866-2875. 2000.
- 76. LINDBERG, J.E.; BRISTAV, H.; MANYENGA, A.R. Excretion of purines in of the sheep in relation to duodenal flow of microbial protein. **Swedish Journal of Agricultural Research**. v.19, p.45-52. 1989.
- 77. LINDBERG, J.E. Nitrogen metabolism and urinary excretion of purines in goat kids. **British Journal of Nutrition**. v.61, p.309-321. 1989.
- 78. LONDOÑO HERNÁNDEZ, F.I.; VALADARES FILHO, S.C.; LANA, R.P. et al. Avaliação de dois métodos *in vitro* para determinar a cinética ruminal e a digestibilidade intestinal da proteína de vários alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n.1, p.256-266. 2002.
- 79. LU, C.D. e POTCHOIBA, M.J. Implications of forage particle length on chewing activities and milk production in dairy goat. **Journal of Dairy Science.** v.70, p.1411. 1987.
- 80. MAGALHÃES, K.A.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Produção de proteína microbiana, concentração plasmática de uréia e excreções de uréia em novilhos alimentados com diferentes níveis de uréia ou casca de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.4, p.1400-1407. 2005.
- 81. MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; JOHNSON, E. H. et al. The use of a concentrate containing Meskit (*Prosopis juliflora*) pods and date palm by-products to replace commercial concentrate in diets of Omani sheep. **Animal Feed Science and Technology**. v.120, p.33-41. 2005a.
- 82. MAHGOUB, O.; KADIM, I.T.; FORSBERG, N. E. et al. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. **Feed Science and Technology**. v.125, 319-327. 2005b.

- 83. MAROUNEK, M. e DUSKOVÁ. D. Metabolism of pectin bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. **Letters in Applied Microbiology.** v.29, p.429-433. 1999.
- 84. MARTÍN-ORÚE, S. M.: DAPOZA, C.; BALCELLS, J. et al. Purine derivatives excretion in lactating ewes fed straw diets with different levels of fish meal. **Animal Feed Science and Technology**. v.63, p.341-346. 1996 (*Short Communication*).
- 85. MARTINS, A. de S.; PRADO, I.N. do; ZEOULA, L.M. et al. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.1, p.269-277. 2000.
- 86. MAZZUCA, M.; KRAUS, W.; BALZARETTI, V. Evaluation of the biological activities of crude extracts from Patagonian prosopis seeds and some of their active principles. **Journal Herb Pharmacother.** v.3, n.2, p.31-37. 2003.
- 87. McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.78-88. 2001.
- 88. MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, JM.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Balanço de compostos nitrogenados, produção de proteína microbiana e concentração plasmática de uréia em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.2, p.493-503. 2004.
- 89. MERCHEN, N.R.; FIRKINS, J.L.; BERGER, L.L. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. **Journal Animal Science**. v.62, n.1, p.216-225. 1986.
- 90. MERTENS, D.R. Analysis of fiber in feeds and its use in feed evaluation and ration formulation. *In*: Simpósio Internacional de Ruminantes, 1992, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1992. p.1-32.
- 91. MERTENS, D.R.; BRODERICK, G.A.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for improving utilization of N in silage. **Journal of Dairy Science.** v.77, p.240. 1994 (supl. 1)
- 92. MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.80, p.1463-1481. 1997.
- 93. 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, n.9, p.3552-3562. 2006.
- 94. MORAND-FEHR, P. e SAUVANT, D. Composition and yield production of goat milk as affected by nutritional manipulation. **Journal of Dairy Science.** v.63, p.1671-1680. 1982.
- 95. MORAND-FEHR, P. Recent developments in goat nutrition and application: A review. **Small Ruminant Research**. v.60, p.25-43. 2005.
- 96. MORIWARI, Y.; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzimes involved in purine metabolism a review of histochemical localization and functional implications. **Histology Histophatology**. v.14, n.4, p.1321-1340. 1999.
- 97. MOSCARDINI, S.; WRIGHT, T.C.; LUMIMES, P.H. et al. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on purine derivative and urea nitrogen: comparison with predictions

- from Cornell Net Carbohydrate and protein system. **Journal Dairy Science.** v.81, n.9, p.2421-2429. 1998.
- 98. MOTOJIMA, K. e GOTO, S. Characterization of liver-specific expression of rat uricase using monoclonal antibodies and cloned cDNAs. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1087, p.316-326. 1990.
- 99. MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.V.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. 2. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. **Animal Feed Science and Technology**. v.10, p.15-25. 1983.
- 100. NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N. e Stewart, C.S. (eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional and Chapman & Hall publishers, 1997. p.523-600.
- 101. NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; HIRADATE, S. et al. Growth inhibitory alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) leaves. **Phytochemistry.** v.65, p.587-591. 2004a.
- 102. NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y. et al. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). **Plant Growth Regulation**. v.44, p.207-210.2004b.
- 103. NATIONAL RESEARCH COUNCIL NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001.
- 104. NELSON, D.L. e COX, M.M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap.22, p.674-677.
- 105. NOBRE, F.V. A algarobeira no Nordeste brasileiro, especialmente no Rio Grande do Norte. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ALGAROBA, 1, 1982. Natal. **Anais ...** Natal: Emparn, 1982, p.257-282.
- 106. NOCEK, I.E e RUSSELL, J.B. Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. **Journal of Dairy Science**. v.71, n.8, p.2070-2107. 1988.
- 107. NOLAN, J.V. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.47, n.2, p.227-246. 1993.
- 108. NUNES, I.J. **Nutrição Animal Básica**. 2 ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1998. 387p.
- 109. OLIVEIRA, M.D.S.; SAMPAIO, A.A.M.; VIEIRA, P.F. et al. Efeito de métodos de coleta de fluido ruminal em bovinos sobre alguns parâmetros ruminais e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v.34, n.5, p.867-871. 1999.
- 110. OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.30, n.5, p.1621-1629. 2001.

- 111. OLIVEIRA, C.A.S.; PEREIRA, M.L.A.; ALMEIDA, P.J.P. et al. Farelo da vagem de algaroba em substituição ao fubá de milho na alimentação de cabras Saanen. 1. Produção e composição do leite. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44, 2007. Jaboticabal, SP, **Anais...** Jaboticabal, SP: Universidade do Estado de São Paulo, 2007. CD-ROM.
- 112. ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M. et al. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**. v.68, p.243-250, 2001.
- 113. OTS, M. e KÄRT, O. Effect of grain species on purine derivative excretion via urine in feeding leguminous silage to rams. **Veterinarija ir Zootechnika**. v.22, p.73-77. 2003.
- 114. OWENS, F.N. e ZINN, R. Metabolismo de la proteína em los rumiantes. *In:* CHURCH, D.C (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Acribia, S.A. 1988. cap. 12, p. 255-283.
- 115. OWENS, F.N. e GOETSCH, A.L. Fermentacion ruminal. *In:* CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap. 8, p. 159-189.
- 116. ØRSKOV, E.V. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal Animal Science**. v.63, n.5, p.1624-1633. 1986.
- 117. PEREIRA, M.L.A. **Proteína na dieta de vacas nos terços inicial e médio da lactação**. 2003. 105p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- 118. 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 ¹⁵N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenal. **British Journal of Nutrition**. v.75, p.699-709. 1996.
- 119. PETERSON, A.B. Estimation of rumen microbial protein production and ruminal protein degradation. 2006. 161p. Thesis (Doctored) Faculty of the Graduate School of the University of Maryland-College Park.
- 120. PIMENTA FILHO, E.C. e SIMPLÍCIO, A.A. Caprinocultura leiteira no Brasil: Estado da arte e perspectivas. *In*: Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Trapical Brasileira; 1; 1994, Sobral. **Anais...** Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.47-76.
- 121. PIMPA, O.; LIANG, J.B.; JELAN, Z.A. et al. Urinary excretion of duodenal purine derivatives in Kedah-Kelantan cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v.92, p.203-214. 2001.
- 122. PINA, D.S; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.35, n.4, p.1552-1559. 2006.
- 123. PIRES, I.E. Caracterização da base genética de uma população de Algaroba *Prosopis juliflora* (SW) DC existente na região de Soledade PB. **IPEF**. n.30, p.29-36. 1985.
- 124. PUCHALA, R. e KULASEK, G.M. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. **Canadian Journal of Animal Science**. v.72, p.821-830. 1992.

- 125. QUINTANS, F. de A. **Algaroba: uma esperança para a pecuária no semi-árido nordestino**. 31 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://caprinet.com.br.>http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.http://caprinet.com.br.<a href="http://ca
- 126. RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimativa da produção microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.29, n.4, p.1223-1234. 2000a.
- 127. RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.4, p.1235-1243. 2000b.
- 128. RIBEIRO Jr., J.I. Análises estatísticas no SAEG (Sistema para análises estatísticas). Viçosa, MG: UFV, 2001. 301p.
- 129. RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia, pH ruminais em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.2, p.581-588. 2001.
- 130. RIHANI, N.; GARRET, W.N.; ZINN, R.A. Effect of source of supplemental nitrogen on the utilization of citrus pulp-based diets by sheep. **Journal Animal Science**. v.71, p.2310-2321. 1993.
- 131. ROCHA FILHO, R.R.; MACHADO, P.F.; D' ARCE, R.D. et al. Polpa cítrica e de milho e a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen. **Scientia Agricola**. v.56, n.2. 1999.
- 132. RUSSELL, J.B.; DELFINO, F.J.; BALDWIN, R.L. Effects of combinations of substrates on maximum growth rates of several rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology.** v.37, n.3, p.544-549. 1979.
- 133. RUSSELL, J.B. Energy yielding and consuming reactions. In: HOBSON, P.N. (ed.) **The rumen microbial ecosystem.** London: Elsevier Science Publishers, 1988. p. 85-215.
- 134. RUSSELL, J.B. The importance of in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.3222-3230. 1998.
- 135. SANDOVAL-CASTRO, C.A. e HERRERA-GOMEZ, F. Estimación de la síntese de proteina microbial en rumiantes a traves de la medición de los derivados de purina en orina. **Revista Biomédica**. v.10, p.241-251. 1999.
- 136. SANTINI, F.J.; LU, C.D.; POTCHOIBA, M.J. et al. Dietary fiber and milk yield, mastigation digestion and pasaje in goats fed alfalfa hay. **Journal of Dairy Science.** v.75, p.209-219. 1992.
- 137. SANTOS, A.B.; PEREIRA, M.L.A.; ALMEIDA, P.J.P. et al. Composição químico-bromatológica do farelo da vagem de algaroba com e sem tratamento térmico. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 44, 2007, Jaboticabal, SP. Anais: CD-ROM. Nutrição de Ruminantes.
- 138. SARTI, L.L.; JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F. et al. Degradação ruminal da matéria seca, da proteína bruta e da fração fibra de silagens de milho e de capim-elefante. **Ciência Animal Brasileira**. v.6, n.1, p.1-10. 2005.

- 139. SATISH, S.; RAVEESHA, K.A.; JANARDHANA, G.R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. **Letters in Applied Microbiology.** v.28, p.145-147. 1999.
- 140. SAWAL, R.K.; RATAN, R.; YADAV, S.B.S. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource livestock A Review. **Asian-Australasian Journal Animal Science**. v.17, n.5, p.719-725. 2004.
- 141. SHINGFIELD, K.J. e OFFER, N.W. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactating dairy cows. **Animal Science**. v.67, p.371-385. 1998.
- 142. SILVA, M.F. *et al.* Efeito da adição de capim elefante a dietas a base de palma forrageira sobre a fermentação ruminal em bovinos. *In:* REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p.140-142.
- 143. SILVA, R.M.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Uréia para vacas em lactação. 2. estimativa do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.6, p.1948-1957. 2001.
- 144. SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M. et al. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**. v.24, n.4, p.460-464. 2001.
- 145. SILVA, F.F.; ÍTAVO, C.C.B.F.; ÍTAVO, L.C.V. et al. Aspectos do metabolismo de nitrogênio. *In:* ÍTAVO, L.C.V. e ÍTAVO, C.C.B.F. (eds.). **Nutrição de Ruminantes: aspectos relacionados à digestibilidade e ao aproveitamento de nutrientes**. Campo Grande: UCDB, 2005. cap. 9, p. 171-184.
- 146. SILVA, A.M.M.; SILVA, A.R.; PINHEIRO, A.M. et al. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation cytotoxicity and stimulate NO production. **Toxicon**. v.49, p.601-614. 2007.
- 147. SILVA, D.J. e QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária. 2002. 235p.
- 148. SIMPLÍCIO, A.A. A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio. **Revista CFMV.** Brasília. Ano VII, n.24, p.15-18. 2001.
- 149. SIMPLÍCIO, A.A. e SIMPLÍCIO, K.M.M.G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. **Revista CFMV.** Brasília. Ano XII, n.39, p.7-18. 2006.
- 150. SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. v.70, p.3562-3577. 1992.
- 151. SOARES, C.A.; CAMPOS, J.M.S; VALADARES, R.F.D. et al. Produção de proteína microbiana e parâmetros ruminais em vacas leiteiras alimentadas com farelo de trigo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, n.1, p.345-350. 2005.
- 152. STOKES, S.R.; HOOVER, W.H.; MILLER, T.K. et al. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. **Journal of Dairy Science**. v.74, p.871. 1991.
- 153. STROBEL, H.L. e RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**. v.69, n.11, p.2941-2947. 1986.

- 154. SUTTON, J.D.; DHANOA, M.S.; MORANT, S.V. et al. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **Journal of Dairy Science**. v.86, n.11, p.3620-3633. 2003.
- 155. TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.; GRAÇA, D.L. et al. Neuronal vacuolation of the trigemial nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods. **Veterinary and Human Toxicology**. v.42, p.155-158. 2000.
- 156. TEBOT, I.; BRITOS, A.; GODEAL, J.M. et al. Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea sparing in normal and low protein fed Corridale sheep. **Veterinary Research**. v.33, p.101-106. 2002.
- 157. TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de ruminantes**. 2001. 182 p. Curso de Pós Graduação *Latu Sensu* (Especialização) à distância: Produção de Ruminantes. Lavras: UFLA/ FAEPE.
- 158. TIMMERMANS Jr., S.J.; JOHNSON, L.M; HARRISON, J.H. et al. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.1286-1299. 2000.
- 159. VAGNONI, D.B.; BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. et al. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. **Journal of Dairy Science**. v.80, n.8, p.1695-1702. 1997.
- 160. VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. et al. Eficiência da síntese microbiana em novilhos holandeses, nelores e búfalos mestiços, obtida por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.19, n.5, p.424-430. 1990.
- 161. VALADARES FILHO, S.C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. *In:* SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. **Anais...** Viçosa-MG, 1995. p.355-388.
- 162. VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA Jr., V.R. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2 ed. Viçosa MG. UFV; DZO, 2006. xv, 329p. il.; 30 cm.
- 163. VALADARES FILHO, S.C., PINA, D.S., AZEVEDO, J.A.G. et al. Estimativa da produção de proteína microbiana utilizando a excreção de derivados de purinas na urina. *In:* RENNÓ, F.P. e SILVA, L.F.P. (eds.) **Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes**. Pirassununga: USP. 2007.
- 164. VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; SAMPAIO, I.B. et al. Metodologia de coleta da urina em vacas utilizando sondas de folley. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.26, n.6, p. 1279-1282. 1997.
- 165. VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfalfa silage with moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**. v.82, n.12, p.2686-2696. 1999.
- 166. VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- 167. VERBIC, J. CHEN, X.B.; MACEDO, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**. v.114, p.243-248. 1990a.

- 168. VERBIC, J. CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion into duodenum. **Journal of Agricultural Science Cambridge**.v.114, p.243-248. 1990b.
- 169. VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) Viçosa Universidade Federal de Viçosa.
- 170. WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant. *In*: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 61. 1999. Proceeding, Ithaca: Cornell University. p.176-185. 1999.
- 171. YÁÑEZ RUIZ, D.R.; MATÍN GARCÍA, A.I.; MOUMEN, A. et al. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivative excretion in goats and wethers fed diets base don olive leaves. **Journal Animal Science**. v.82, p.3006-3014. 2004.
- 172. YOKOYAMA, M.T. e JOHNSON, K.A. Microbiología del rumen e intestino. *In:* CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap.7, p. 137-157.
- 173. YU, P.; EGAN, A.R.; BOON-EK, L. et al. Purine derivative excretion and ruminal microbial yield in growing lambs fed raw and dry roasted legume seeds as protein supplements. **Animal Feed Science and Technology**. v.95, n.1-2, p.33-48. 2002.

CAPÍTULO 2

Análise Molecular da População Bacteriana Ruminal de Cabras Lactantes Alimentadas Com Farelo da Vagem de Algaroba

1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes e microrganismos ruminais têm uma relação de simbiose que permite e facilita a digestão da fibra. O ecossistema microbiano do rúmen, portanto, é considerado um ambiente estável e dinâmico. Estável, porque os microrganismos são bem adaptados e o desempenho de suas funções durante a bioconversão dos alimentos é bastante eficiente. E é dinâmico, pois as populações microbianas variam consideravelmente com as mudanças das dietas, bem como a novos ingredientes alimentares (KAMRA, 2005).

Desde o desenvolvimento da técnica de Hungate, há mais de 100 anos, em que as bactérias ruminais estritamente anaeróbias foram cultivadas pela primeira vez, a microbiologia ruminal têm tido um impacto significativo dentro da microbiologia geral, pois Hungate estimulou os estudos dos ecossistemas ecológicos microbianos, dando início uma importante área, a microbiologia anaeróbia.

A biodiversidade bem como o número total de microrganismos no trato gastrintestinal (TGI) são determinados por fatores intrínsecos como o local do TGI ou genético, e por fatores extrínsecos como a dieta e saúde do animal (VAUGHAN et al., 2000), além disso, o crescimento microbiano no rúmen é influenciado pela interação dos fatores químicos, fisiológicos e nutricionais (VAN SOEST, 1994). A qualidade e a quantidade dos produtos de fermentação são dependentes do tipo e da atividade dos microrganismos que compõem a população, que, por sua vez, dependem da dieta (VAN SOEST, 1994; PEREIRA, et al., 2003).

Os ecossistemas microbianos têm sido estudados por décadas, objetivando explorar a diversidade e analisar a estrutura das comunidades microbianas (HAHN, 2001; McCRACKEN et al., 2001; FERRIS et al., 1995). No entanto, este estudo é dificultado por falhas nos conceitos e nas metodologias utilizadas na identificação de microrganismos, assim como na análise dessas comunidades complexas. A detecção e identificação foram quase completamente estabelecidas por meio de métodos baseados no cultivo e o conceito de espécies era fundamentado, de preferência, no fenótipo ao invés de características genotípicas, entretanto, o fenótipo de um organismo é menos estável que o genótipo (VAUGHAN et al., 2000).

Além do mais, a classificação de microrganismos sobre os aspectos fisiológicos e bioquímicos, é quase que impossível, porque a maioria, aproximadamente 99%, de todos os

microrganismos da natureza não podem ser isolados em culturas puras (MUYZER, 1999). Por este motivo, o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitam o estudo da diversidade microbiana é de fundamental importância.

O estudo da diversidade microbiana aborda questões sobre composição, estrutura e equilíbrio ecológico dessas comunidades, além de buscar o entendimento sobre a atividade e a função de seus habitantes (GIOVANNONI et al., 1990; TORSVIK et al. 1990). Além disso, o estudo da diversidade microbiana ruminal tenta compreender as transformações que ocorrem no rúmen, e também explicações sobre a natureza da fermentação e a maneira como isto afeta a nutrição do ruminante (WALLACE, 1994).

Entretanto, a maior parte das informações refere-se aos genes envolvidos com a degradação dos polissacarídeos das plantas. Os estudos genéticos e moleculares de bactérias ruminais têm sido direcionados para vários objetivos. Entre eles, a aquisição de conhecimentos sobre a aplicação da engenharia genética para modificar bactérias que manipulem as funções ruminais, e prospectos de uso de genes microbianos em outros campos de aplicação (THEATHER et al., 1997).

A necessidade de estabelecer relações entre a filogenia e ecologia microbiana baseada na seqüência de genes tem revelado um nível mais alto de diversidade entre a população microbiana do que estava previamente visível (THEATHER et al., 1997). Diante da necessidade de estudos sobre a microbiota ruminal e sua interação interespécies, este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade bacteriana ruminal sob o efeito da adição do farelo de algaroba em substituição ao fubá de milho no concentrado, aplicando o método de DGGE, bem como padronizar uma metodologia para extração de DNA microbiano total de fluido ruminal de cabras lactantes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Rúmen

O animal ruminante caracteriza-se basicamente pela presença intensa de microrganismos no rúmen e intestino, responsáveis, em grande parte, pela digestão de nutrientes, graças à endosimbiose, o que lhe permite viver de uma dieta cuja principal fonte de carboidratos é a celulose (TEIXEIRA, 2001; LONDOÑO et al., 1997; YOKOYAMA e JOHNSON, 1988). Aproximadamente 70 a 85% da matéria seca digestível da ração são digeridas pelos microrganismos do rúmen (COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979).

O rúmen é um ecossistema altamente complexo, que pode ser benéfico ao animal, se sua habilidade de fermentar alimentos e transformar os produtos finais dessa fermentação em nutrientes de alto valor nutritivo e absorvíveis no intestino for maximizada. O rúmen alberga uma mistura de partículas alimentares e de microrganismos anaeróbios, incluindo protozoários, bactérias, micoplasmas e bacteriófagos, os quais estabelecem entre si diversas interações (FONSECA e DIAS-DA-SILVA, 2001; TAJIMA et al., 1999). As bactérias e protozoários ciliados representam, na maior parte das condições, os componentes mais importantes da população microbiana (FONSECA e DIAS-DA-SILVA, 2001). Deve-se levar em consideração as interações entre os microrganismos ruminais para qualquer manipulação da dieta, sendo necessária à elaboração de métodos visando estimar a biomassa de bactérias e protozoários (LONDOÑO et al., 1997).

O rúmen apresenta características peculiares que o torna um ecossistema anaeróbio propício para o desenvolvimento microbiano. As principais características são sistema essencialmente isotérmico (38° a 42°C) que é regulado pelo metabolismo homeotérmico do animal hospedeiro; o pH (6,0 a 7,0) permanece relativamente constante, devido à remoção contínua dos ácidos produzidos pela fermentação microbiana que são absorvidos através da parede do rúmen e neutralizados pelas substâncias tamponantes presentes na saliva; a pressão osmótica não varia muito, pois a concentração de íons é regulada pela absorção, diluição e passagem para os outros compartimentos; os produtos resultantes da fermentação são continuamente removidos, não havendo acúmulo; a baixa concentração de oxigênio no rúmen favorece o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios obrigatórios, tendo também um pequeno desenvolvimento de bactérias anaeróbias facultativas. Apesar de serem predominantemente anaeróbios, podem suportar algum oxigênio que chega ao rúmen por meio do alimento, água e difusão através da parede ruminal. Este oxigênio é rapidamente

metabolizado e serve como doador de elétrons na fermentação (TEIXEIRA, 2001; YOKOYAMA e JOHNSON, 1988).

2.2. Diversidade Microbiana Ruminal

A microbiota do rúmen é extremamente diversificada, devido ao grande número de organismos presentes (TEIXEIRA, 2001). Estes microrganismos, predominantemente bactérias, protozoários e fungos, dependem do ruminante para disponibilizar as condições fisiológicas necessárias para sua existência. Por sua vez, os mesmos são essenciais para digestão e fermentação de grandes quantidades de alimentos fibrosos que são consumidos pelos ruminantes que, de outro modo, não poderiam utilizar uma forma mais eficaz (KRAUSE et al., 1999). A hidrólise microbiana da fibra dietética dentro da câmara ruminal leva à fermentação de carboidratos solúveis a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mais notadamente acetato, propionato e butirato (DALY et al., 2001), que são utilizados pelo ruminante para cobrir suas próprias necessidades energéticas, ao proporcionar um *habitat* favorável a estes microrganismos (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988).

Os principais microrganismos encontrados no rúmen, e que são responsáveis em grande parte pela fermentação, são as bactérias. O número de bactérias que se encontram no rúmen oscila entre 10^{10} e 10^{11} células/ grama de conteúdo ruminal (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988). A classificação adotada pela maioria dos pesquisadores é baseada no tipo de substrato em que ela atua e nos diferentes produtos finais da fermentação (TEIXEIRA, 2001; YOKOYAMA e JOHNSON, 1988). A Tabela 1 demonstra resumidamente esta classificação.

Tabela 1 – Principais espécies bacterianas do rúmen, segundo o tipo de substrato fermentado (Adaptado de YOKOYAMA e JOHNSON, 1988; KAMRA, 2005).

Substrato	Espécies
Celulolíticas	Fibrobacter succinogenes Ruminococcus flavefaciens Ruminococcus albus Butyrivibrio fibrisolvens
Hemicelulolíticas	Prevotella ruminicola Butyrivibrio fibrisolvens Ruminococcus flavefaciens Ruminococcus albus Fibrobacter succinogenes

Tabela 1 (cont.) – Principais espécies bacterianas do rúmen, segundo o tipo de substrato fermentado (Fonte: Adaptado de YOKOYAMA e JOHNSON, 1988; KAMRA, 2005).

Substrato	Espécies	
	Butyrivibrio fibrisolvens	
	Prevotella ruminicola	
	Lachnospira multiparus	
Pectinolíticas	Succinivibrio dextrinosolvens	
Pecunonucas	Treponema bryantii	
	Streptococcus bovis	
	Ruminococcus flavefaciens	
	Ruminococcus albus	
	Ruminobacter amylophilus	
	Butyrivibrio fibrisolvens	
	Prevotella ruminicola	
Amilolíticas	Streptococcus bovis	
	Succinimonas amylolytica	
	Selenomonas ruminantium (algumas cepas)	
	Lactobacilli	
	Succinivibrio dextrinosolvens	
** ***	Selenomonas sp.	
Ureolíticas	Prevotella ruminicola	
	Butyrivibrio sp.	
	Treponema sp.	
	Treponema bryantii	
Utilizam Açúcar	Lactobacillus vitulinus	
	Lactobacillus ruminus	
Utilizam Ácidos	Megasphaera elsdenii	
	Selenomonas ruminantium	
	Butyrivibrio fibrisolvens	
Proteolíticas	Prevotella ruminicola	
	Streptococcus bovis	
	Ruminobacter amylophilus	
	Prevotella ruminicola	
Produtoras de Amoníaco	Megasphaera elsdenii	
	Selenomonas ruminantium	
	Anaerovibrio lipolytica	
	Butyrivibrio fibrisolvens	
Utilizam Lipídeos	Treponema bryantii	
1	Eubacterium sp.	
	Fusocillus sp.	
	Micrococcus sp.	
Degradam Taninos	Streptococcus caprinus	
-	Eubacterium oxidoreducens	
Degradam Mimosina	Synergistes jonesii	
D. 14.	Methanobrevibacter ruminantium	
Produtoras de Metano	Methanobacterium formicicum	
	Methanomicrobium móbile	

As bactérias ruminais variam grandemente em sua especificidade no substrato. A maioria utiliza monômeros ou oligômeros que são liberados do material vegetal por hidrólise de polímeros, incluindo amido, pectina, celulose, hemicelulose, lipídeos e proteínas. A hidrólise de polímeros por bactérias fermentadoras de carboidratos ou outros compostos, inclui bactérias "especialistas" como *Ruminobacter amylophilus*, que utiliza somente amido ou seus produtos de degradação para seu crescimento, e *Fibrobacter succinogenes*, que utiliza principalmente a celulose ou seus produtos finais. Em contraste, as cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* são "generalistas", que podem hidrolisar substratos variados, como amido, celulose, xilana e pectina, e utilizar os produtos desta hidrólise para seu crescimento. Outra bactéria, *Selenomonas ruminantium*, mostra pouca habilidade em hidrolisar muitos desses polímeros, mas pode utilizar uma ampla extensão dos produtos das hidrólises geradas pelas atividades das bactérias hidrolíticas (STEWART et al., 1997).

2.3. Interações Microbianas

Existem inúmeras interrelações entre microrganismos resultantes do processo fermentativo (COELHO DA SILVA e LEÃO, 1979; COTTA, 1992; FONDEVILA e DEHORITY, 1996), que podem ser separados em dois grandes grupos, em termos de interdependência. O primeiro grupo seria composto por aqueles microrganismos que fermentam os nutrientes presentes no alimento (Figura 1) e o segundo grupo por aqueles que utilizam os produtos finais da fermentação do primeiro grupo (Figura 2). Esta interrelação é importante para que aconteça a fermentação dos nutrientes e, sobretudo, para remoção e reciclagem dos produtos finais, como succinato, lactato, formato e hidrogênio, que são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGVs), além de serem necessários como fatores de crescimento para os microrganismos do segundo grupo (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988; TEIXEIRA, 2001). As interações microbianas dentro do ambiente ruminal têm efeitos positivos e negativos para a fermentação.

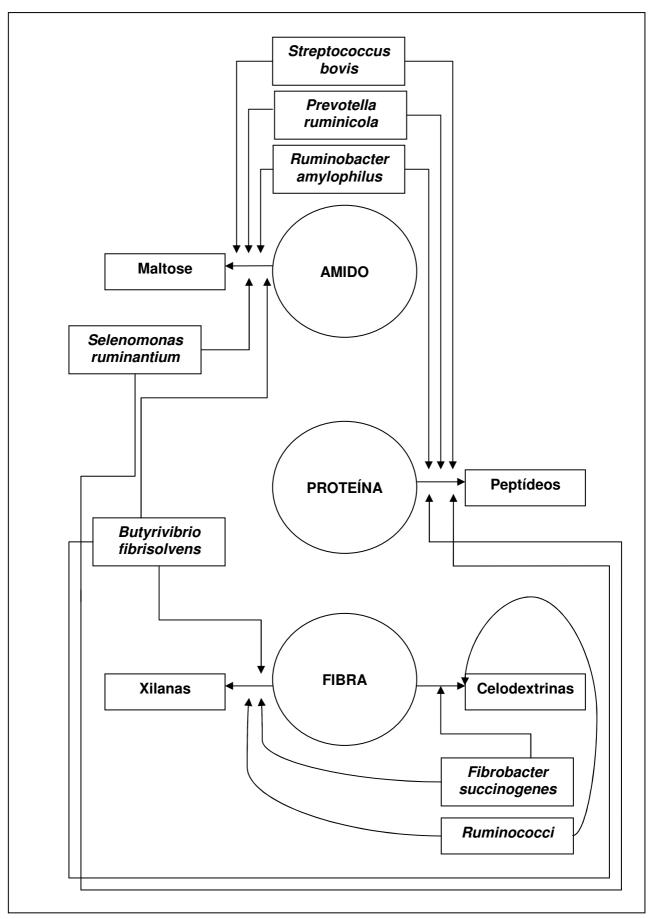


Figura 1 – Diagrama esquemático mostrando as vias de fermentação do amido, proteína e fibra pelas respectivas bactérias, e os produtos desta fermentação. (Adaptado de RUSSELL, 1997).

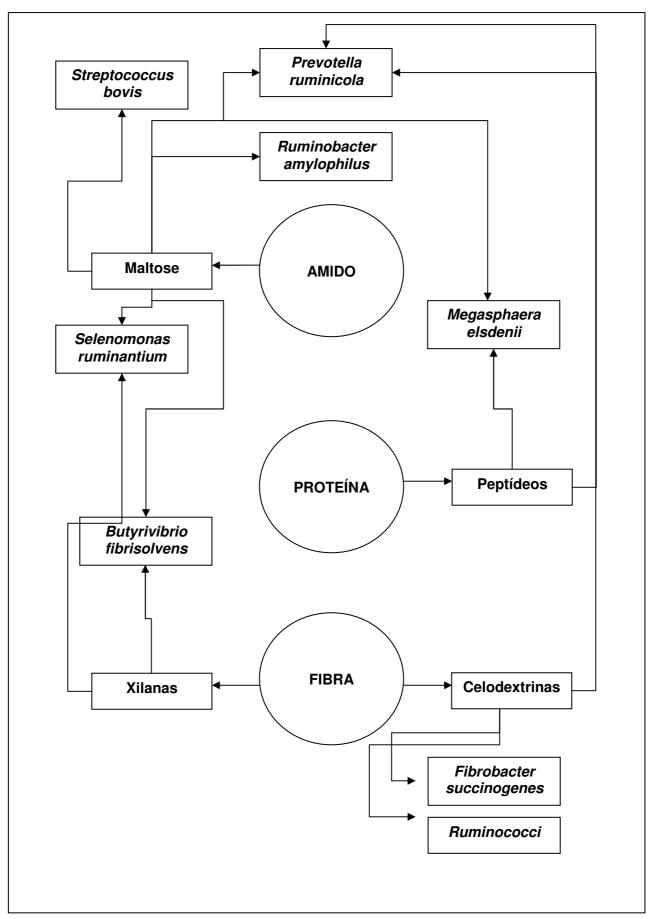


Figura 2 – Diagrama esquemático mostrando as vias de utilização dos produtos de degradação pelas respectivas bactérias. (Adaptado de RUSSELL, 1997).

Relativamente pouco se conhece sobre o papel ecológico e as propriedades fisiológicas destas bactérias. Odenyo et al. (1994) relatou que o crescimento de *R flavefaciens* FD-1 sobre a celulose foi inibida pela co-cultura com *R. albus* 8. Este fato foi atribuído a produção de uma substância semelhante a uma bacteriocina pela *R. albus* 8 (ODENYO et al., 1994). Relatando outro impacto negativo de *R. albus e R. flavefaciens* refere-se aos seus efeitos inibitórios sobre a atividade celulolítica de fungos ruminais, esta atividade parece ser inibida pelo fato da existência de uma proteína extracelular presente nessas bactérias (BERNALIER et al., 1993; CHENSSON E FORSBERG, 1997), entretanto, nenhum efeito negativo sobre a população fúngica foi observado para *F. succinogens* (FONDEVILA e DEHORITY, 1996)

Fibrobacter succinogenes normalmente apresenta baixa capacidade em utilizar pentoses, mas quando estão em cultivo juntamente com *Butyrivibrio fibrisolvens*, as duas espécies alcançam um nível ótimo de utilização de pentoses, bem como, eleva a digestão de hexoses da parede celular vegetal (MIRON e BEN-GHEDALIA, 1993; CHENSSON E FORSBERG, 1997). Cultura de *F. succinogenes* com treponema não celulolítico também aumenta a degradação de celulose por parte da *F. succinogenes* (CHENG et al., 1991; CHENSSON E FORSBERG, 1997).

Outro exemplo de interação é entre *F. succinogenes* e *Selenomonas ruminantium*. A fermentação pelo organismo celulolítico produz succinato, acetato e formato. Quando as duas espécies crescem concomitantes, entretanto, os produtos finais incluem propionato e CO₂, o succinato é utilizado como um intermediário na formação do propionato (VAN SOEST, 1994).

Quando as bactérias celulolíticas, *Streptococcus bovis e B. fibrisolvens*, são cultivadas em meio contendo amido, foi observado um acúmulo de malto-oligossacarídeo. Um sistema de co-cultura foi montado, posteriormente, contendo uma bactéria celulolítica e *S. ruminantium* HD-4, espécie não celulolítica. A adaptabilidade desta cepa demonstrou um rápido crescimento sobre o malto-oligossacarídeo que foi acompanhado até o desaparecimento do oligossacarídeo, através da polimerização (COTTA, 1992). Foi observado também pelo mesmo autor, que quando *Prevotella ruminicola*, espécie amilolítica, é cultivada com outra *P. ruminicola* ou *B. fibrisolvens* e *S. ruminantium* todas foram capazes de utilizar os oligossacarídeos, produtos da hidrólise de amido, e seus crescimentos foram elevados. A cultura de *P. ruminicola* em associação com a *F. succinogenes*, bactéria celulolítica, não aumentou a extensão da digestão de celulose (FONDEVILA e DEHORITY, 1996). Entretanto, a *S. ruminantium* em co-cultura contendo *S. bovis*, seu crescimento foi baixo e houve um acúmulo de oligossacarídeos que diferiu um pouco daquelas culturas puras de *S. bovis*. Concluíram, então, que a capacidade da *S. ruminantium* em competir pela disponibilidade de malto-oligossacarídeo com *P. ruminicola* ou *B. fibrisolvens* e *S. bovis* foi diferente.

Em outro estudo realizado, Cotta (1993) relatou que a *S. ruminantium* tem grande habilidade em utilizar os produtos hidrolíticos e metabólicos de outros microrganismos, e

determinou um efeito positivo que o co-cultivo da *S. ruminantium* com uma bactéria xilanolítica (*P. ruminicola*) tem sobre a degradação e utilização de xilana.

As células bacterianas também se associam com a superfície externa de protozoários, sendo conhecidas como ectobiontes e quando ocorrem dentro do citoplasma de protozoários, endobiontes (PAUL et al., 1990; JONES, 1994 – citado por WILLIAMS e COLEMAN, 1997). A relação entre o protozoário hospedeiro e os citobiontes não é conhecida, no entanto, as interações metabólicas interespécies têm sido propostas. As bactérias intracelulares são capazes de metabolizar compostos solúveis ingeridos ou liberados pelo protozoário e secretar enzimas polissacarolíticas que digerem os polímeros da parede celular de plantas (JONES, 1994 – citado por WILLIAMS e COLEMAN, 1997).

As concentrações bacterianas ruminais têm sido encontradas em níveis muito elevados em animais defaunados que nos faunados, e percebido um decréscimo marcante após a faunação (EADI e HOBSON, 1962 – citados por DEHORITY e ORPIN, 1997). Então parece que, se os protozoários estão ausentes, a fermentação dos alimentos eleva por um aumento na população bacteriana. Foi observado que houve um aumento de 327% no fluido ruminal de concentração bacteriana após defaunação, que por uma questão de mudanças de volume representou um aumento de 480% no número total de bactérias (DEHORITY e ORPIN, 1997).

Em cada ambiente uma variedade de interações pode ocorrer, e estudos de co-cultivo *in vitro* de fungos e bactérias têm revelado que a bactéria pode estimular ou inibir a atividade fúngica ou ainda não ter qualquer efeito (ORPIN e JOBLIN, 1997). Richardson e Stewart (1990), citados por Orpin e Joblin (1997), mostraram que a produção de lactato pelo *Neocallimastix frontalis* foi significativamente mais baixo em culturas contendo uma bactéria não utilizadora de lactato, *S. ruminantium*, indicando a ocorrência de transferência de hidrogênio interespécies. Em outro estudo, foi relatado que a taxa de degradação de xilana pelo *P. communis* aumentou quando estes fungos cresceram juntamente com *P. ruminicola ou Succinivibrio dextrinosolvens* (WILLIAMS et al., 1994).

2.4. Fatores que Afetam a População Bacteriana

A quantidade e a composição das dietas são variáveis que afetam a taxa de digestão, a taxa de passagem e, conseqüentemente, o conteúdo microbiano ruminal. A composição da dieta geralmente determina a distribuição das populações que digerem os nutrientes do alimento no rúmen (VAN SOEST, 1994).

Um grande número de estudos pode ser encontrado na literatura que comparam a concentração total viável de bactérias utilizando diferentes alimentos em dietas com altos níveis de forragem ou altos níveis de concentrado. As diferenças entre cada fator como a porcentagem de concentrado na dieta, a freqüência de alimentação, a qualidade do alimento, o pH ruminal, a variação individual do animal, tudo parece influenciar as concentrações bacterianas, tornando difíceis as comparações (VAN SOEST, 1994; DEHORITY e ORPIN, 1997; RUSSELL e RYCHIIK, 2001).

A alimentação dos rebanhos à base, principalmente, de subprodutos agro-industriais, contém altas concentrações de fatores anti-nutricionais que podem agir inibindo alguns dos microrganismos do rúmen. Os compostos anti-nutricionais como taninos, lignina, saponinas, mimosina, alcalóides, são sintetizados pelas plantas para protegê-las contra microrganismos invasores (KAMRA, 2005), por isso estes compostos têm atividade antimicrobiana, podendo limitar o crescimento de diferentes tipos de microrganismos do rúmen de animais que consomem alimentos ricos nestes compostos.

Os taninos são efetivos contra bactérias fibrolíticas. McSweeney et al. (1999) observaram que os animais alimentados com *Calliandra calothyrsus*, rica em tanino, a população de *Ruminococcus* spp. e *Fibrobacter* spp. foi reduzida consideravelmente, mas os fungos, protozoários e bactérias proteolíticas foram menos afetados por esta dieta. Sotohy et al. (1997) relataram que o número total de bactérias no rúmen de caprinos decresceu significativamente quando estes animais foram alimentados com *Acacia nilotica* e o decréscimo no número populacional foi diretamente proporcional ao nível deste alimento na dieta.

Alguns microrganismos ruminais são capazes de degradar mimosina e seus derivados (2,3- e 3,4-dihidroxipiridina-DHP), que são excretados na urina. Em um estudo realizado com caprinos alimentados com *Leucaena* foi descoberto que no conteúdo de sua microflora existem microrganismos capazes em degradar 3,4-DHP. Destes caprinos resistentes foi coletado o líquido ruminal que foi inoculado em ruminantes australianos sensíveis a toxicidade da mimosina, o que resultou na transferência da capacidade de degradar completa e eficientemente DHP (JONES e MEGARRITY, 1986).

Dehority e Orpin (1997) mencionaram as mudanças diurnas como um fator que altera a população bacteriana. Dados na literatura têm mostrado que ovinos alimentados uma única vez no dia, apresentaram diminuição na concentração total de bactéria no rúmen nas primeiras quatro horas após a alimentação, aumentando gradativamente até um máximo entre 12 e 20 horas, e depois decresce até a próxima refeição. Outro estudos, revelaram que a concentração máxima de bactérias no rúmen de ovinos alimentados com 60% de milho e 40 ou 100% de alfafa, foi de 9 e 12 horas após a alimentação, respectivamente. Dehority et al. (1989), no entanto, relatou que a concentração bacteriana máxima ocorreu entre 4-7 horas.

McEwan et al. (2005) relataram pela primeira vez o efeito do fotoperíodo sobre a composição da população bacteriana no ecossistema do rúmen de ovinos e mostraram também que este fator é independente da composição da dieta, e isto indica que as diferenças ocorrem mais provavelmente porque o fotoperíodo conduz as alterações na ingestão do alimento.

Um outro fator que tem sido relatado é a idade (STEWART et al., 1997; MUELLER et al., 2006). Algumas espécies são encontradas em grande número em ruminantes jovens como: *Bifidobacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Propionibacterium acnes*, muitos clostrídios e *Bacteroides*. Tem sido relatada a ocorrência de uma bactéria estritamente aeróbia, *Alysiella filiforms*, no epitélio ruminal de cordeiros, a qual é comumente encontrada na cavidade oral, mas acidentalmente se estabelece no epitélio do rúmen como um colonizador passageiro. Coliformes também são encontrados em ampla concentração na microflora ruminal de cordeiros recém-nascidos e novilhos, no entanto, esses números diminuem quando o animal alcança maturidade (STEWART et al., 1997).

2.5. Métodos de Cultivo e Isolamento

O desenvolvimento e variedade de meios anaeróbios e as técnicas de cultivo para microrganismos ruminais têm sido estudado desde 1960. A maior parte dos meios de cultivo é preparada para fornecer aos microrganismos um ambiente semelhante ao do rúmen, um meio anaeróbio, no qual é diluído uma série de compostos entre eles, CO₂, HCL, também podem conter concentrações de minerais como suplemento para o crescimento dos microrganismos. Freqüentemente o líquido ruminal é utilizado como um componente de crescimento no meio de cultura, após o seu resfriamento e autoclavação. O pH deve ser ajustado em torno de 6,5 para garantir o ambiente favorável (STEWART et al., 1997).

A maioria dos meios de cultura utilizados para enumerar, isolar e manter as bactérias do rúmen necessitam ser seletivos, pois, muitos grupos ou espécies são específicos para um determinado substrato (STEWART et al., 1997). Os meios usados para enumerar e isolar bactérias ruminais, têm sido definidos quimicamente para que permita o crescimento de diversas espécies de bactérias. Nestes meios, os requerimentos que são comumente encontrados pela presença do fluido ruminal devem ser suplementados nos meios para cultivo, como os requerimentos de *Succinivibrio dextrinosolvens* por 1,4-naftoquinona e de *Ruminococcus albus* pelo ácido fenilpropanóico (GOMEZ-ALARCON et al., 1982 e HUNGATE et al., 1982 – citados por STEWART et al., 1997).

No entanto, é relativamente fácil obter uma contagem viável total, enumerando espécies bacterianas individuais, apesar dos métodos de cultivo serem laboriosos e consumirem tempo. O estudo da ecologia ruminal tem sido confusa, porque os meios seletivos não são eficazes para a maioria dos microrganismos anaeróbios (VAUGHAN et al., 2000; KAMRA, 2005) ou requerem isolamento individual, análises dos produtos finais de fermentação em culturas puras, e também pelo lento crescimento, a identificação de um simples microrganismo pode levar duas semanas (VAUGHAN et al., 2000; RUSSELL e RYCHIIK, 2001). Também pelo fato da maioria das bactérias serem Gram-variáveis e apresentarem morfologias semelhantes, o que torna difícil uma rápida identificação (RUSSELL e RYCHIIK, 2001). Como conseqüência, os estudos de dinâmica da microflora são limitados. O sucesso do cultivo em laboratório se deve, particularmente, por aqueles microrganismos dominantes ou especializados. Está claro que somente uma pequena fração (freqüentemente menos que 1%) da diversidade microbiana total tem sido descoberta pelos métodos de cultivo (AMANN et al., 1995) e que a maior proporção dos microrganismos ruminais, como em todo ecossistema, é não-cultivável, mas é ativo no processo fermentativo no rúmen (KAMRA, 2005).

2.6. Métodos Moleculares

Os métodos tradicionais de classificação microbiana, baseados na morfologia e fisiologia, podem não refletir o comportamento microbiano que ocorre no meio ambiente, porque os microrganismos são tão adaptados ao seu *habitat* natural que não se consegue cultiválos em condições de laboratório. Portanto, as técnicas tradicionais de cultivo, além de subestimarem a grande diversidade microbiana presente em amostras ambientais ou ruminais, não traduzem o real comportamento microbiano (ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Dessa forma, existe necessidade crescente de métodos mais rápidos e eficientes para o estudo da diversidade microbiana (COUTINHO et al., 1999).

Os métodos moleculares apresentam vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultivo, pois são altamente específicos para detectar um gene ou seqüências de ácidos nucléicos de um organismo particular, ou de um grupo de organismos; são usados para detectar e identificar organismos sem a necessidade de cultivo e isolamento em cultura pura, descartando a subjetividade dos testes microbiológicos; são muito sensíveis, permitindo a identificação de um maior número de microrganismos; serem designadas e usadas para detectar organismos específicos ou grupos taxonômicos amplificados como é o caso de provas de regiões alvo da molécula de RNA ribossômico (rRNA) com diferentes níveis de variabilidade; e em geral, o

genoma bacteriano é altamente estável e não é afetado pelas condições de crescimento (COUTINHO et al., 1999).

Com o desenvolvimento de técnicas para a análise dos ácidos nucléicos, DNA e RNA, o estudo da diversidade microbiana pôde ser explorado geneticamente, permitindo a identificação de praticamente todos os membros da comunidade microbiana. A análise do DNA fornece informação sobre a estrutura da comunidade, enquanto a análise do RNA pode elucidar a atividade metabólica (função) das populações microbianas particulares (TREVORS e VAN ELSAS, 1989).

Para o estudo da diversidade microbiana por meio de técnicas moleculares, os ácidos nucléicos, DNA ou RNA, devem ser inicialmente extraídos das populações microbianas mistas e utilizados nas diferentes estratégias moleculares, a fim de identificar os membros da população e determinar a complexidade da comunidade, esclarecendo as relações filogenéticas entre as espécies microbianas (ROOSE-AMSALEG et al., 2001; LUZ, 2000; COUTINHO et al., 1999).

Existem diversas técnicas que visam extrair o DNA total de amostras. Porém, nenhum método é universalmente aplicável para o estudo de bactérias autóctones, pois cada tipo de amostra, devido à sua própria natureza, requer a otimização de um método de extração próprio (ZHOU et al., 1996). Naturalmente, microrganismos isolados são mais facilmente lisados que microrganismos autóctones não cultiváveis (JACOBSEN, 1995; TSAI e OLSON, 1991).

2.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica analítica extremamente sensível com aplicação em diversas áreas, incluindo a biologia molecular (MAED et al., 1991; TSAI e OLSON, 1992) e genética de populações (ARNHEIM et al., 1990) e uma poderosa ferramenta para a epidemiologia e medicina (AABO et al., 1993).

A PCR tem uma enorme capacidade de replicar exponencialmente uma determinada seqüência de DNA. Está baseada na aptidão que os iniciadores específicos têm em anelar somente com a seqüência desejada através da complementariedade de bases para determinada região do DNA de um organismo. A *Taq* DNA polimerase (enzima responsável pela extensão do DNA alvo) distingue o complexo formado pelo iniciador e a fita do DNA molde, que resulta na cópia simultânea de ambos os sentidos do segmento do DNA entre os dois iniciadores anelados. Os passos de desnaturação, anelamento e extensão acontecem de forma cíclica, graças à termoestabilidade da *Taq* DNA polimerase, até que a seqüência alvo se encontre em

quantidades detectáveis (OSTE, 1988; AABO et al., 1993; VAN DER ZEE e HUIS, 1997). O princípio da PCR está explicado na Figura 3.

Anteriormente ao início do primeiro ciclo no termociclador, o DNA, os iniciadores, a polimerase, os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), cloreto de magnésio (MgCl₂) e um tampão são misturados em um tubo. Então a sequência alvo do genoma bacteriano é amplificada pela repetição de três passos (KREUZER e MASSEY, 2002): (1) desnaturação do DNA fita-dupla em fita-simples por aquecimento; (2) anelamento específico por complementariedade dos iniciadores ao DNA fita-simples pelo resfriamento; e, (3) extensão enzimática dos iniciadores para produzir uma cópia exata da sequência alvo fita-dupla. Estes passos são usualmente repetidos em 30 a 40 ciclos. Depois a amplificação é confirmada realizando uma eletroforese em gel de agarose.

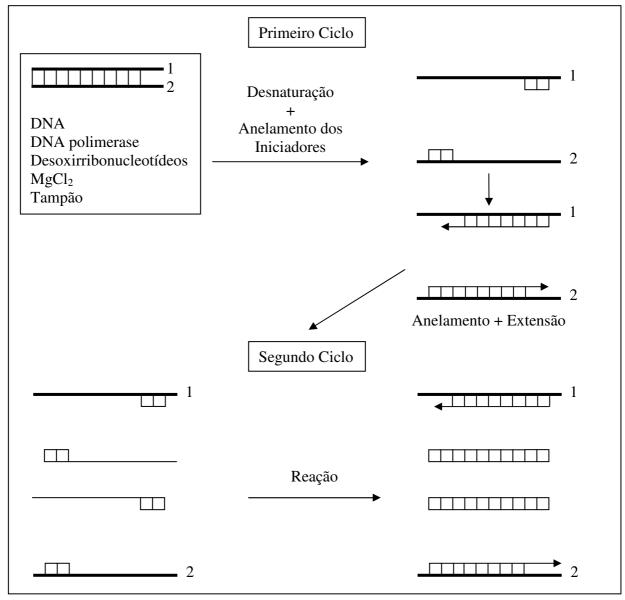


Figura 3 – Princípio da Reação da Polimerase em Cadeia. Pequenas sequências específicas de DNA (iniciadores) são utilizados para se ligarem às fitas de DNA desnaturado pelo aquecimento. Uma enzima termoestável (DNA polimerase) estende os iniciadores para formar a nova fita complementar. (Adaptado de KREUZER e MASSEY, 2002).

Entretanto, os ácidos nucléicos constituem o material do qual serão realizadas análises filogenéticas (taxonômicas), tipagens de espécies ou linhagens e análise da diversidade microbiana dos organismos de uma amostra. Contudo, para que estas análises sejam efetuadas, o DNA necessita ser isolado, antes de realizar a PCR (COUTINHO et al., 1999; ROOSE-AMSALEG et al., 2001). Todos os métodos propostos para extração de DNA total de uma amostra são baseados na extração do DNA celular ou após o isolamento das células microbianas ou através da lise direta de todo o material microbiano. O segundo método é o mais empregado por ser mais representativo sobre a comunidade microbiana total (VAUGHAN et al., 2000; ROOSE-AMSALEG et al., 2001). O processo de extração de DNA através de lise direta requer alguns procedimentos básicos que estão descritos na Tabela 5. Habitualmente, a lise celular é uma etapa crítica no processo de extração, sendo sua finalidade o rompimento de um maior número de células, para que os ácidos nucléicos sejam liberados na solução (Tabela 5). Este procedimento pode ser realizado combinando métodos físicos, químicos e enzimáticos (ROOSE- AMSALEG et al., 2001), porém pode-se obter um DNA em grande parte degradado. Diante disso, a metodologia deve ser criteriosamente ajustada de acordo com cada amostra a ser estudada (COUTINHO et al., 1999), com o objetivo de alcançar um DNA de alta qualidade (VAUGHAN et al., 2000).

Além disso, é necessário extrair e purificar o DNA do material analisado (Tabela 5), pois a amplificação é inibida por um extenso número de substâncias químicas como componentes alimentares e ambientais, ácido húmico, urina, sais biliares, meios seletivos usados no isolamento dos microrganismos. A remoção de substâncias inibitórias é um passo importante na preparação das amostras para a PCR (TSAI e OLSON, 1992; AABO et al., 1993).

Tabela 2 – Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total para o estudo da diversidade microbiana. (Adaptado de MACIEL, 2004).

Tratamento	Reagente / Processo	Função
1. Lise Objetivo: Romper a parede e membranas celulares, liberando o DNA no meio. Pode ser:		
- Física	- Choque térmico; sonicação; fervura; $bead$ -beating; maceração com N_2 etc.	Promover o rompimento da parede e membrana celular através de forças mecânicas.
- Química	- Detergentes: dodecil sulfato de sódio (SDS); triton 114; sarcosil; brometo de N-cetil-N,N,N- trimetilamônio (CTAB)	Dissolver lipídeos de membrana, solubilizar, dissociar e desnaturar proteínas, inibir a ação de nucleases.

Tabela 2 (cont.) – Principais tratamentos e suas funções na extração do DNA microbiano total para o estudo da diversidade microbiana. (Adaptado de MACIEL, 2004).

Tratamento	Reagente / Processo	Função
- Enzimática	- Proteases (proteinase K) e Lisozimas	Desnaturar proteínas de parede e membrana celular e hidrólise do muropeptídeo.
2. Separação do DNA Objetivo: Separação do DNA dos demais componentes celulares.	- Solventes orgânicos: fenol- clorofórmio; clorofórmio-álcool isoamílico.	Desnaturar proteínas e separar o DNA devido à formação de três fases: orgânica, intermediária (contendo as proteínas desnaturadas) e aquosa superficial (contendo o DNA).
	Tiocianato de guanidina.	Agente caotrópico que realiza pontes de H com as moléculas de água, causando desestabilização das ligações entre as proteínas solúveis no meio e a água.
3. Precipitação do DNA Objetivo: Precipitação do DNA para ser ressuspenso em menor volume de água ou tampão, concentrando a amostra.	- Precipitação alcoólica: isopropanol; etanol.	Retirar as moléculas e água das hélices do DNA, provocando sua precipitação.
	- Precipitação com sal: acetato de sódio; acetato de amônio	Neutralizar as cargas negativas (fosfato) do DNA, promovendo sua agregação.
	- Polietilenoglicol (PEG)	Reduzir o poder de solubilização da água.
4. Purificação Objetivo: Remoção de ácido húmico e fúlvico, matéria orgânica, endonucleases e demais inibidores.	- Polivinilpirrolidona (PVP); Polivinilpolipirrolidona (PVPP).	Adsorver compostos fenólicos e húmicos através da formação de pontes de H entre os compostos.
dentals infordores.	- Cromatografia de filtração em gel.	Através da utilização de colunas contendo resinas, permite a purificação do DNA devido a passagem das moléculas menores através dos poros da coluna.
	- Cromatografia de adsorção.	Através da utilização de colunas aniônicas, permite a purificação do ácido nucléico após a adsorção do DNA por uma matriz de carga positiva.
	- Colunas de filtração em gel: Sephadex	Purificação relativamente rápida. Auxilia na adsorção de substâncias como o ácido húmico e matéria orgânica do extrato de DNA total.

2.6.2. Estudo da Diversidade Microbiana por meio da Técnica de DGGE

A classificação de bactérias ruminais baseadas nas características fenotípicas e em testes bioquímicos não é suficiente para estudar a diversidade desse ambiente. Os estudos sobre biologia molecular de bactérias ruminais mostraram que as bactérias *P. ruminicola, B. fibrisolvens e Ruminococcus* representam, filogeneticamente, diversos grupos de bactérias, além do fato de que estas espécies parecem ser fenotípica e bioquimicamente similares (HUDMAN e GREGG, 1989; FOSTER et al., 1996; AVGUSTIN et al., 1997; STEWART et al., 1997; KAMRA, 2005). A variação em diferentes grupos de microrganismos ocorre devido às mudanças na dieta e isso dificulta o estudo pelos métodos convencionais de isolamento e caracterização através das culturas (KAMRA, 2005). Entretanto, a maioria dos estudos realizados utilizando os diversos métodos moleculares tem sido com bactérias ruminais cultivadas.

As técnicas de biologia molecular oferecem oportunidades para analisar a estrutura e a composição das espécies de comunidades microbianas. Em particular, a variação das seqüências de rRNA são exploradas para inferir as relações filogenéticas entre os microrganismos e para designar provas específicas para detecção individual de microrganismos em uma dada comunidade. Estas técnicas também determinam a diversidade genética de comunidades microbianas e a identificação de diversos microrganismos não cultiváveis (GIOVANNONI et al., 1990; WARD et al., 1990; MUYZER et al., 1993).

Os rRNAs são moléculas "anciãs", bastante conservadas tanto funcionalmente quanto em sua seqüência, está associada com regiões de moderada variação (WOESE, 1987; LUZ, 2000) e é encontrada em todos os microrganismos vivos. Deste modo, têm sido utilizados para distinguir inter-relações evolutivas, servindo como "cronômetros evolucionários" consideravelmente importantes. À medida que o tempo vai passando, as espécies evoluem, e a seqüência de rRNA reflete as diferenças entre elas. As análises comparativas destas seqüências podem gerar as árvores filogenéticas, pela genealogia molecular fornecida, mostrando a posição evolutiva dos microrganismos e determinando inter-relações entre eles (LUZ, 2000).

A molécula largamente utilizada para análises filogenéticas em procariontes é a 16S, subunidade menor do rRNA. É um polirribonucleotídeo de aproximadamente 1500 nucleotídeos, codificado pelo gene *rrs* (rDNA). Como qualquer seqüência de cadeia simples, o 16S rRNA se dobra em uma estrutura secundária que intercala cadeias simples e cadeias duplas (Figura 4) (RODÍCIO e MENDOZA, 2004). Na maioria dos casos, todas as cópias do 16S rDNA de um organismo são idênticas ou quase idênticas. O 16S rDNA é a molécula de escolha, pelo seu tamanho e por ser melhor manejável experimentalmente (RODÍCIO e MENDOZA, 2004).

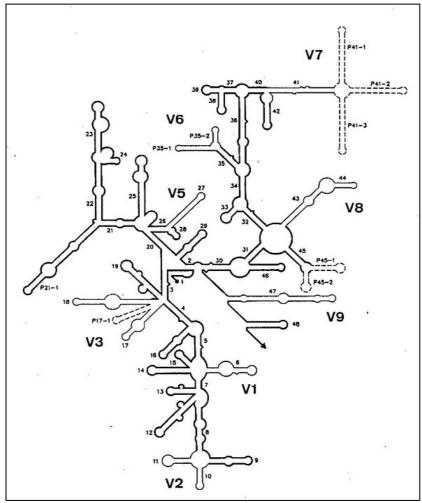


Figura 4 – Estrutura secundária do RNAr 16S. As regiões conservadas estão representadas pelas linhas em negrito e as variáveis (V1-V9) pelas linhas finas (RODÍCIO e MENDOZA, 2004).

Diversas técnicas têm sido criadas para a análise do 16S rRNA (RODÍCIO e MENDOZA, 2004), dentre elas a mais utilizada é a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Esta técnica tem sido apresentada como alternativa na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas complexas, foi introduzida recentemente no campo da ecologia microbiana molecular, aliada à extração direta de DNA da comunidade. O uso da DGGE vem sendo disseminado nos últimos anos, demonstrando seu valor não apenas na caracterização de comunidades complexas, como também para inferir afiliação filogenética dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, ou estudar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (MUYZER et al., 1993; TESKE et al., 1996; MUYZER, 1999).

A DGGE está baseada na mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA, previamente amplificados pela PCR, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uréia e formamida) de DNA (MUYZER et al., 1993; COUTINHO et al., 1999; MUYZER, 1999). Moléculas com diferentes seqüências podem ter comportamentos de desnaturação distintos e, por este motivo, as posições durante a migração no gel são diversas (MUYZER, 1999).

Esta técnica é vantajosa pelo fato de haver a possibilidade de seqüenciamento de cada banda e poder revelar a informação filogenética sem a necessidade de clonagem e seleção prévia; detectar variações na seqüência de DNA de apenas uma base; reduzir o complexo bandeamento com utilização de *primers* específicos para o grupo de organismos que se deseja estudar e realizar análise simultânea de grandes quantidades de amostras em um curto espaço de tempo. Um dos problemas desta técnica é que o número das bandas visualizadas no gel é, na maioria das vezes, proporcional ao número de indivíduos diferentes que constituem as populações. No entanto, nem sempre o número de bandas em um gel corresponderá, necessariamente, ao número de indivíduos presentes na população em estudo. Além disso, as informações das seqüências genéticas geradas a partir da DGGE são limitadas, uma vez que a separação dos produtos de PCR maiores que 500 pares de bases é reduzida, diminuindo a sensibilidade da técnica (MUYZER e SMALLA, 1998; FUJIMOTO et al., 2003). Outro problema é que somente DNA de organismos dominantes na população consegue ser visualizado, acima de 1% (MUYZER e SMALLA, 1998).

A DGGE tem sido utilizada na análise direta de DNA genômico de organismos com genomas de milhões de pares de bases, através da transferência de padrões de separação para membranas de hibridização, seguido por análise com sondas de DNA (MUYZER e SMALLA, 1998). Alternativamente, a PCR pode ser usada para amplificar seletivamente a seqüência de interesse antes de a DGGE ser empregada. Estas seqüências podem ser amplificadas a partir de um gene, ou parte deste, utilizando-se *primers* gene-específico de microrganismos de interesse.

Com base nas informações obtidas, torna-se possível avaliar a diversidade genética e as relações filogenéticas de microrganismos, em diferentes ecossistemas, sem a necessidade de cultivo (TAJIMA et al., 1999). A utilização dos métodos de extração direta e análise de seqüências de genes alvo do conteúdo ruminal podem ajudar na descrição da composição bacteriana presente. Entretanto, existe carência de informações sobre a utilização destes métodos no estudo da microbiota ruminal de caprinos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras de líquido ruminal foram coletadas ao 17º dia dos períodos experimentais, 6 h após a alimentação matinal, de oito cabras da raça Saanen, distribuídas em dois quadrados latinos balanceados 4 x 4, alimentadas com diferentes níveis de farelo da vagem de algaroba em substituição ao milho no concentrado, quais foram: 0; 33,3; 66,7 e 100% na matéria natural, respectivamente para os tratamentos T1, T2, T3 e T4. Para as coletas foi utilizada sonda esofágica adaptada a uma bomba de vácuo (Figura 5). Em seguida, o fluido ruminal foi filtrado utilizando-se quatro camadas de gaze, 10 mL do conteúdo foi centrifugado por 15 minutos a 5.000 rpm, foi obtido um *pellet* (Figura 5), o sobrenadante foi descartado. Este *pellet* foi lavado com um tampão fosfato (pH 8,0), o procedimento foi repetido 3 vezes e realizado quadruplicatas das amostras. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em *freezer* à 20°C negativos.

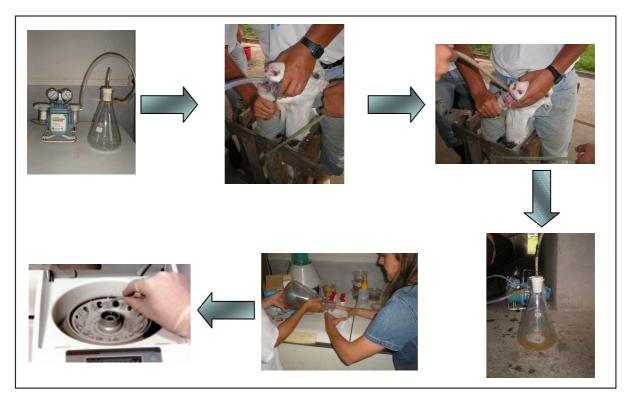


Figura 5 - Seqüência de fotos mostrando a coleta do líquido ruminal por meio de sonda esofágica acoplada a uma bomba de vácuo e o processamento inicial para extração de DNA.

3.2. Extração do DNA Total

A partir das amostras armazenadas em *freezer* a -20°C, 1,5 mL de cada amostra foram colocados em tubos tipo *eppendorf* e centrifugados por 5 minutos a 5 000 rpm. O sobrenadante foi, então, descartado e adicionado 1 mL de PBS 1x (Solução Salina Tamponada), a amostra foi homogeneizada com o auxílio de um agitador para tubos tipo Vortex e centrifugado novamente, obteve-se o *pellet* e desprezou-se o sobrenadante, este procedimento foi repetido 4 vezes. Após a última lavagem com PBS 1x, foi adicionado ao *pellet*, 600 μL de TESC (10 M Tris-base, 1 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,3) juntamente com 100 μL de Tween 80 (Merck) e homogeneizado. A amostra foi submetida ao processo de sonicação por meio de um processador ultrassônico (VCX 130; 130 W e 20 kHz) (Sonic & Materials, Inc.) por 40 segundos (GREEN et al., 2006) a uma amplitude de 20%, sem pulso, para que houvesse desfloculação das partículas bacterianas, que possivelmente poderiam está aderidas à matéria orgânica.

Após a sonicação, as amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 800 rpm e, coletou-se o sobrenadante, que por sua vez foi centrifugado a 10 000 rpm por 5 minutos. Desta vez o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em 700 μL de PBS 1x. 12 μL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) (Promega) e 12 μL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) foram adicionados às amostras e homogeneizou-se pela inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 65°C por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos.

A lise física das células bacterianas foi realizada por meio de choque térmico, em três ciclos, 20 segundos no N₂ líquido e 5 minutos em banho-maria a uma temperatura de 80°C. Um volume equivalente de fenol-clorofómio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, e a mistura foi gentilmente homogeneizada. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 5 000 rpm e a fase aquosa foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol gelado (J.T. Barker) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A solução foi misturada suavemente (5-10 vezes) e mantido a 20°C negativos por 16 h. Foi obtido o *pellet* das amostras por centrifugação durante 5 minutos a 18 400 rpm, o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspenso em 50 – 100 μL de TE clássico (10 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0).

O DNA extraído foi purificado em mini-colunas empacotadas com matriz de gel Sephadex G-200 equilibradas com TE clássico segundo (TSAI e OLSON, 1992). Um volume de 250 μL do eluente foi adicionado às colunas juntamente com o DNA de cada amostra, e posteriormente incubadas em banho-maria (50 – 60°C) por 10 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 2 minutos a 5 000 rpm.

3.3. Amplificação por PCR

A região variável V3 de 16S rDNA foi enzimaticamente amplificada em PCR com *primers* para regiões conservadas dos genes 16S rRNA, que amplificam aproximadamente 200 bp do gene bacteriano. As seqüências de nucleotídeos dos iniciadores são as seguintes: *forward primer* 357 com grampo de GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGC GGC GCG GC

Foram transferidos 2 μL de DNA total de cada amostra para tubos tipo *eppendorf* de 200 μL contendo 48 μL de uma mistura de 37 μL de Água Milli-Q autoclavada, 10 mM do Tampão da *Taq* polimerase (Fermentas), 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas), 10 pmol de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Inc.), 200 μM de cada um dos dNTP (Promega) e 2,5 U da *Taq* DNA Polimerase (Fermentas). A PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 7 minutos. O produto da reação foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System 290) após eletroforese em gel agarose a 2% (100 V por 40 minutos) (Adaptado de EDWARDS et al., 2005) pré-corado com brometo de etídio.

3.4. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A DGGE foi realizada utilizando o Sistema para Análise de Mutações CDC 20 x 20 cm (BioAgency Biotecnologia LTDA) (Figura 6). A análise por DGGE foi realizada conforme Muyzer et al. (1993) e Sigler et al. (2004). Vinte microlitros dos produtos de PCR foram colocados em um gel vertical de poliacrilamida a 6% (acrilamida-bisacrilamida 37,5: 1, Promega) com gradiente crescente e linear de desnaturante de 35% a 50%, onde a solução 100% desnaturante contém 40% (v/v) de formamida (VETEC) e 7 M de Uréia (Promega) e a solução 0% sem nenhum dos agentes desnaturantes. O gel foi submetido à eletroforese, primeiramente por 15 minutos a 60 V e em seguida por 5 horas a 200 V (SIGLER et al., 2004) em tampão TAE 1x, a uma temperatura constante de 60°C. Posteriormente, o gel foi corado durante 30 minutos

com 1x SYBR SafeTM DNA Gel Stain (Invitrogen) diluído a partir do estoque em tampão TAE. As bandas foram observadas e fotografadas em um transiluminador de luz ultravioleta (KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System 290). A Figura 7 mostra um esquema de como foi preparado o gel de DGGE para a eletroforese.

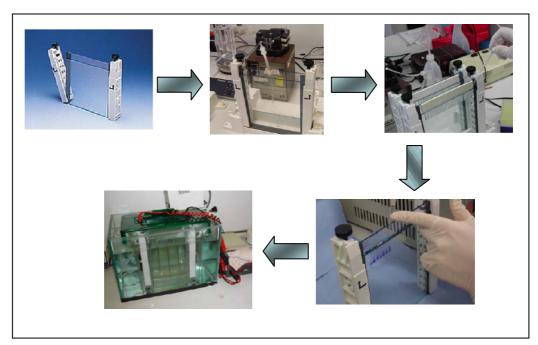


Figura 6 – Sequência de fotos que mostram a montagem e aplicação das amostras na cuba de DGGE.

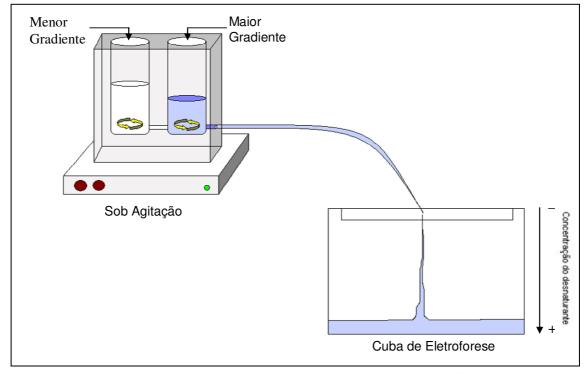


Figura 7 — Esquema de preparação do gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante utilizando um "gradient maker", sistema para produção do gradiente linear (ARGOLO FILHO, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos moleculares prévios sobre as mudanças na população ruminal tenderam sempre a focalizar nas mudanças na composição da dieta (KOCHERGINKAYA et al., 2001; TAJIMA et al., 2001; REGENSBOGENOVA et al., 2004). Muitas características morfológicas, bioquímicas e genéticas têm sido utilizadas para identificar os constituintes de uma comunidade complexa de microrganismos. A sequência de 16S rDNA que é diferente entre as diversas espécies bacterianas têm sido empregada como um indicador de diversidade.

A região variável V3 de 16S rDNA foi utilizada por ser uma região conservada de bactérias comumente encontradas no trato gastrintestinal. A região V3 do DNA total isolado do líquido ruminal de cabras leiteiras alimentadas com farelo da vagem de algaroba foi amplificada na PCR de todas as amostras analisadas, totalizando 32 amostras, como pode ser observado nas Figuras 8. A amplificação resultou em produtos de aproximadamente 200 pb.

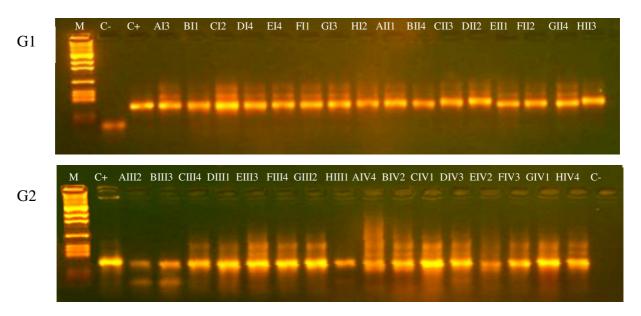


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de amostras de líquido ruminal de cabras leiteiras. (G1 e G2) utilizando os iniciadores F357GC-R518 (200 pb); M, Marcador de peso molecular pGEM® (Promega); A-D representam as cabras do quadrado latino 1; E-H representam as cabras do quadrado latino 2; I-IV, equivalem aos períodos experimentais; 1-4, os tratamentos (0, 33,3, 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba; C-, controle negativo; C+, controle positivo (*Salmonella* sp.).

O método de extração usado neste experimento foi desenvolvido com base em alguns estudos de extração de solo e lodo com modificações nos passos de lavagem e tempos de incubação, que otimizaram as extrações do DNA total para amostras de fluido ruminal. A aplicação deste protocolo de extração modificado produziu um DNA sem contaminantes, como análogos às substâncias húmicas em amostras de solo, compostos fenólicos e matéria orgânica. Sem a influência destes compostos, a extração produziu um DNA de boa qualidade, possibilitando a caracterização do ecossistema bacteriano do rúmen independente do cultivo e isolamento das bactérias deste ambiente.

Os vários passos de lavagem utilizados, além da utilização do processador ultrassônico (sonicação), foram imprescindíveis para aumentar a remoção de partículas orgânicas, particularmente àquela proveniente de material alimentar. Modificações no tempo de incubação enzimática aumentaram a eficiência da lise celular, como determinado pelo exame visual da qualidade do DNA genômico em gel de agarose.

A avaliação da composição e diversidade de populações microbianas complexas que habitam o trato gastrintestinal de ruminantes, especialmente no rúmen, tem sido dificultada pelo vasto número de espécies residentes, e ainda correlacionando as repostas do hospedeiro aos fatores externos como a dieta (McCRACKEN et al., 2001), fotoperíodo (McEWAN et al., 2005), variação de animal para animal (KOCHERGINKAYA et al., 2001) com as mudanças na população bacteriana ruminal.

A DGGE é normalmente utilizada para determinar o número ou diferenças entre gêneros ou espécies de bactérias presentes na amostra. A otimização do gradiente desnaturante para uma amostra é um passo de extrema importância. A nitidez dos padrões de bandas não é dependente somente do gradiente proposto, mas também da qualidade de preparação do gel e das condições eletroforéticas (SIMPSON et al., 1999).

É possível observar diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR para cabras lactantes que receberam dietas em que o fubá de milho foi substituído farelo da vagem de algaroba, demonstrado pelo número e intensidades diferentes de bandas que possivelmente se trata de espécies distintas, e que, provavelmente, houve influência dos níveis do farelo da vagem de algaroba na dieta sobre a diversidade da microbiota ruminal, devido às mudanças observadas na população bacteriana (Figura 9). Entretanto, não se pode afirmar, visto que o número de bandas neste DGGE pode não corresponder ao número de bactérias presentes na amostra, considerando que no DGGE a diversidade bacteriana total encontrada tenha sido, possivelmente, subestimada.

A DGGE demonstrou pouca eficiência na separação das bandas dos produtos de PCR gerados pelo par de iniciadores, possivelmente devido ao tempo de corrida da DGGE e ao gradiente desnaturante utilizado. Sigler et al. (2004) identificaram o tempo de 5h a 200V como sendo o melhor para a obtenção de uma melhor separação das bandas no gel. Estes mesmos autores perceberam que longos períodos de eletroforese acabam por instabilizar o gradiente desnaturante, causando a perda da capacidade em separar as bandas no gel de acordo com sua sequência nucleotídica, no entanto o mesmo não foi observado neste experimento.

Além disso, de acordo com Simpson et al. (1999), quando se pesquisa populações complexas de microrganismos, considera-se certa complexidade dos padrões de bandas, sendo possível que algumas destas bandas podem não representar espécies individuais, mas grupos que apresentam alto nível de similaridade do conteúdo de guanina e citosina (G + C) dentro da região V3 de 16S rDNA, mostrando mesma migração (co-migração) no gel de DGGE. Esta limitação somente poderá ser solucionada com a ecisão da banda para o seqüenciamento.

Kocherginskaya et al. (2001) estudaram a diversidade bacteriana do rúmen de oito novilhos alimentados com duas diferentes dietas, quatro animais receberam uma dieta a base de milho (52% de milho, 20% de feno, o restante refere-se a um *mix* vitamínico e derivados do milho), e aos outros quatro animais forneceram feno de leguminosa de média qualidade, à vontade. Os autores observaram que houve variação de bandas, bem como de suas intensidades. A princípio, pode-se observar neste estudo que houve uma variação de bandas entre os tratamentos, e também uma variação de animal para animal exemplificado pelas amostras BIII3 e EIII3 (Figura 9) (setas indicando bandas), referentes aos animais que receberam mesma dieta (T3 = 66,7% de FVA) e apresentaram padrões de bandas diferentes. Esta observação é condizente com Kocherginskaya et al. (2001) que também observaram diferenças nos perfis das bandas daqueles animais que receberam dieta a base de milho, no entanto, estas diferenças foram mínimas naqueles animais alimentados com feno.

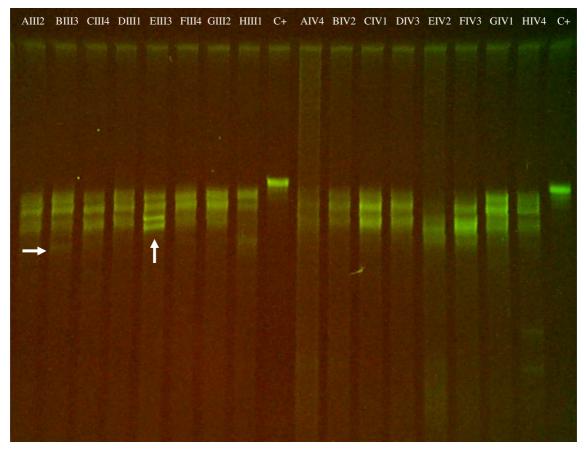


Figura 9 – DGGE dos produtos da PCR utilizando os iniciadores F357GC-R518. A-D, representam as cabras do quadrado latino 1; E-H, representam as cabras do quadrado latino 2; III-IV, equivalem aos períodos experimentais; 1-4, os tratamentos (0, 33,3, 66,7 e 100% de substituição do fubá de milho pelo farelo da vagem de algaroba; C+, controle positivo (*Salmonella* sp.).

Contudo, estes dados são preliminares, pelo fato de não ter sido, até o dado momento, padronizado a técnica de DGGE, totalmente, por se tratar de uma comunidade complexa de microrganismos. Apesar do conhecimento de que o DGGE seja uma metodologia de rápida aplicação para diversas análises de vários ecossistemas microbianos, esta metodologia tem sido aplicada neste estudo, que é pioneiro nesta área, como uma ferramenta para análise da microbiota ruminal através de extração total do DNA.

5. CONCLUSÕES

- A extração e purificação do DNA total das amostras de líquido ruminal com posterior amplificação enzimática pela PCR demonstraram ser eficazes na detecção da região conservada de bactérias presentes no rúmen.
- A PCR demonstrou também, que houve sensibilidade na determinação da região V3 de 16S rDNA, devido a observação de diferentes números e intensidades de bandas encontrados no perfil do gel de DGGE.
- O método de DGGE pode ser usado para diagnosticar a presença e abundância relativa de microrganismos, como as bactérias, que compõem uma comunidade complexa, como é o caso da população microbiana ruminal. Entretanto, a técnica necessita ser padronizada para que haja uma alta resolução nos géis de DGGE para este experimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. AABO, S.; RASMUSSEN, O.F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P.D.; OLSEN, J.E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Celular Probe.** v.07, p.171-178. 1993.
- 2. ALLISON, M.J.; MAYBERRY, W.R.; McSWEENEY, C.S. et al. *Synergistes jonesii*, gen. Sp. Nov.: A rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. **Systematical and Applied Microbiology**. v.15, p.522-529. 1992.
- 3. AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. v.59, n.1, p.143-169. 1995.
- 4. ARGOLO FILHO, R.C. **Identificação, sorotipagem e diferenciação pela pcr-dgge de sorotipos de** *Salmonella* **isolados de teiús criados em cativeiro**. 2007. 83p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz.
- 5. ARNHEIM, N.; WHITE, T.; RAINEY, W.E. Application of PCR: organismal and population biology. **BioScience**. v.40, p.174-182. 1990.
- 6. ATTWOOD, G.T. e REILLY, K. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand. **Journal in Applied Bacteriology.** v.79, p.22-29. 1995.
- 7. AVGUSTIN, G.; WALLACE, R.J.; FLINT, H. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.47, n.2, p.284-288. 1997.
- 8. BÉRA-MAILLET, C.; BROUSSOLE, V.; PRISTAS, P. et al. Characterization of endoglucanases EGB and EGC from *Fribrobacter succinogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1476, p.191-202. 2000.
- 9. BÉRA-MAILLET, C.; RIBOT, Y.; FORANO, E. Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n. 4, p.2172-2179. 2004.
- 10. BERNALIER, A.; FONTY, G.; BONNEMOY, F. et al. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. **Journal of General Microbiology**. v.139, p.873-880. 1993.
- 11. BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J.; ØRSKOV, E.V. Control of rate and extent of protein degradation. *In:* TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (eds.). **Physiological Aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York: Academic Press, 1991. cap.23, p. 542-592.
- 12. BROOKER, J.D.; O'DONOVAN, L.A.; SKENE, I. et al. *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. **Letters in Applied Microbiology**. v.18, p.313-318. 1994.
- 13. CHENG, K.J.; FORSBERG, C.W.; MINATO, H. et al. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. *In:* TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (eds.).

- **Physiological Aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York: Academic Press, 1991. cap.24, p. 595-624.
- 14. CHENSSON, A. e FORSBERG, C.W. Polyssacheride degradation by rumen microorganisms. *In*: HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap. 8, p.329-381.
- 15. COELHO DA SILVA, J.F.C. e LEÃO, M. **Fundamentos da nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 384 p.
- 16. COTTA, M.A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosacharides from starch. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, n.1, p.48-54. 1992.
- 17. COTTA, M.A. Utilization of xilooligosaccharides by selected ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.11, p.3557-3563. 1993.
- 18. COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological inovations. **Anais da Acadêmia Brasileira de Ciências.** v.71, n.3, p.491-503. 1999.
- 19. DALY, K.; STEWART, C.S.; FLINT, H. J. et al. Bacterial diversity within equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology.** v.38. p.141-151. 2001.
- 20. DEHORITY, B.A.; TIRABASSO, P.A.; GRIFO, A.P., Jr. Most-probable number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.2789-2792. 1989.
- 21. DEHORITY, B.A. e ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populatios. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap. 5, p.233-235.
- 22. EDWARDS, J.E.; McEWAN, N.R.; McKAIN, N. et al. Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. **Microbiology**. v.151, p.717-725. 2005.
- 23. FERRIS, M.J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.340-346. 1996.
- 24. FONDEVILA, M. e DEHORITY, B.A. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. **Journal in Applied Microbiology**. v.77, p.541-548. 1994.
- 25. FONDEVILA, M. e DEHORITY, B.A. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. **Journal Animal Science**. v.74, p.678-684. 1996.
- 26. FONSECA, A.J.M. e DIAS-DA-SILVA, A.A. Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.96. n.538, p.60-64, 2001.

- 27. FOSTER, R.J.; TEATHER, R.M.; GONG, J. et al. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate producing anaerobic bacteria from the rumen of white tailed deer. **Letters in Applied Microbiology**. v.23, p. 218-222. 1996.
- 28. FUJIMOTO, C.; MAEDA, H.; KOKEGUCHI, S. et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgengival plaque. **J. Periodont Res.** v.38, p. 440-445. 2003.
- 29. GIOVANNONI, S.J.; BRTSCHGI, T.B.; MOYER, C.L. et al. Genetic diversity in Saragasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v.345, p.60-63, 1990.
- 30. GREEN, G.L.; BROSTOFF, J.; HUDSPITH, B. et al. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. **Journal Applied Microbiology**. v.100, p. 460-469, 2006.
- 31. GRISWOLD, K.E. e MACKIE, R.I. Degradation of protein and utilization of the hydrolytic products by predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola* B₁4. **Journal of Dairy Science**. v.80, n.1, p.167-175. 1997.
- 32. HAHN, D. In situ analysis of microbial populations. **Journal New Jersey of Technology.** v.172, p.762-770. 2001.
- 33. HUDMAN, J.F. e GREGG, K. Genetic diversity among strains of bacteria from the rumen. **Current Microbiology**. v.19, n.5, p.313-318. 1989.
- 34. JACOBSEN, C.S. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.9, p. 3347-3352. 1995.
- 35. JONES, R.J. e MEGARRITY, R.G. Sucessful transfer of dihydroxypyridine-degrading bacteria from Hawaiian (USA) goats to Australian ruminats to overcome the toxity of *Leucaena*. **Australian Veterinary Journal**. v.63, p.259-262. 1986.
- 36. KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. Current Science. v.89, n.1, p.124-135. 2005.
- 37. KRAUSE, D.O.; DALRYMPLE, B.P.; SMITH, W.J.M. et al. 16SDNA sequencing of Ruminococcus albus and Ruminococcus flavefaciens: design of a signature probe and its application in adult sheep. **Microbiology.** v.145, p.1797-1807. 1999.
- 38. KREUZER, H. e MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.
- 39. LIN, L.L. e THOMSON, J.A. Na analysis of the extraxellular xylanases and cellulases of *Butiryvibrio fibrisolvens* H17c. **FEMS Microbiology Letters**. v.84, p.197-204. 1991.
- 40. LONDOÑO, A.A.S.; VELÁSQUEZ, L.F.U.; PAREDES, C.C.G. et al. Estudo da microflora ruminal utilizando *Dichantium aristatum* e dois suplementos. **Anais da Reunião Anual da SBZ**. 134. 1997. Juiz de Fora MG.
- 41. LUZ, W.C. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte I o sistema e 25 reinos em três domínios. **RAPP**, v. 8, p. 1-25, 2000.
- 42. MAED, D.A.; PEY, N.K.; HERRNSTADT, C. et al. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. **BioTechnology**. v.9, p. 657-661. 1991.

- 43. MACIEL, B.M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. 2004. 85p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz.
- 44. MATHERON, C.; DELORT, A.M.; GAUDET, G. et al.. Re-investigation of glucose metabolism in *Fibrobacter succinogenes*, using NMR spectroscopy and enzymatic assays. Evidence for pentose phosphates phosphoketolase and pyruvate formate lyase activities. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1355, p.50–60. 1997.
- 45. McCRACKEN, V.J.; SIMPSON, J.M.; MACKIE, R.I. et al. Molecular ecology analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. **Journal of Nutrition.** v. 131, p. 1862-1870. 2001.
- 46. McEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M. et al. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**. v.41, p. 97-101. 2005.
- 47. McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.78-88. 2001.
- 48. MIRON, J. e BEN-GHEDALIA, D. Digestion of cell-wall monosaccharides of ryegrass and alfalfa hays by the ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Canadian Journal of Microbiology**. v.39, p.780-786. 1993.
- 49. MUELLER, S.; SAUNIER, K.; HANISCH, C. et al. Differents in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n. 2, p.1027-1033. 2006.
- 50. MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- 51. MUYZER, G. e SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Anton. Leeuw. Int. J.G.** v.73, p.127-141. 1998.
- 52. MUYZER, G. DGGE/ TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**. v.2, p. 317-322. 1999.
- 53. ODENYO, A.A.; MACKIE, R.I.STAHL, D.A. et al. The use of 16S rRNA-targetted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p.3688-3696. 1994.
- 54. ORPIN, C.G. e JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap. 4, p.174-179.
- 55. OSTE, C. Product application focus: polymerase chain reaction. **BioTechniques**. v.6, n.2, p.162-167. 1988.

- 56. PASTER, B.; RUSSELL, J.B.; YANG, C.M. et al. Phylogeny of ammonia-producing rumen bacteria *Peptostreptococcus anaerobius, Clostridium sticlandii* and *Clostridium aminophilum*. **nternational Journal of Systematic Bacteriology**. v.43, p.107-111. 1993.
- 57. PAUL, R.G.; BUTLER, R.D.; WILLIAMS, A.G. Ultrastructure of *Charonina ventriculi*. **Journal of Protozoology**. v.37, p.11. 1990.
- 58. PEREIRA, E.S.; QUEIROZ, A.C.; PAULINO, M.F. et al. Dinâmica dos nutrientes no trato gastrintestinal de novilhos holandeses alimentados com dietas à base de cana-de açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.6, p.1516-1524. 2003.
- 59. REGENSBOGENOVA, M.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P. et al. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. **Letters in Applied Microbiology**. v.39, p.144-147. 2004.
- 60. RODÍCIO, M.R. e MENDOZA, M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones em microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica**. v.22, n.4, p.238-45. 2004.
- 61. ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil an sediment samples. **Applied Soil Ecology**. v. 18, p. 47-60. 2001.
- 62. RUSSEL, J.B. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology.** v.49, p.572-576. 1985.
- 63. RUSSELL, J.B. e RICKIIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**. v.292, p.1119-1122. 2001.
- 64. SHAH, H.N. e COLLINS, D.M. *Prevotella*, new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.40, p.205-208. 1990.
- 65. SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G + C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of National Academy of Science**. v.86, n.1, p.232-236. 1989.
- 66. SIGLER, W.V.; MINIACI, C.; ZEYER, J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. **Journal of Microbiological Methods**. v.57, p.17-22. 2004.
- 67. SIMPSON, J.M.; McCRACKEN, V.J.; WHITE, B.A. et al. Application of denaturing gradient gel electrphoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **Journal of Microbiological Methods**. v.36, p.167-179. 1999.
- 68. SOTOHY, S.A.; SAYED, A.N.; AHMED, M.M. Effect of tannin-rich plant (*Acacia nilotica*) on some nutricional and bacteriological parameters in goats. **Deutsche Tierarztliche Wochenschrifte**.104, p.432-435. 1997.
- 69. STACKEBRANDT, E. e HIPPE, H. Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov. **Systematical and Applied Microbiology**. v.8, p.204-207. 1986.
- 70. STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap. 2, p.10-72.

- 71. STROBEL, H.J. e DAWSON, K.A. Xylan and arabinose utilization by the rumen bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. **FEMS Microbiology Letters**. v.113, p.291-296. 1993.
- 72. TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T. et al. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology.** v.29, p.159-169. 1999.
- 73. TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.2766-2774, 2001.
- 74. TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de ruminantes**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 2001. 182 p. Curso de Pós Graduação *Latu Sensu* (Especialização) à distância: Produção de Ruminantes.
- 75. TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.11, p.4210-4215, 1996.
- 76. THEATHER, R.M.; HEFFORD, M.A.; FORSTER, R.J. The rumen bacteria. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap. 10, p.427-428.
- 77. TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology.** v.56, p.782-787. 1990.
- 78. TREVORS, J.T. e VAN ELSAS, J.D. A review of selected methods in environmental microbial genetics. **Canadian Journal of Microbiology**. v.35, p.895-902. 1989.
- 79. TSAI, Y. e OLSON, B.H. Rapid method for direct extraction of DNA from seeded soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.1070-1074. 1991.
- 80. TSAI, Y. e OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2292-2295. 1992.
- 81. VAN DER ZEE, H. e HUIS, J.H.J. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. **Journal of AOAC International**. v.80, p.934-940. 1997.
- 82. VAN GYLSWYK, N.O. Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. **FEMS Microbiology Ecology**. v.73, p.243-254. 1990.
- 83. VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornel University Press, 1994. 476p.
- 84. VAREL, V.H. e DEHORITY, B.A. Cellulolitic bacteria and protozoa from bisom, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfafa-corn diets. **Applied and Environmental Microbiology.** v.55, p.148-153. 1989.
- 85. VAUGHAN, E.E.; SCHUT, F.; HEILIG, H.G.H.J. et al. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Current Issues in Intestinal Microbiology.** v.1, n.1, p.1-12. 2000.
- 86. WALLACE, R.J. e McKAIN, N. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. **Journal of General Microbiology**. v.137, p.2259-2264. 1991.

- 87. WALLACE, R.J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal Animal Science**. v.72, p.2992-3003. 1994.
- 88. WALLACE, R.J.; ONODERA, R.; COTTA, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap.7, p.283-328.
- 89. WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**. v.345, p. 63-65. 1990.
- 90. WARD, B.B. How many species of prokaryotes are there? **Proceedings of National Academy of Science**. v.99, n.16, p.10234-10236. 2002.
- 91. WILLIAMS, A.G.; WITHERS, S.E.; NAYLOR, G.E. et al. Effect of heterotrophic ruminal bacteria on xylan metabolism by anaerobic fungus *Piromyces communis*. **Letters in Applied Microbiology**. v.19, p.108-119. 1994.
- 92. WILLIAMS, A.G. e COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. *In:* HOBSON, P.N. e STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. cap.3, p.110-111.
- 93. WOESE, C.R. Bacterial evolution. Microbiology Reviews. v.51, p.221-271. 1987
- 94. YOKOYAMA, M.T. e JOHNSON, K.A. Microbiología del rumen e intestino. *In:* CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap.7, p. 137-157.
- 95. ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.2, p.316-322. 1996.