



AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMI-ÁRIDO ISSN 1808-6845

Revisão de Literatura

ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA PELOS DERIVADOS DE PURINA

Leilson Rocha Bezerra

Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto da Coordenação de Zootecnia do Campus Prof^ª Cinobelina Elvas (CPCE) da Universidade Federal do Piauí-UFPI, BR135, km03, Bairro Planalto Horizonte, CEP.: 64900-000, Bom Jesus-PI, Brasil.
e-mail: leilsonbezerra@yahoo.com.br *Autor para correspondência.

Severino Gonzaga Neto

Zootecnista, Doutor, Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Areia-PB, Brasil email

Juliana da Silva Oliveira

Zootecnista, Doutor, Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Areia-PB, Brasil email

Edson Mauro Santos

Zootecnista, Doutor, Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Areia-PB, Brasil email

Aderbal Marcos de Azevedo Silva

Zootecnista, Doutor, Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR, Rodovia Patos-Teixeira, Patos-PB, Brasil email silvaama@gmail.com

RESUMO: Objetivou-se com esta revisão de literatura analisar a acurácia do método de estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina. Diversos métodos que quantificam a produção de compostos nitrogenados microbianos incluem na metodologia a utilização de marcadores internos e externos que necessitam de intervenção cirúrgica para implantação de fistulas nos animais, causando desconforto e muitas vezes infecção, o que pode alterar os resultados. Porém, o método de estimativa de proteína microbiana pelos derivados de purina não há necessidade de trabalhar com animais fistulados e nem determinar o fluxo de seca no abomaso, ao contrário dos métodos que se baseiam em marcadores microbianos. Por outro lado, o método da excreção de derivados de purinas requer coleta total de urina, mas a utilização de amostras spot de urina pode ser uma alternativa à coleta total. A quantificação da alantoína secretada no leite parece não ser uma alternativa viável como único parâmetro para estimar o fluxo de proteína microbiana ao duodeno, portanto, deve ser somada ao total de derivados de purinas excretados na urina. Há necessidade de validação da recuperação de purinas microbianas absorvidas no intestino delgado como derivados de purinas excretados, principalmente para vacas em lactação. A técnica baseada na excreção de derivados de purinas além de ser menos laboriosa, quando comparada com outras técnicas convencionais, representa uma metodologia simples para o entendimento da dinâmica ruminal, além disso, de acordo com a maior parte dos autores, apresenta maior confiabilidade.

Palavras-chave: creatinina, marcadores, rúmen, urina

ESTIMATE IN THE PRODUCTION OF MICROBIAL PROTEIN IN RUMINANTS BY PURINE DERIVATES

ABSTRACT: This review has the objective to present the method of estimate in the production of microbial protein by Purina derivatives. Methods several that quantify the production of microbial nitrogen composition include in methodology use marker internal and external need in the surgical intervention to implantation than fistules, discomfort cause and a lot of, infection, what can alter the results. However, the method of purines derivatives to estimate the production of microbial protein no need to work with fistulated animals or to determine the dry matter flow in the

abomasum, unlike the methods based on microbial markers. On the other hand, the method of purine derivatives excretion requires total collection of urine, but the use of urine spot samples can be an alternative to the total collection. The quantification of allantoin secreted in milk seems not to be a viable alternative as a sole parameter to estimate the flow of microbial protein to the duodenum; therefore, it should be added to the total of purine derivatives excreted in the urine. It is necessary to validate of the recovery of microbial purine absorbed in the small intestine as purine derivatives excreted, mainly for lactating cows. The technique that besides being less laborious, when compared with other conventional techniques, represents a simple methodology to better understanding the ruminal dynamic, besides, in agreement with author most, present reliability older.

Key Words: creatinine, marker, rumen, urine

INTRODUÇÃO

Os animais ruminantes têm a capacidade peculiar de coletar, armazenar, processar e aproveitar alimentos fibrosos, inadequados ao consumo humano, convertendo-os em substâncias nutritivas que, posteriormente, são aproveitadas para produção de carne, leite, lã e trabalho. Este processo depende intimamente da fermentação ruminal realizada pelos microrganismos que habitam os pré-estômagos do animal, que, por sua vez, requerem energia e proteína em quantidade e qualidade adequadas à sua demanda metabólica para hidrólise e digestão de moléculas complexas, como por exemplo, a celulose. Em razão disso, existe interesse constante em estudar mais detalhadamente as fontes de proteína verdadeira normalmente utilizada para a alimentação dos ruminantes como também a quantidade de proteína produzida pelos microrganismos do rúmen para melhor atender as exigências protéicas dos animais. (CABRAL et al., 2001; ÍTAVO et al., 2002).

A determinação da contribuição da proteína microbiana (PMic) constitui uma importante área de estudo na nutrição protéica de ruminantes (CHEN & GOMES, 1992). Para calcular a contribuição da proteína verdadeira microbiana digestível (PVMD) no intestino delgado, há necessidade do conhecimento da produção de proteína microbiana. Os métodos que quantificam a produção de compostos nitrogenados microbianos incluem a utilização de marcadores internos e animais fistulados. Além disso, são laboriosos e na maioria das vezes imprecisos (CARRO E MILLER, 2002).

Os métodos com técnicas utilizando marcadores para estimar a produção de proteína microbiana estão relacionados com a quantidade de nitrogênio microbiano (N). Em uma revisão com marcadores microbianos, Broderick & Merchen (1992) recomendaram a utilização de bases purinas e 15N como indicadores para medir a produção de biomassa microbiana, porém alertaram para o problema da relação purinas:N diferir entre bactérias e protozoários.

Em contrapartida, métodos baseados na utilização da excreção de derivados de purinas na urina não requerem o uso de animais fistulados, mas necessitam

da coleta de urina total, superando as desvantagens dos métodos. Outras vantagens apontadas estão a eliminação de possíveis efeitos não atribuídos ao tratamento, decorrentes de desconfortos ou infecção pela presença das fistulas, com potencial para condições de uso a campo. Neste sentido, este apanhado bibliográfico tem como objetivo verificar a acurácia do método de estimativa da proteína microbiana pelos derivados de purina.

DESENVOLVIMENTO

O uso da excreção de derivados de purina (DP) como marcador metabólico da síntese microbiana tem sido uma alternativa às técnicas invasivas e foi primeiramente proposto em 1962 por Blaxter & Martin. Entretanto maiores progressos estão sendo realizados no estabelecimento deste método.

Pesquisas recentes confirmam a relação entre produção de proteína microbiana e excreção urinária de DP (VAGNONI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001; Silva et al., 2001; Mendonça et al., 2004, Ojeda, et al., 2005), assumindo-se que a absorção de purinas estaria condicionada à quantidade de proteína microbiana, estimada a partir da excreção urinária dos derivados de purinas: alantoina, ácido úrico, xantina e hipoxantina.

Os DP originam-se de duas fontes, as purinas absorvidas no intestino delgado e as endógenas, ou seja, liberadas do metabolismo dos ácidos nucleicos, refletindo de forma precisa a atividade microbiana ruminal. Os DP que entram na circulação sanguínea também podem ser degradados em ácidos de nucleicos no tecido. Esta é fração endógena. A medida da magnitude da excreção endógena foi determinada com o auxílio da técnica de infusão intragástrica. Quando comparadas espécies, observa-se que a excreção endógena de DP é três vezes maior em bovinos que em ovinos (150 e 530 $\mu\text{mol/kg}$ $\text{Peso}^{0.75}$ por dia respectivamente). Porcos e humanos são semelhantes na excreção endógena expressa com base no peso metabólico, porém apresentam algumas particularidades (CHEN & 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 e 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.

Chen et al. (1990) estudando as diferenças entre bovinos e ovinos, observaram que não havia metabolismo de ácido úrico no plasma de bovinos como também 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 ovinos e bovinos, ácido úrico e alantoína, uma vez filtrados no glomérulo, são quantitativamente excretados na urina. Há pouca secreção e reabsorção destas combinações nos tubos dos nefrões. Assim a excreção urinária de DP é uma função da concentração plasmática da taxa de filtração glomerular (TFG). Nota-se que, alantoína, ácido de úrico, xantina e hipoxantina estão presentes na urina de ovinos, porém, apenas alantoína e ácido de úrico na urina de bovinos. Isto porque, em bovinos, devido à alta atividade da xantina oxidase, que converte xantina e hipoxantina à ácido úrico no sangue e tecidos (também no rim), antes de serem excretados na urina, constituindo juntamente com a alantoína cerca de 98% dos derivados urinários de purina e, portanto são mais explorados (CHEN & GOMES, 1992; RENNÓ et al., 2000a).

A excreção de xantina e hipoxantina, por ser irrisória em bovinos, não necessitam ser determinada para a estimativa da excreção urinária de derivados de purinas, podendo-se basear em alantoína e ácido úrico, sendo aceitos classicamente como indicadores do *status* fermentativo ruminal dessa espécie (RENNÓ et al., 2000a). Estudos revelaram que grande parte desses derivados purínicos é de origem exógena, mais especificamente dos ácidos nucléicos das bactérias ruminais, que são digeridas e absorvidas no abomaso e nos intestinos. Quantidades diminuídas de purinas endógenas são produzidas pelos ruminantes, não chegando a interferir significativamente na quantidade total excretada na urina (CHEN et al., 1990).

Vagnoni et al. (1997), Oliveira et al. (2001), Mendonça et al. (2004), Soares et al. (2005) e Leal et al. (2007) em seus experimentos observaram que a excreção de alantoína representou, 86,6, 87,8, 91,8 e 92,2%, respectivamente, do total de derivados de purinas excretados. Estes valores sugerem que a excreção de alantoína constitui um bom parâmetro para representar a excreção de DP, visando a estimativa da produção de proteína microbiana. Silva et al. (2001) e Oliveira et al. (2001) não observaram diferença significativa para as excreções de ácido úrico através da coleta de urina *spot* em bovinos. Porém, Soares et al. (2005) demonstraram comportamento quadrático em função dos níveis de farelo de trigo da dieta para as excreções urinárias de ácido úrico.

Outra possibilidade promissora para monitorar a síntese proteína microbiana em vacas de leiteira seria a determinação alantoína no leite. Com a presença de DP no leite surgiu uma alternativa à coleta total de urina para a utilização prática da técnica de DP. Timmermans Júnior et al. (2000) observaram, a partir de dez experimentos em que foram utilizadas vacas Holandesas lactantes alimentadas com diferentes tipos de dietas e estádios fisiológicos, relação positiva entre o fluxo de proteína microbiana e a secreção de alantoína no leite e relataram que a secreção de ácido úrico no leite não pode ser usada para prever a produção de proteína microbiana. Esses mesmos autores sugeriram que a produção de leite deve ser incluída na predição do fluxo de proteína microbiana. Para Mendonça et al. (2006), a coleta de amostras de leite é um procedimento prático e útil para se obter a secreção diária de alantoína pela glândula mamária, a qual, mesmo sendo uma proporção relativamente pequena em relação à excreção total de DP e dependente da produção de leite, está relacionada com a absorção de bases purinas no duodeno. Porém apresenta como limitação a aplicação restrita a animais em lactação.

O método de excreção de DP assume que o fluxo duodenal de ácidos nucléicos é essencialmente de origem microbiana e, após digestão intestinal dos nucleotídeos de purinas, as bases adenina e guanina são catabolizadas e excretadas proporcionalmente na urina como DP, principalmente alantoína, e também como xantina, hipoxantina e ácido úrico. A excreção de DP está diretamente relacionada com a absorção de purinas e, conhecendo-se a relação N purina/N total na massa microbiana, a absorção de N microbiano pode ser calculada a partir da quantidade de purina absorvida, que é estimada a partir da excreção urinária de DP (CHEN & GOMES, 1992).

Rennó et al. (2000a) observaram alta correlação entre excreção de derivados de purinas na urina e fluxo de compostos nitrogenados microbianos no duodeno e, ainda, a excreção de alantoína refletiu a excreção total de derivados de purinas, já que foi encontrada em maior proporção, em torno de 85% dos derivados de purinas. Leal et al. (2007) em trabalho desenvolvido com bovinos observara que a excreção de alantoína (92,2%) refletiu a excreção das purinas totais e foi afetada pelo nível de oferta de concentrado e pelo nível de uréia. Barbosa et al. (2006) também observaram efeito da dieta na excreção de alantoína e consequentemente derivados de purina. Os resultados descritos na literatura indicam que o nível de alantoína em vacas não é constante em todos os estádios fisiológicos e tratamentos dietéticos, não sendo observado efeito de genótipo. A excreção média de ácido úrico apresentou encontrada por Silva et al. (2001) representou 10,83% do total de DP excretado na urina.

A excreção urinária de DP pode constituir-se em um método relativamente simples e não-invasivo para estimar a síntese de proteína microbiana, entretanto, seu uso necessita de validação, por meio de comparação com estimativas obtidas com outras técnicas.

A produção de N microbiano pode ser calculada a partir da quantidade de purina absorvida, que é estimada a partir da excreção urinária ou total (urina e ou leite) de DP, dependendo da categoria animal (Chen & Gomes, 1992). As purinas absorvidas (X, mmol/dia) podem ser calculadas a partir da excreção de DP (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 PV^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e 0,385 $PV^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas. Como discutido anteriormente, recentemente, outras equações têm sido propostas para vacas: $Y = 0,85X + 0,310PV^{0,75}$ (Orellana-Boero et al., 2001); $Y = 0,61X + 0,512PV^{0,75}$ para vacas no terço inicial da lactação e $Y = 0,77X + 0,512PV^{0,75}$ para vacas no terço médio da lactação (GONZALEZ- RONQUILLO et al., 2003).

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, gN/dia) é calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina:N total dos microrganismos ruminais (CHEN & GOMES, 1992).

A estimativa da produção de proteína microbiana a partir da excreção de DP, igualmente para o método das bases purinas, requer o conhecimento da relação N-purina:N total dos microrganismos ruminais, que é muito variável (VAGNONI & BRODERICK, 1997). A relação 0,116 apresentada por Chen & Gomes (1992), foi obtida a partir de dados da literatura. Dias et al. (2000), e Rennó et al. (2000a) encontraram em seus experimentos relações de 0,134, 0,113 e 0,117, respectivamente. Silva et al. (2001) observaram produção de N microbiano, determinada pela técnica da excreção dos DP e usando a relação de N purina:N total de 0,134 variou de 123,06 a 219,76g Nmic/dia. Já Magalhães et al. (2005), em experimento com 24 bovinos mestiços de origem leiteira, encontraram variação de 704,87 a 801,72g Nmic/dia utilizando diferentes teores de uréia como tratamentos. Villela et al. (2008) fornecendo suplementos múltiplos formulados com diferentes fontes de proteína à bovinos em pastagens de *Brachiaria decumbens* no período de transição águas/seca, não observaram diferenças nas excreções urinária de purinas totais, purinas microbianas absorvidas e fluxos de compostos nitrogenados microbianos (99,9 mmol dia⁻¹, 87,9 mmol dia⁻¹, respectivamente).

A síntese de proteína microbiana depende, em grande parte, da disponibilidade de carboidratos e de N no rúmen (NRC, 2001), de modo que o crescimento microbiano é maximizado pela sincronização entre a disponibilidade da energia fermentável e o N degradável no rúmen.

Barbosa et al. (2006) não observaram diferença entre as médias da produção de compostos nitrogenados microbianos (Nmic), expressa em gN/dia, obtidos pela coleta total e pela estimativa via coleta *spot* de urina nos dois níveis de concentrado e nas quatro categorias

animais. Esta ausência de diferença para a produção de Nmic obtida pelas coletas total e *spot* de urina também foi verificada por Silva et al. (2001), trabalhando com vacas leiteiras. Há considerável interesse em se utilizarem concentrações de DP e outros catabólitos nitrogenados no leite e na urina como indicadores do fluxo intestinal de proteína microbiana e da utilização dos compostos nitrogenados dietéticos (SUSMEL et al., 1994).

Para medida do balanço de nitrogênio, do teor de energia metabolizável da dieta e, para estimar a síntese protéica microbiana ruminal a partir da excreção dos derivados das purinas em estudos de digestão com ruminantes, é necessário, entre outros, medir a excreção urinária de nitrogênio e dos derivados das purinas. Porém, normalmente, faz-se a coleta total de urina dos animais durante alguns dias em cada período experimental (Kozloski et al., 2005). Chen & Gomes (1992) afirmaram que, para reduzir erros devidos a variações na produção urinária, as coletas de urina deveriam ser feitas durante pelo menos cinco dias.

A maioria dos experimentos tem usado animais machos em gaiolas de metabolismo, onde o procedimento é relativamente simples. No entanto, a coleta total de urina de fêmeas e a de animais em pastejo é mais difícil ou até mesmo impraticável. Alguns pesquisadores, entre eles, Susmel et al. (1994), Vagnoni et al. (1997) e Mendonça et al. (2004) realizaram coletas de urina, em fêmeas, utilizando cateteres, sendo que o tempo de coleta variou de cinco dias, três dias, um a quatro dias e um dia, respectivamente. Contudo, Chen & Gomes, (1992) constataram que a mensuração desses derivados numa única amostra de urina coletada em qualquer horário, desde que corrigida pela creatinina, também refletia a quantidade total urinária excretada dessas substâncias em 24h. Ou seja, esta informação facilitou e disponibilizou esta técnica para análise de perfil fermentativo ruminal em rotina laboratorial, mas infelizmente pouco ou nada tem sido realizado neste aspecto.

É importante ressaltar que o uso de cateteres pode causar desconforto, principalmente para animais gestantes e/ou em lactação. Desse modo, quanto menor o tempo de coleta, menores serão os problemas de desconforto ou mesmo possíveis lesões no trato urinário, que acometerão os animais. Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias que proporcionem diminuição do tempo de coleta ou mesmo que tornem desnecessária a coleta total de urina, como as estimativas baseadas na excreção de creatinina utilizando coleta de urina *spot* (amostras obtidas por micção espontânea, aproximadamente, quatro horas após a alimentação).

Na tentativa de simplificar a obtenção de dados experimentais e eliminar o desconforto causado por funis ou cateteres utilizados na coleta total, a creatinina excretada na urina tem sido utilizada como um indicador para estimar o volume urinário total. A creatinina é formada no músculo pela remoção de água da creatina-fosfato, originada do metabolismo do tecido muscular (HARPER et al., 1982). A molécula de creatina-fosfato é

degradada espontaneamente a taxas relativamente constantes formando a creatinina. A creatinina é um produto metabólico do qual o corpo já não necessita, não sendo utilizada para formação de novas moléculas, portanto, excretada em grandes quantidades pelos rins. A produção diária de creatina, por conseguinte, a excreção de creatinina, é dependente da massa muscular e é proporcional ao peso do animal. Dados da literatura têm demonstrado que a excreção de creatinina é constante, em função do PV dos animais (Susmel et al., 1994; Vagnoni et al., 1997; Oliveira et al., 2001; Silva et al., 2001). De outra forma, foi observado também que a relação entre a concentração dos derivados das purinas e creatinina em amostra de urina é relativamente constante ao longo do dia (Chen et al. 1992). Com base nisso, tem sido sugerido o uso da concentração de creatinina em amostras pontuais de urina como um indicador da excreção urinária total dos animais. Para Kozloski et al. (2005) a estimativa da produção urinária dos animais, com base na concentração de creatinina em amostras pontuais de urina, pode ser confiável somente se, em pelo menos um animal representativo de um grupo experimental, for realizada coleta total de urina para medida da excreção média deste metabólito por unidade de peso corporal. Além disso, amostras pontuais de urina devem ser coletadas em diferentes horários para construir uma amostra composta representativa de um ciclo de 24 horas.

Valadares et al. (1997), utilizando quatro vacas em blocos ao acaso com sete períodos de coleta de urina (2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas), observaram que não houve diferença significativa em termos de excreção de creatinina entre as coletas com duração de 24, 48 ou 72 horas; as coletas com duração de 96 horas resultaram em menores excreções de creatinina, provavelmente devido a lesões de graus variáveis do trato urinário, vazamento de urina do cateter ou obstrução do cateter, que são problemas freqüentemente relacionados ao emprego dessa técnica por longos períodos. Barbosa et al. (2006) afirmaram que o período de coleta de urina de 24 horas é suficiente para trabalhos com bovinos Nelore, independentemente de serem novilhas, machos castrados ou não-castrados ou vacas em lactação, objetivando-se a avaliação da excreção urinária de creatinina, dos derivados de purina e da produção microbiana. Silva et al. (2001) encontraram excreção de creatinina com valor médio de 23,60 mg/kg PV. Para Leal et al. (2007), a ausência de efeito de número de dias sobre a excreção de creatinina tem grande aplicação prática, pois, além de reduzir o trabalho, permite a diminuição dos custos da pesquisa, dispensando a coleta de urina durante períodos longos, sugerindo que as coletas sejam feitas durante 24 horas. Valadares et al. (1999) obtiveram valor de 29,0 mg/kg PV para excreção média diária de creatinina em vacas Holandesas puras. Já para Mendonça et al. (2004), o volume urinário produzidos em 24 horas podem ser estimados a partir da coleta parcial de oito horas, em vacas em lactação.

Portanto, é possível utilização de creatinina para estimar o volume urinário, o que possibilitará estimar a excreção de DP e de outros compostos, sem necessidade de coleta total de urina.

A metodologia de coleta de uma amostra *spot* de urina, ou seja, de uma única amostra diária de urina, possibilita estimar o volume urinário produzido diariamente por um animal. Geralmente, a amostra é obtida quatro horas após a alimentação, período em que a concentração plasmática e urinária destes compostos já tenha alcançado o platô e nela se determina a concentração de creatinina, cuja excreção é constante.

Valadares et al. (1999) estimaram as excreções diárias de DP a partir de amostras *spot* de urina e diferenças entre o volume medido e o estimado só foram significativas para 35% de concentrado na dieta, não havendo diferenças para 20, 50 e 65% de concentrados. Silva et al. (2001), Oliveira et al. (2001), Mendonça et al. (2004), em experimentos com vacas mestiças Holandês x Zebu, encontraram valores médios para excreção de creatinina, de 23,6, 23,4, 24,0 respectivamente. Rennó et al. (2000b), trabalhando com novilhos encontraram valor médio para excreção diária de creatinina de 27,4 mg/kgPV. Os autores afirmaram que a partir da concentração de creatinina na amostra *spot* de urina, o volume de urina (expressa em L) pode ser estimado, dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg) pela concentração de creatinina (mg/L). Silva et al. (2001) não observaram diferença entre os volumes de urina obtido e estimado (10,87 e 11,11 L/dia, respectivamente) o mesmo se aplicando às médias obtidas e estimadas e afirmaram que a amostra *spot* de urina é satisfatória para estimar o volume urinário e as excreções de uréia e DP e, subseqüentemente, a produção de N microbiano. Leal et al. (2007) encontrou excreção de creatinina em média de 25,47 mg/kgPV, em bovinos com aproximadamente 450 kg de peso vivo. Oliveira et al. (2001), Barbosa et al. (2006), Chizzotti et al. (2006) e Leal et al. (2007) também encontraram resultados semelhantes e confirmaram que a coleta de amostra *spot* de urina é satisfatória, substituindo a coleta de 24 horas, para estimativa da produção de proteína microbiana em novilhas, inteiros ou castrados e vacas lactantes da raça Nelore. Já para Mendonça et al. (2004), as excreções urinárias de creatinina, alantoína, ácido úrico e purinas totais, as purinas absorvidas e a estimativa dos compostos nitrogenados microbiano produzidos em 24 horas podem ser estimados a partir da coleta parcial de oito horas, em vacas em lactação. Chizzotti et al. (2006) afirmaram ainda que a coleta *spot* possa ser utilizada para estimativa da excreção diária de derivados de purinas e de uréia na urina em novilhas, independentemente do peso vivo.

Valadares et al. (1999) observaram que a produção de nitrogênio microbiano em vacas no terço inicial da lactação apresentou comportamento linear positivo com amostragem *spot* de urina e quadrático, quando realizada coleta de urina 24 horas, obtendo pico a 35,5% de carboidratos não fibrosos na dieta total (cerca de

50% de concentrado). Esses autores atribuíram isso às variações nas excreções de alantoína e DP totais, que podem se tornar um problema na amostragem *spot* de urina, quando a proporção de concentrado na dieta for elevada. Concluíram, portanto, que a amostragem *spot* de urina pode ser um procedimento útil para estimar a excreção de DP por detectar diferenças relativas entre tratamentos em condições a campo.

Apesar das vantagens acima citadas, a criação desse novo método de estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina surgiu com algumas limitações. No cálculo da estimativa é assumido que pequena porção do ácido de nucléico dietético alcança o intestino delgado. Isto é confirmado nos estudos com a maioria das dietas, porém quando são utilizadas rações contendo grandes quantidades de farinha de peixe Chen & Gomes (1992).

Alguns parâmetros usados nos modelos não foram ainda definidos ou confirmados, entre eles a recuperação de purinas exógenas absorvidas e a relação N purina/N total (NP/NT) nos microrganismos ruminais, que de acordo com Sandoval-Castro & Herrera-Gomes (1999), envolvem três fatores de correção: a taxa de recuperação do indicador (DP excretado:N-purina absorvida); a excreção real de origem microbiana (DP endógeno:DP exógeno); e a digestibilidade do indicador (N-purínico absorvido:fluxo de N-purínico no duodeno). O outro parâmetro seria a relação N-purinas:N-total dos microrganismos ruminais (VAGNONI & BRODERICK, 1997). Chen & Gomes (1992), Rennó (2000a) e Valadares et al. (1999) obtiveram relações NP/NT de 11,6; 17,6; 11,67; e 13,4%, respectivamente.

O método também está limitado a utilização em ovinos e bovinos e é possível que em outras espécies o metabolismo das purinas seja diferem. Mais informações precisam ser disponibilizadas para ovinos, bovinos, caprinos, pequenos animais e outras espécies. Os valores de fluxo de N microbiano calculados de excreção de PD não deveriam ser levados como valores absolutos embora resulte de número limitado de experiências mostrou valores obtidos pelo PD método esteja em acordo bom com outros métodos. Não obstante, este método é usado melhor para comparar diferenças em N microbiano intestinal flutuante entre tratamentos dietéticos.

A variabilidade encontrada inicialmente nos estudos de recuperação ocorreu devido à falta do conhecimento do aporte endógeno e da capacidade de utilização das 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 DP endógenos e da digestibilidade (SANDOVAL-CASTRO & HERRERA-GOMES, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de marcadores moleculares internos e externos não está mais sendo indicada como método para estimar proteína microbiana por se tratar de uma técnica invasiva que causa muito desconforto ao animal podendo interferir nos resultados. Com base na literatura, observamos que a recuperação dos DP não apresenta grandes variações dentro de uma mesma espécie animal, embora comparação de resultados seja dificultada pelas diferenças entre os métodos empregados nos estudos de recuperação para a obtenção dos modelos. Dessa forma, estudos são necessários para que os resultados sejam validados, visando à obtenção de maior acurácia na estimativa da produção ruminal de proteína microbiana.

É importante o desenvolvimento de metodologias que permitam o menor tempo possível de coleta de urina para estimar o volume urinário e que sejam menos invasivas, ou até mesmo que tornem desnecessária a coleta total de urina, com é o caso da coleta de urina *spot*, que pode ser utilizada como estimativas baseadas na excreção de creatinina, excreções de DP e da produção de proteína microbiana

Neste sentido, a utilização da excreção total de DP para estimar a produção de proteína microbiana, parece ser uma alternativa viável, quando comparada com as técnicas invasivas, com é o caso da fistularão de animais principalmente, por se tratar de uma técnica que não necessita de intervenção cirúrgica, o que resulta em melhor bem-estar para os animais.

REFERÊNCIAS

BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2618-2632, 1992.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; MALAFAIA, P.A.M.; LANA, R.P.; José SILVA, F.C.; VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, E.S. Estimação da digestibilidade intestinal da proteína de alimentos por intermédio da técnica de três estádios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.546-552, 2001.

CARRO, M.D.; MILLER, E.L. Comparison of microbial markers (15 N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**, v.75, p.315-321, 2002.

CHEN X.B.; ØRSKOV E.R.; HOVELL F.D.D. Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. **British Journal of Nutrition**. v.63, p.121-129, 1990.

CHEN X.B.; GOMES M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary

excretion of purine derivatives-an overview of technical details. International Feed Research Unit Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication), p.21, 1992.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, F.H.M.; CAMPOS, J.M.S.; MARCONDES, M.I.; FONSECA, M.A. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1813-1821, 2006.

DIAS, H.L.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; COELHO da SILVA, J.F.; PAULINO, M.F.; CECON, P.R.; VALADARES, R.F.D.; RENNÓ, L.N.; COSTA, M.A.L. Eficiência de Síntese Microbiana, pH e Concentrações Ruminais de Amônia em Novilhos F1 Limousin x Nelore Alimentados com Dietas Contendo Cinco Níveis de Concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.555-563, 2000.

FUJIHARA, T.; ORSKOV, E.R.; REEDS, P.J. 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.

GONZALEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; VICENT, F. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretions and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1282-1291, 2003.

HARPER H.A.; RODWELL V.W.; MAYES P.A. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p.736, 1982.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; VALADARES, R.F.D.; PAULINO, M.F.; ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAES, E. H. B.K. Comparação de indicadores e metodologia de coleta para estimativas de produção fecal e fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1833-1839, 2002.

KOZLOSKI, G.V.; FIORENTINI, G.; HARTER, C.J.; SANCHEZ, L.M.B. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.98-102, 2005.

LEAL, T.L.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I.; DETMANN, E.; BARBOSA, A.M.; CHIZZOTTI, M.L.; PAIXÃO, M.L. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.896-904, 2007.

MAGALHÃES, K.A.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; PAIXÃO, M.L.; PINA, D.S.; PAULINO, P.V.R.; CHIZZOTTI, M.L.; MARCONDES,

M.I.; ARAÚJO, A.M.; PORTO, M.O. 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.

MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; VALADARES, R.F.D.; SOARES, C.A.; LANA, R.P.; QUEIROZ, A.C.; ASSIS, A.J.; PEREIRA, M.L.A. 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.

OJEDA, A.; PARRA, O.; BARCELLS, J. Urinary excretion of purine derivative in Bos indicus x Bos Taurus crossbred cattle. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.93, n.6, p.821-828, 2005.

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

ORELLANA-BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; LIANG J.B.; GUADA, J.A. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v.68, p.243-250, 2001.

RENNÓ L.N.; VALADARES R.F.D.; LEÃO M.I.; VALADARES FILHO S.C.; COELHO da SILVA J.F.; CECON P.R.; DIAS H.L.C.; COSTA M.A.C.; OLIVEIRA R.V. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1223-1234, 2000a.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I.; COELHO da SILVA, J.F.; CECON, P.R.; GONÇALVES, L.C.; DIAS, H.L.C.; SAMPAIO, R.L. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1235-1243, 2000b.

SANDOVAL-CASTRO C.A.; HERRERA-GOMES F. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en ruminantes através de la medición de los derivados de purina en orina. **Revista Biomédica**, v.10, p.241-251, 1999.

SILVA R.M.N.; VALADARES R.F.D.; VALADARES FILHO S.C.; CECON P.R.; RENNÓ L.N.; SILVA J.M. Uréia para vacas em lactação. 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de uréia.

Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, p.1948-1957, 2001.

SUSMEL, P.; STEFANON, B.; PLAZZOTA, E.; SPANGHERO, M.; MILLS, C.R. The effect of energy and protein intake on the excretion of purine derivatives. **Journal of Agricultural Science**, v.123, p.257-266, 1994.

TIMMERMANS Jr., S. J.; JOHNSON, L. M.; HARRISON, J. H.; DAVIDSON, D. 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.

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

VAGNONI, D.B.; BRODERICK, M.K.; CLAYTON, R.D.; HATFIELD, R.D. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1695-1702, 1997.

VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of Replacing Alfalfa Silage with High Moisture Corn on Ruminal Protein Synthesis Estimated from Excretion of Total Purine Derivatives. **Journal Dairy Science** v.82, p.2686–2696, 1999.

VALADARES R.F.D.; GONÇALVES L.C.; SAMPAIO I.B.; VALADARES FILHO S.C. Metodologia de coleta de urina em vacas utilizando sondas de folley. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.1279-1282, 1997.

VILLELA, S.D.J.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I.; FIGUEIREDO, D.M. Fontes de proteína em suplementos para abate de bovinos em pastejo: período de transição águas-seca. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, n.02, p.317-326, 2008.