

PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Disponível em: http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=200>.

Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes

Diego Reynaga Salazar¹; Cristina Simões Cortinhas¹; José Esler Freitas Jr¹

Alunos de Pós-Graduação do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A fonte mais importante de nitrogênio para os microrganismos ruminais provém normalmente da proteína dietética e do nitrogênio não protéico (NNP). O metabolismo de proteína no rúmen é dependente do tipo de proteína da dieta assim como a interação entre microrganismos e substratos presentes no ambiente ruminal. Dessa forma, a degradação de proteína no rúmen é um processo múltiplo envolvendo solubilização, hidrolise extracelular, transporte para o interior da célula, considerando neste contexto que a fermentação e a digestão são ações distintas de um processo único de degradação. A concentração de produtos finais resultantes da degradação protéica ruminal pode variar de acordo com a interação com substratos presentes no rúmen. Isso ocorre, porque estes substratos poderão ser aproveitados simultaneamente pela população microbiana, considerando um balanceamento adequado de nutrientes. Os carboidratos podem afetar grandemente o metabolismo de aminoácidos, pois esses representam a principal fonte de energia para as bactérias, embora possam ser utilizados como esqueletos carbônicos para a síntese protéica em combinação com a amônia. Os Carboidratos rapidamente fermentáveis, como amido e açúcares, são mais efetivos que outras fontes de carboidratos, como a celulose, na promoção do crescimento microbiano. A síntese de proteína microbiana é determinada por dois fatores principais: a taxa de fermentação, que estabelece a quantidade de alimento digerido por unidade de tempo e é o plano funcional da nutrição por microrganismos, e a taxa de passagem, que favorece a perda ruminal do substrato lentamente fermentado e remove os microrganismos maduros. A produção microbiana é dependente das complexas inter-relações que ocorrem no rúmen envolvendo as diversas espécies microbianas, disponibilidade de carboidratos, nitrogênio e seu metabolismo. Entretanto, este conceito de sincronismo entre proteína e energia tem uma sólida base teórica, é provável que neste complexo ecossistema de associações de microorganismos, quando suplementado é sincronizado para uma sub-população específica, ocorrendo uma falta de sincronismo para outras populações. Em adição ao suprimento com fontes adequadas de carboidratos e N, existem outros fatores nutricionais como o suprimento de enxofre, e fatores não nutricionais como pH e grau de diluição que exercem importante função na síntese de proteína microbiana e que podem comprometer a estratégia alimentar.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos foram conduzidos nos últimos 30 anos, sobre o uso de diferentes fontes protéicas para vacas leiteiras, com o objetivo de maximizar a eficiência de utilização da proteína da dieta, através de melhor desempenho animal e menores perdas de nitrogênio (N) para o ambiente (Santos *et al.*, 1998). Dentro deste contexto, destaca-se também a função básica da produção de leite em animais especializados, que é converter fontes de

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

alimentos não competitivas e de baixa qualidade em proteína de alta qualidade para o consumo humano. Freqüentemente, a quantidade e qualidade da proteína absorvida no intestino delgado podem limitar a produção de leite (Nousiainen et al., 2004).

Na nutrição protéica de ruminantes, é fundamental a estimativa acurada da síntese de proteína microbiana ruminal, pois esta é responsável por uma grande contribuição do suprimento de proteína para o intestino delgado. Cerca de 60% dos AAs absorvidos no ID são de origem microbiana e o restante, 40% proveniente da PNDR da dieta (Wattiaux, 2002). Esquemas de alimentação que alteram a produção de proteína microbiana afetam a quantidade e a qualidade da proteína que chega ao intestino delgado.

Vários fatores afetam a síntese de proteína microbiana (SPM) no rumem, entre eles, a disponibilidade de energia e nitrogênio para os microrganismos ruminais, talvez sejam os mais importantes. Além disso, a SPM é dependente das complexas inter-relações que ocorrem no rúmen envolvendo as diversas espécies microbianas, pH, taxa de turnover. Para o entendimento dessas inter-relações, se faz necessário primeiro a caracterização das frações protéicas e o entendimento tanto do metabolismo protéico como do metabolismo dos carboidratos, maior fonte de energia.

Atualmente, observa-se constante procura de metodologias acuradas e simples para estimar a qualidade dos alimentos, cujos objetivos são as predições dos valores protéicos e energéticos para atender a demanda gerada pelas funções produtivas dos animais em determinado estágio fisiológico. O problema essencial é a busca do entendimento em bases mecanicistas das relações entre a composição bromatológica, a disponibilidade de energia e proteína e as respostas esperadas nos animais (Pereira et al., 2005). Vale ressaltar que a eficiência de síntese de proteína microbiana tem sido expressa de diferentes formas: O NRC (1985) considerou a produção de proteína bruta bacteriana em função de nutrientes digestíveis totais (NDT); o Agricultural Research Council (1984) expressou em relação à matéria orgânica degradada no rúmen (MODR); o Agricultural and Food Research Council (1993)

considerou a eficiência em função da energia metabolizável fermentada no rúmen, e o CNCPS, descrito por Russell et al., (1992), expressou a eficiência microbiana em grama de matéria seca bacteriana (gMSbac) por grama de carboidratos totais degradados no rúmen (CHODR).

A presente revisão tem como objetivo, elucidar os mecanismos que envolvem o metabolismo protéico no rúmen, com ênfase na degradação de proteína, síntese e eficiência de síntese de proteína microbiana, com foco especial em aspectos que afetam a degradação de proteínas, como pH e interações com nutrientes, taxa de passagem, população microbiana, e outros fatores que afetam a produção de proteína microbiana bem como as formas de predição.

2. OBJETIVO

O objetivo desta revisão é elucidar os mecanismos que envolvem o metabolismo protéico no rúmen, com ênfase na degradação de proteína, síntese e eficiência de síntese de proteína microbiana, com foco especial em aspectos que afetam a degradação de proteínas, como pH e interações com nutrientes, taxa de passagem, população microbiana, e outros fatores que afetam a produção de proteína microbiana bem como as formas de predição.

3. METABOLISMO DE PROTEINA NO RUMEN

O metabolismo protéico no rúmen é proveniente da atividade metabólica dos microrganismos ruminais sendo que, a estrutura da proteína da dieta é considerada um fator chave deste metabolismo, determinando a susceptibilidade das proteases microbianas e, portanto a degradabilidade (Bach et al., 2005).

O metabolismo de proteína em ruminantes, envolve a degradação de parte da proteína em peptídeos, aminoácidos (AAs) e amônia (NH₃) pelos microrganismos ruminais. As exigências de proteína metabolizável (AAs

absorvidos) são atendidas pela proteína dietética que escapou da degradação ruminal e pela proteína de origem endógena que alcança o intestino delgado (ID) (NRC, 2001).

A proteína da dieta é dividida em dois *pools* principais: o de proteína degradada no rúmen (PDR) e o de proteína não degrada no rúmen (PNDR). A PDR é composta de nitrogênio não protéico (NNP) e proteína verdadeira. A proteína verdadeira é degradada a peptídeos e AAs que são eventualmente deaminados em nitrogênio (N) e NH₃ e incorporados em proteína microbiana (PM) ou degradados pelos microrganismos ruminais produzindo ácidos graxos voláteis (AGV) de cadeia ramificada. O NNP é composto de N, presente em DNA, RNA, NH₃, AAs e pequenos peptídeos. Tanto os AAs, quanto NNP pode ser convertido a NH₃ pelos microrganismos ruminais.

Quando a dieta fornece energia fermentável limitante ou proteína bruta em excesso ou ainda, proteína altamente degradável em excesso, poderá ocorrer uma produção excessiva de NH₃ sendo que, nem toda a NH₃ produzida poderá ser convertida em proteína microbiana (PM). A NH₃ produzida em excesso é absorvida pela parede do rúmen e transportada para o fígado. O fígado converte a NH₃ em uréia a qual e lançada no sangue. Essa uréia a nível sanguíneo poderá ter diferentes destinos: retornar ao rúmen via saliva ou através da própria parede do rúmen, ou poderá ser excretada pela urina nos rins (Figura 1). Quando essa uréia retorna ao rúmen, ela é convertida novamente em NH₃ e poderá servir como fonte de nitrogênio para bactérias (Bach et al., 2005; Valadares Filho et al., 2002; NRC, 2001; Wattiaux., 2002).

Entretanto, segundo Nolan e Dobos (2005), é preciso destacar que, a taxa de assimilação de NH₃ pelas bactérias e fungos é dependente de suas respectivas taxas de crescimento. Dessa forma o nitrogênio da NH₃ pode ser removida pelos seguintes caminhos: através do fluido ruminal, pela incorporação da matéria microbiana, pela absorção através da parede do rúmen e por ultimo, pelo fluxo para o abomaso.

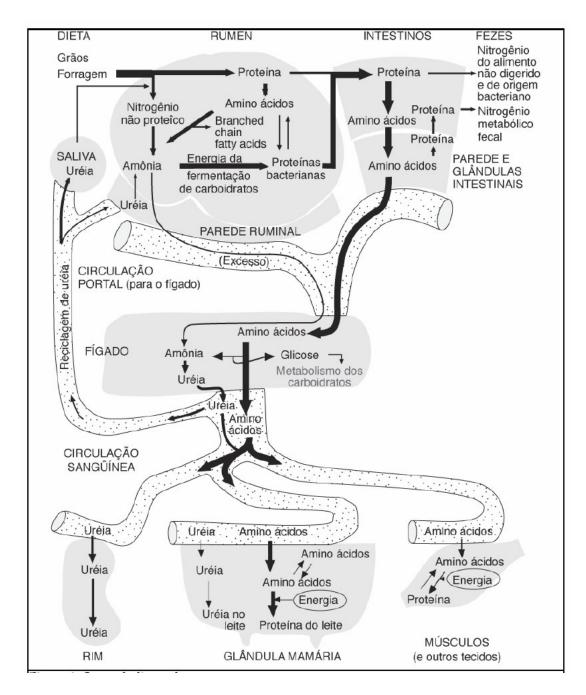


Figura 1. Desenho esquemático do metabolismo de proteína.

Fonte: Wattiaux (2002).

A proteína não degradada no rúmen (PNDR), é a segunda maior fonte de AAs absorvidos pelo animal. A PNDR passa pelo rúmen sendo quebrada a AAs no intestino delgado (ID). Esses AAs são absorvidos e utilizados posteriormente pelos músculos e outros tecidos na síntese protéica. Assim, ambas as frações PDR e PNDR são de fundamental importância para a formulação de dietas balanceadas.

A maioria do suprimento de proteína que chega no intestino delgado em ruminantes é proveniente da síntese de proteína microbiana (SPM), sendo cerca de 60% dos AAs absorvidos no ID de origem microbiana e o restante, 40% proveniente da PNDR da dieta (Wattiuax, 2000). Entretanto este fluxo contínuo de proteína microbiana para o pequeno intestino, depende do aproveitamento de nutrientes e a eficiência do uso destes nutrientes pelos microrganismos no rúmen.

A síntese de proteína microbiana requer substratos ricos em energia, além de peptídeos, AAs e amônia, outros nutrientes essenciais como fontes de enxofre minerais, ácidos graxos de cadeia ramificada e certos fatores de crescimento (Theodorou e France 2005). Portanto o metabolismo de proteína no rúmen pode ser divido em duas fases distintas: degradação protéica a qual fornece fontes de nitrogênio para as bactérias e síntese de proteína microbiana.

3.1 Degradação Ruminal de Proteína

A degradação da proteína no rúmen é um processo múltiplo envolvendo solubilização, hidrolise extracelular, transporte para o interior da célula, considerando neste contexto que a fermentação e a digestão são ações distintas de um processo único de degradação (Russel et al., 1991; Valadares Filho, 1995 *apud* Santos et al., 2001).

O primeiro passo de degradação ruminal da proteína no rúmen, consiste no ataque das bactérias as partículas dos alimentos representadas pela atividade das proteases ligadas a parede microbiana (Brock et al., 1982 apud

Bach et al., 2005). As bacterias *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Prevotella ruminicola* representam a maioria das espécies proteolíticas do rumen (Stewart et al., 1997).

A população microbiana ruminal tem uma vasta variedade de proteases, mas esta atividade proteolítica é tida como moderada quando comparada com as secreções pancreáticas. (Wallace, 1996). O grupo de bactérias com maior atividade proteolítica representa somente uma pequena parte da biomassa total. (Nolan e Dobos., 2005).

Algumas espécies de cepas de bactérias do rúmen, protozoários ciliados e fungos anaeróbicos possuem atividade proteolítica e possuem uma variedade de deferentes tipos de enzimas proteolíticas (Wallace, 1996). Assim considerando que o número de diferentes ligações dentro de uma única proteína é grande, a ação sinérgica de diferentes proteases é necessária para completa degradação protéica. Portanto, a taxa e a extensão a qual a degradação protéica ocorra pode depender da atividade proteolítica da microflora ruminal e do tipo de proteína (susceptibilidade e a acessibilidade de ligações peptídicas) (Bach et al., 2005).

As proteínas alimentares são degradadas pelos microrganismos ruminais em AAs, depois amônia e em ácidos graxos de cadeia ramificada (Wattiaux, 2002). A quantidade destes peptídeos e AAs, liberados pela degradação ruminal, e que serão absorvidos pelas células microbianas pode ser dependente do aproveitamento da energia ingerida (carboidratos). Se existe energia disponível, os AAs podem ser transaminados ou usados diretamente para síntese de proteína microbiana. Entretanto, se a energia é limitante, os AAs podem ser deaminados e seus esqueletos de carbono podem ser fermentados a ácidos graxos voláteis (AGV). (Figura 2).

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

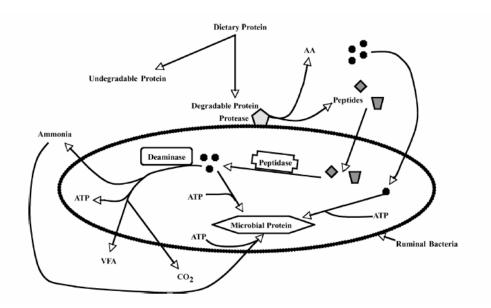


Figura 2. Representação esquemática da degradação de proteína e produtos finais da degradação no rúmen.

Fonte: Bach et al. (2005)

A maioria dos estudos avaliando a degradação de proteína no rúmen tem sido conduzidos usando técnicas *in situ*, a qual mede somente a degradação protéica e não o uso de peptídeos e AAs pelas bactérias ruminais

De acordo com Nolan e Dobos, (2005), peptídeos e AAs são essenciais para alguns espécies de bactérias tal como as *Bacteroidas ruminicola* as quais são incapazes de assimilar AAs livres. Alem disso, freqüentemente tem sido demonstrado que, a presença de altas concentrações de peptídeos e AAs no fluido ruminal, estimulam o crescimento microbiano.

Cardozo et al., (2004) concluíram utilizando continuas culturas fermentadas recebendo uma ração leiteira típica que, a concentração de peptídeos, AAs e amônia não apresentaram nenhuma variação por mais de 8 horas após a alimentação, registrando um aumento de nitrogênio de AAs as 2 e 4 horas após a alimentação.(Figura 3), sugerindo que o consumo de AAs pode ser um fator limitante na degradação de proteína no rúmen. Glen et al.,

(2004), comprovaram estes resultados avaliando os efeitos inibidores das concentrações de amônia e AAs totais *in vitru*. Concluíram que a adição de amônia, AAs livres e peptídeos reduziu aparentemente as taxas de degradação possivelmente via inibição de produtos finais.

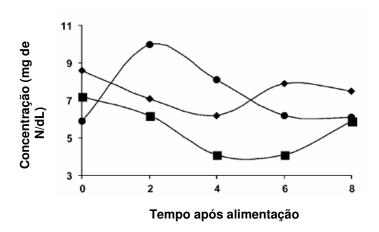


Figura 3. Concentração de peptídeos, AAs e amônia em culturas continuas fermentadas recebendo alimentação com uma razão concentrado volumoso de 60:40 a cada 8 horas, Peptídeo N ◆, AA N, •, e amônia N □.

Fonte: adaptado de Cardozo et al., (2004), citado por Bach et al., (2005).

Reynal e Broderick (2005), avaliaram o efeito do nível de proteína degradável no rúmen PDR, sobre a produção e metabolismo de nitrogênio em vacas leiteiras lactantes. Esses autores verificaram o efeito de quatro níveis de PDR 13,2; 12,3; 11,7 e 10,6 % na dieta sobre a concentração de amônia no rúmen após a alimentação, e constataram que a redução dos níveis de PDR da dieta resultou em um decréscimo linear do nitrogênio amoniacal (N-NH³) após alimentação.

Portanto, a concentração de produtos finais resultantes da degradação protéica ruminal, pode variar de acordo com a interação com substratos

presentes no rúmen. Isso ocorre, porque esses substratos poderão ser aproveitados simultaneamente pela população microbiana, considerando um balanceamento adequado de nutrientes. Em outras situações, poderá proporcionar a perda de nitrogênio e comprometimento de certos microrganismos pela não sincronia de nutrientes ruminais.

3.2 Fatores que Afetam a Degradação Ruminal de Proteínas

Os fatores mais importantes que afetam a degradação protéica microbiana incluem o tipo de proteína da dieta, a interação com outros nutrientes (principalmente carboidratos com da mesma matéria alimentar e dentro do conteúdo do rúmem) e a população microbiana predominante (dependendo do tipo de ração, taxa de passagem e pH ruminal) (Bach et al., 2005).

O tipo de proteína pode influenciar a taxa de degradação ruminal e, além disso, o metabolismo e aproveitamento de outros nutrientes pelos microrganismos no rúmen e intestino delgado. Oliveira et al., (2003), avaliaram a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta in situ do farelo de soja, grão de milho, melaço em pó, farinha de peixe e farinha de penas e feno de alfafa. Concluíram que fontes protéicas de origem animal, como as farinhas de peixe e de penas apresentam baixa degradabilidade ruminal e que alimentos degradáveis ruminalmente podem ser utilizados para maximizar o desenvolvimento microbiano. Molina et al., (2003) avaliaram a taxa de degradabilidade da proteína in situ de seis genótipos de sorgo para silagem. Concluíram que a presença do tanino reduziu a extensão da degradabilidade da proteína bruta. Zeoula et al. (2004) avaliaram a degradação de três concentrados diferindo na composição da fonte energética utilizando o amido e óleo. Verificaram que o concentrado rico em amido apresentou maior degradabilidade da proteína bruta em relação ao concentrado contendo óleo.

A degradação protéica é comprovadamente descrita pela ação de enzimas proteolíticas. Entretanto, há evidências que suportam a importância de outras

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

atividades enzimáticas na degradação protéica, ocorrida pela interação com outros nutrientes. Assoumani et al. (1992), demonstraram o aumento na ordem de 6 a 20% na degradação de proteína de grãos de cereais quando foi adicionada amilase no rúmen. Tomanková e Kopecny, (1995) também verificaram efeito positivo da amilase sobre a degradação ruminal de proteína. Kohn e Allen (1995) verificaram um aumento da taxa de degradação protéica da ordem de 42,4 a 53,1 % quando celulases foram adicionadas em um sistema de digestão proteolítica *in vitro*. Além dos fatores já citados que podem afetar a degradabilidade ruminal de proteínas, pode se destacar ainda, o tempo de retenção da proteína no rúmen, ou seja, a taxa de passagem, e o pH ruminal (NRC, 2001).

De acordo com Allen et al., (1997), a capacidade em se estimar o pH ruminal sobre dada dieta e importante, para otimizar a digestão ruminal e o suprimento de nutrientes para vacas leiteiras, prevenindo desta forma, doenças metabólicas como acidose e laminite. O ótimo pH do rúmen para a atividade proteolítica de acordo com (Kopecny e Wallace 1982 *apud* Bach et al., 2005) varia em torno de 5,5 e 7,0. Dessa forma a queda do pH pode reduzir a degradação de proteína no rúmen.

Cardozo et al. (2000, 2002), em dois estudos de cultura de fluxo continuo de fermentação, comparando ração com alto concentrado e ração com alta forragem para uma variação do pH de 4,9 e 7,0 demonstraram que a degradação de proteína foi reduzida com o decréscimo do pH com ambos os tipos de rações, embora segundo os autores as bactérias amilolíticas tenderam a ser mais proteolíticas do que as bacterias celuloliticas. Devante et al, (2001) avaliaram farelo de soja incubado e farelo de soja e processado pelo calor no rúmen de um rebanho leiteiro alimentado com um razão concentrado volumoso de 60:40 ou no rúmen de gado de corte com uma razão de 10:90 usando a técnica *in situ*. Os resultados mostraram que e degradação de proteína foi baixa para a ração para o gado de corte considerando que o pH foi >6,0 em ambos os tipos de animais, confirmando que a redução na degradação de proteína não se da somente pelo efeito do pH, mas também

pelo tipo de substrato sendo fermentado ou a população microbiana predominante.

Portanto, a degradação protéica pode ser influenciada por todos os fatores intrínsecos ligados a proteína do alimento, variando com a fonte de proteína utilizada na dieta, e ainda com a interação física e metabólica de nutrientes e microrganismos presentes no ambiente ruminal.

4. METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Durante a fermentação ruminal, a população de micróbios (na sua maioria bactérias) fermentam os carboidratos para produzir energia, gases (metano - CH_4 e dióxido de carbono – CO_2), calor e ácidos. O ácido acético (vinagre), o ácido propiônico e o ácido butírico são ácidos graxos voláteis (AGV) e constituem a maioria (>95%) dos ácidos produzidos no rúmen. Além disso, a fermentação de aminoácidos produz alguns ácidos chamados de isoácidos. A energia e os iso-ácidos produzidos durante a fermentação são utilizados pelas bactérias para seu crescimento, principalmente para a síntese de proteínas. O CO2 e o CH4 são eliminados pelo orifício esofágico, e a energia do CH4 é perdida. Ao menos que o calor seja necessário para a manutenção da temperatura corporal, o calor produzido durante a fermentação se dissipa. Os AGV, produtos finais da fermentação ruminal, são absorvidos através da parede ruminal. A maioria do acetato e todo o propionato são transportados para o fígado, mas a maioria do butirato é convertido na parede ruminal em corpos cetônicos, sendo o principal o $\beta\Box$ -hidroxibutirato (Figura 4). As cetônas são importantes fontes de energia para a maioria dos tecidos do corpo. As cetonas são derivadas do butirato que é produzido no rúmen, mas no início da lactação, elas também são produzidas na queima de gordura pelo animal (Wattiaux e Armentano, 2007).

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

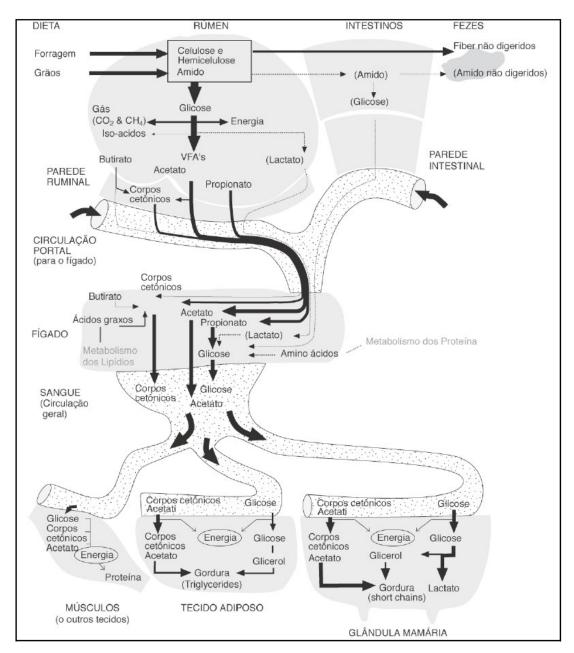


Figura 4. O metabolismo dos carboidratos em bovinos.

Fonte: Wattiaux e Armentano (2007).

Bach (2005), comenta que os microrganismos ruminais utilizam carboidratos (CHOs) e proteínas como fontes de energia. Os carboidratos são a principal fonte de energia para as bactérias, embora possam ser utilizados como esqueletos carbônicos para a síntese protéica em combinação com a

amônia. A síntese de proteína ruminal depende do suprimento de quantidades e formas adequadas de CHOs como fontes de energia para a síntese de corpos peptídicos. Carboidratos rapidamente fermentáveis, como amido e açúcares, são mais efetivos que outras fontes de carboidratos, como a celulose, na promoção do crescimento microbiano.

5. SINCRONIZAÇÃO ENERGIA X CARBOIDRATO E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A digestão ruminal e síntese microbiana têm considerável impacto na nutrição e alimentação de ruminantes (Firkins et al., 1998). A produção microbiana é dependente das complexas inter-relações que ocorrem no rúmen envolvendo as diversas espécies microbianas, disponibilidade de carboidratos, nitrogênio e seu metabolismo.

Os protozoários estão diretamente envolvidos com a produção microbiana, através de suas enzimas, ou indiretamente como consequência de seus efeitos no tamanho da população e atividade de outros microorganismos fibrolíticos, tendo importante função na determinação na atividade da degradação de polissacarídeos no ecossistema ruminal (Williams e Whithers, 1991). Devido a grande habilidade dos protozoários em ingerir partículas de matéria suspensas no conteúdo ruminal, esses microorganismos são mais ativos em degradar proteínas insolúveis do que solúveis. A verdadeira contribuição dos protozoários para a performance do animal ainda não está bem esclarecida, mas há um decréscimo na concentração de amônia ruminal observada após a defaunação além de baixa excreção de N urinário, enquanto que o aumento na excreção de nitrogênio fecal, nos mesmos animais, pode ter resultado da alteração na digestão dos carboidratos fibrosos do rumem para o intestino (Jouany 1996). Demeyer e Fievez (2004) ressaltam o papel dos protozoários no fornecimento de aminoácidos e peptídeos através da proteólise de proteínas alimentares e microbianas.

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

A sincronização entre a taxa de fermentação do carboidrato, e a degradação de proteína tem sido sugerida como um meio de otimizar o crescimento microbiano no rumem (Shabi, 1998). Geralmente, as bactérias são capazes de capturar a maior parte de amônia liberada no rumem a partir da deaminação de aminoácidos e hidrólise dos compostos de NPN. Entretanto, as condições dietéticas freqüentemente ocorrem em taxas nas quais a amônia liberada no rúmem excede as taxas de captura pelas bactérias ruminais. Exemplos dessas condições são os excessos de PDR e a carência de energia disponível (Maeng 1997apud NRC 2001). Esse assincronismo entre a liberação de amônia e energia disponível no rumem resulta numa ineficiente utilização de substratos fermentáveis e reduz a síntese de proteína microbiana (NRC 2001).

Hoover e Stokes (1991) relatam que a determinação dos níveis e tipos de carboidratos e da origem do N necessária para a maximização da digestão da matéria orgânica e do carboidrato, além da síntese de proteína microbiana, requer mais estudos, especialmente conduzidos envolvendo tanto a dinâmica estática quanto a ambiental. No estado dinâmico, entretanto, há condições fisiológicas que, se não forem controladas, podem modificar a eficiência do crescimento microbiano e digestão dos nutrientes. Na proeminência disso está o pH e a taxa de turnover. Está bem estabelecido que na redução do pH decresce a digestão das proteínas, celulose, hemicelulose e pectinas, mas tem menor efeito na digestão do amido.

Segundo Ribeiro et al. (2001), as bactérias que fermentam carboidratos estruturais utilizam amônia como fonte de N e aquelas que fermentam CNE utilizam amônia, peptídeos e aminoácidos.

Altas concentrações de carboidratos não estruturais (CNE), aumentam a utilização do nitrogênio amoniacal (NH3-N) ruminal para a síntese de proteína microbiana. A sincronização da degradação de CNE e proteína degradável ruminal (PDR) podem maximizar a síntese de proteína microbiana para atender as necessidades de crescimento do animal e produção de leite (Casper et al,1999).

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

Cecava et al (1991), em seu experimento avaliou os efeitos da razão forragem:concentrado e a suplementação com proteína verdadeira degradável no rumem nos sítios de digestão e síntese líquida de proteína microbiana. Seus resultados sugerem que dietas com concentrados a base de milho aumentam a disponibilidade de energia em todo trato gastrintestinal, devido provavelmente ao incremento de fontes mais digestíveis de CHOs como o amido. O crescimento microbiano no rúmen tende a ser limitado pelo suprimento dos produtos da proteólise como AAs, peptídeos exceto do nitrogênio amoniacal. Portanto, pode ser vantajosa a inclusão de uma fonte degradável de proteína verdadeira em dietas suplementadas com proteínas resistentes a degradação ruminal.

Baseado em dados de estudos *in vivo* e *in vitro*, Hoover e Stokes (1991), comentam que há uma concordância geral de que a taxa de digestão dos carboidratos é o principal fator que controla a disponibilidade de energia para o crescimento microbiano, em adição, a taxa de digestão dos carboidratos totais é diretamente relacionada com as proporções de amido, pectina e açúcares. As proteínas afetam tanto a fermentação quanto a produção de proteína microbiana em MS por unidade de carboidrato fermentável.

Kolver et al. (1998), avaliou a sincronização da degradação ruminal de carboidrato e proteína suplementados no período de pastejo durante a lactação de vacas leiteiras. Baseado nas trocas da concentração ruminal de amônia, o sincronismo ruminal liberou o carboidrato suplementado com o nitrogênio do pasto incrementando aparentemente a captura do nitrogênio ruminal, entretanto, essas trocas foram transitórias e não alteraram o status de nitrogênio na performance das vacas leiteiras.

Vacas de leite com alta produção são alimentadas com altas quantidades de proteína de boa qualidade e, o fato da degradação protéica microbiana não estar diretamente acoplada com a síntese de proteína microbiana, freqüentemente deixa a produção de NH₃ em excesso aumentando as perdas através da excreção de nitrogênio urinário (Sannes et al., 2001).

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

As bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos utilizam amônia como única fonte de N, e são altamente prejudicadas quando ocorre deficiência de N degradável no rúmen, levando a um menor desaparecimento dos carboidratos fibrosos, diminuindo assim, a taxa de passagem e, conseqüentemente, o consumo de matéria seca (Tedeschi et al., 2000)

Há uma grande dificuldade na interpretação desse tipo de estudo porque as taxas de energia e proteína disponíveis são freqüentemente confundidas com o total de energia e proteína disponíveis, e os ingredientes geralmente são diferentes nos tratamentos estudados. Enquanto o conceito de sincronismo entre proteína e energia tem uma sólida base teórica, é provável que neste complexo ecossistema de associações de microorganismos, quando suplementado é sincronizado para uma sub-população específica, ocorrendo uma falta de sincronismo para outras populações. Entretanto, o nitrogênio reciclado no rúmen pode contribuir para a estabilização do crescimento microbiano (Bach et al, 2005).

Russel et al (1992), relatam que microorganismos que fermentam celulose e hemicelulose (carboidratos estruturais - CE) crescem lentamente utilizando amônia como fonte de N na síntese microbiana. Microorganismos que fermentam amido, pectina, e açúcares (carboidratos não estruturais- CNE) crescem mais rapidamente que os fermentadores de CE e utilizam tanto amônia quanto aminoácidos como fontes de N. Estes autores propuseram um modelo simplificado para descrever os requerimentos de energia e proteína para os microorganismos (Figura 5).

Entretanto, estudos como os de Griswold (1996) ressaltam que aspectos relativos as fontes de N necessitam ser mais investigadas, incluindo os efeitos das combinações entre proteína, peptídios, aminoácidos e uréia no metabolismo microbiano. Este autor demonstra que outras fontes de N são necessárias não apenas para o máximo crescimento microbiano, além da necessidade de nitrogênio não protéico para a digestão de fibras.

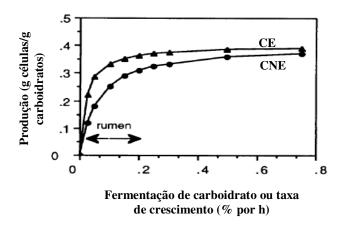


Figura 5. Efeito da taxa de fermentação dos carboidratos (taxa de crescimento), sobre a produção de bactérias ruminais que fermentam carboidratos estruturais (CE) e carboidratos não estruturais. A teoria do crescimento e produção máximos é de 4g de células por grama de carboidrato, e os requerimentos de energia de manutenção bacteriana para CE e CNE são .05 e 150g de carboidratos por hora, respectivamente. As taxas de crescimento no rumem usualmente variam de 05 para. 2 h-1.

Fonte: Russel et al. (1992)

Atasoglu et al. (2001), demonstraram com culturas puras de bactérias celulolíticas, que a bactéria ruminal celulolítica incorpora aminoácidos préformados que estimulam o seu crescimento, esses aminoácidos são mais utilizados que peptídeos, além disso, a biosíntese de fenilalanina poder ser um fator limitante para algumas espécies. Atasoglu et al. (2004), sugeriram que muitos aminoácidos como a lisina são limitantes potenciais para o crescimento da bactéria ruminal, então, assegurando o suprimento de aminoácidos específicos pode resultar num aumento do crescimento microbiano. Estes

Salazar, D.R., Cortinhas, C.S. e Freitas Jr., J.E. Sincronismo energia - proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. PUBVET, V.2, N.15, Abr2, 2008.

autores confirmaram a teoria que descreve a dificuldade das bactérias em sintetizar fenilalanina (Phe), leucina (Leu), e isoleucina (Ile).

Demeyer e Fievez (2004), comentam que a síntese de proteína bacteriana pode ser limitada pelo suprimento ruminal de aminoácidos, em animais de alta produção com dietas formuladas a partir de altas quantidades de amido e proteína que são subjetivamente limitantes da degradação ruminal. Reconhecidamente estas dietas são conhecidas por deprimir o pH ruminal e a população de protozoários, fatores que conduzem a baixos níveis de aminoácidos livres e peptídeos no conteúdo ruminal. Portanto, a otimização da produção de proteína microbiana ruminal em animais alimentados com dietas para altas produções, requer um maior conhecimento da natureza de limitação dos aminoácidos livres. Em adição ao suprimento com fontes adequadas de carboidratos e N, existem outros fatores nutricionais como o suprimento de enxofre, e fatores não nutricionais como pH e grau de diluição que exercem importante função na síntese de proteína microbiana. Sob condições práticas, a eficiência da síntese de proteína microbiana fica relativamente constante com a ampla variação no pH ruminal (Bach et al.,2005).

St-Pierre (2001), propôs o modelo de meta-análise para descrever os efeitos do pH ruminal na síntese da proteína microbiana, este modelo pode resultar numa melhora nas equações de predição dos sistemas biológicos e uma descrição mais acurada de seus erros de predição. Períodos transitórios de baixo pH podem beneficiar, do ponto de vista da nutrição protéica, e resultar num aumento de fluxo de N não amoniacal e aminoácidos essenciais. Entretanto o baixo pH por longos períodos de tempo pode reduzir a digestão de fibras, disponibilidade de energia, outros problemas associados com baixo consumo, e outros problemas que podem não ser compensados com suas vantagens (Calsamiglia, 2002). Hoover e Stokes (1991) relatam que a redução no pH diminui a digestão das proteínas, celulose, hemicelulose, e pectina, porém com menos efeito na digestão do amido. O baixo pH pode ser conseqüência da fermentação de grandes quantidades de matéria orgânica (Figura 6). O resultado da negativa relação entre pH e fluxo de nitrogênio

microbiano está relacionado com o aumento no suprimento com fontes de alta energia fermentável (Stern et al., 2006).

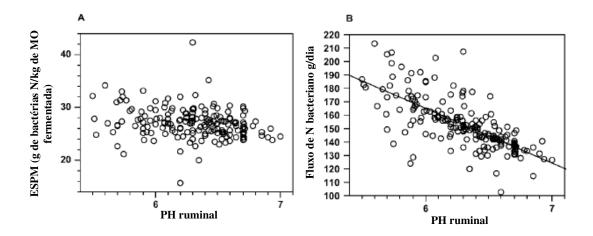


Figura 6. Relação entre o pH ruminal e a síntese de proteína microbiana; A)ou fluxo total de N bacteriano (B), ambos ajustados para o efeito médio do estudo. O pH ruminal e a eficiência da síntese microbiana não têm relação (A). Fluxo de N bacteriano e pH ruminal tem uma significativa relação (B): Y= 410-40.767pH; R²= 0.50; RMSE= 13.49; P<0.001.

Fonte: Adaptado de Bach et al. (2005)

Alterações na população microbiana e atividade metabólica do rumem que resultam de um aumento nas taxas de turnover da digesta podem influenciar na degradação protéica e crescimento microbiano. O aumento no tempo de retenção de sólidos, em culturas contínuas com conteúdo ruminal, aumenta também a digestão de fibras e matéria seca, mas não a digestão de carboidratos não estruturais. Além disso, a digestão de proteínas não parece ser muito afetada pelo aumento no tempo de retenção de sólidos, aparentemente devido a alterações na população microbiana com menor atividade proteolítica (Shadt et al., 1999). Em outro estudo, Meng et al. (1999) reportaram o efeito das taxas de diluição na fermentação de carboidratos, fibrosos e não fibrosos, e proteínas usando modelos de fluxo singulares em

culturas contínuas. Aumentando a taxa de diluição de 0,25 para 0,20/h, a eficiência de síntese de proteína microbiana aumentou 2,2 vezes, enquanto o fluxo de nitrogênio microbiano aumentou apenas 1,5vezes, provavelmente devido a uma redução na digestibilidade da matéria orgânica verdadeira.

O aumento na eficiência da síntese de proteína microbiana que é obtido com altas taxas de diluição tem sido atribuídas a seleção de espécies microbianas, altas taxas de crescimento, uma alta proporção da população microbiana na fase exponencial de crescimento, e a diluição dos requerimentos de manutenção para os micróbios (Bach et al., 2005).

6. USO DE TECNICAS PARA A ESTIMATIVA DE SÍNTESE MICROBIANA.

Para a maioria dos microrganismos, o valor ótimo de pH varia entre 6 e 7, com atividade máxima no pH próximo de 6,5 Grant & Mertens (1992) sugeriram o valor de 6,2 como ideal para o crescimento microbiano, mas, de modo geral, quando o pH é mantido abaixo de 6,0, ocorre redução da síntese de proteína microbiana e da digestibilidade da fibra.

6.1 Técnica de Radiofósforo.

A Utilização de radiofósforo para a determinação da síntese microbiana tem mostrado ser bastante eficiente. Através da coleta de amostra do líquido do rúmen pode-se medir a taxa de incorporação do radiofósforo (³²P) *in vitro*, avaliando dessa maneira a atividade microbiana.

O método baseia – se na relação entre a incorporação do fósforo na matéria microbiana e a síntese de proteína, utilização de amônia ou produção de ácidos graxos voláteis, em curtos períodos de incubações usando ³²P com marcador.

A técnica *in vitro* de incorporação de ³²P para estimar síntese microbiana baseia – se na incubação de uma pequena quantidade de amostra com líquido

ruminal em meio tamponado e uma diminuta quantidade de radiofósforo como marcador de proteína microbiana. Com base na atividade especifica do fósforo solúvel (*AE*) e na incorporação do radiomarcador pelos microorganismos, é possível calcular a quantidade de massa microbiana gerada (Van Nevel & Demeyer, 1977).

6.2 Técnica do Isótopo pesado do Nitrogênio.

Através de outro marcador é determinada a síntese microbiana *in vivo*, com a utilização do isotopo pesado do nitrogênio (¹⁵N). É fornecida aos animais, ou, ainda, colocada diretamente no rumen. Esta fonte é metabolizada pelos microorganismos do rúmen e proteínas microbianas são sintetizadas com nitrogênio marcado. Nas amostras da digesta coletadas no duodeno, determina-se então, a quantidade de proteína microbiana que passa par o restante do sistema digestório. (Mc Allan et al., 1994).

6.3 Técnica a Partir da Excreção dos Derivados de Purina (dp).

A quantidade de compostos nitrogenados (N) que chega no ID pode ser medida por vários métodos. VALADARES FILHO et al. (1990), ao compararem o método direto (fluxo de NNA) do ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA) e das bases purinas, 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 síntese microbiana. BRODERICK e MERCHEN (1992) também recomendaram as bases purinas, afirmando que nenhum indicador microbiano é totalmente adequado, portanto, as estimativas são relativas, e não absolutas.

Para estimar a síntese microbiana assume que todos os ácidos nucléicos de origem dietética são degradados no rúmen e que, portanto, todos os ácidos nucléicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana.

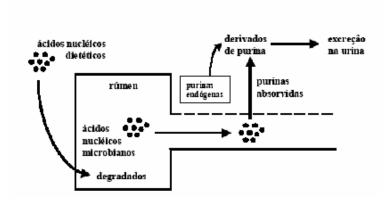


Figura 7. Princípio da excreção urinaria de derivados de purina.

Fonte: Adaptado de Chen & Gomes, (1992).

As purinas dos ácidos nucléicos microbianos então são absorvidas, degradadas e excretadas na urina como seus derivados (produtos de degradação), hipoxantina, xantina, acido úrico e alantoína, Mas apenas o acido úrico e alantoína são excretados por bovinos e bubalinos.

Para bovinos a excreção de DP de origem endógena está diretamente correlacionada ás purinas exógenas absorvidas no intestino. Assim, a excreção de DP pode fornecer uma estimativa quantitativa do fluxo de proteína microbiana se a razão entre purinas e proteína nos microorganismos ruminais for assumida como constante (Tamminga & Chen, 2000)

Diferença especifica no metabolismo das purinas têm sido observadas, é importante notar que diferentes equações são necessárias para cada espécie animal. A equações desenvolvida e validada até o momento para descrever as relações quantitativas entre a absorção de purinas microbianas

(X, em mmol. d -1) e excreção de DP na urina (Y, em mmol. D $^{-1}$) é a seguinte:

$$Y = 0.85 X + (0.385 PV^{0.75})$$

Onde PV ^{0,75} representa o peso metabólico (em Kg) do animal.

Cabe ressaltar que forem desenvolvidos para animas europeu. Os resultados recentes mostram que as excreções de DP porão animais tropicais é relativamente menor. As Principais limitações desta técnica residem no fato de estar baseada em duas suposições.

Primeira. È que todo acido nucléico que chega ao intestino delgado é de

origem microbiana.

Segunda. Relação entre purina e proteína nos microorganismos ruminais ser constante (Chen & Gomes, 1992).

Entretanto, CLARK et al. (1992) verificaram variações nos dados de literatura sobre a composição das bactérias, destacando valores médios de 77,5% para matéria orgânica (MO), 7,71% para nitrogênio (N), 7,28% para RNA-purinas e 13,7% para a relação N-RNA:N-purina. Da mesma forma, VALADARES FILHO (1995) relatou valores médios obtidos de 10 experimentos, de 84,6; 7,1; 8,6; e 17,6%, respectivamente, para MO, N, RNA-purinas e relação N-RNA:N-purina.

A quantificação da PB microbiana que chega ao ID pode ser obtida por meio do conhecimento da eficiência de síntese microbiana definida como a proporção de substrato energético que é fixado como célula microbiana (DEHORITY, 1995).

O NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (1996) expressa a eficiência de síntese microbiana (ESM) como produção de proteína bruta microbiana (Pbmic), em função dos nutrientes digestíveis totais (NDT) consumidos, e admite o valor médio de 13 g Pbmic/100g NDT como boa estimativa.

O Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) expressa a eficiência microbiana em grama de MS microbiana (gMSbac) por grama de carboidratos totais degradados no rúmen (CHODR), em razão destes serem as fontes primárias de energia para o crescimento microbiano (RUSSELL et al., 1992). O AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC (1993), por

sua vez, expressa essa eficiência em grama de PB microbiana por MJ de energia metabolizável fermentada no rúmen.

Bach e outros. (1999) propôs expressar a ESM em eficiência do nitrogênio utilizado por microorganismo ruminais como:

ENU = Gramas de nitrogênio bacterial X 100

Gramas de nitrogênio disponível

ZINN e OWENS (1983), estudando o efeito do nível de consumo sobre o fluxo de N no trato gastrintestinal (TGI) de novilhos recebendo dieta com 80% de concentrado, verificaram que a eficiência de síntese microbiana aumentou de 18,7 para 24,7 gNmic/kg MODR, quando o nível de consumo passou de 1,2 para 1,8% do PV, em razão do aumento na taxa de diluição ruminal.

7. CONCLUSÃO

A maximização da interação energia nitrogênio no rúmen resulta em na minimização das perdas nitrogenadas e aumento da produção microbiana como consequente um aumento no processo produtivo do animal.

Para que isto aconteça, o rúmen deve conter substratos ricos em energia, além de peptídeos, aminoácidos, amônia e outros nutrientes essenciais como fontes de enxofre, minerais, ácidos graxos de cadeia ramificada e certos fatores de crescimento. Alem disso o tipo de proteína da dieta, a interação com outros nutrientes (principalmente carboidratos da mesma matéria alimentar e dentro do conteúdo do rumem) e a população microbiana predominante, dependem do tipo de alimento, taxa de passagem e pH ruminal.

Um valor de pH estável de 6,2 pode ser considerado como ideal para o crescimento microbiano, pelo contrario a degradação protéica e a sua eficiência pode ser comprometida com o aumento ou diminuição do pH.

Portanto, observa-se constante procura de metodologias acuradas e simples, para estimar a qualidade dos alimentos (degradação da proteína, medição de nitrogênio, predição de metabolismo de carboidrato etc...), cujos objetivos são as predições dos valores protéicos e energéticos para atender a demanda gerada pelas funções produtivas dos animais em determinado estágio fisiológico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. *Energy* and protein requirements of ruminants. **Cambridge: CAB International**, 1993. 159p.
- ALLEN, M. S. Relationship between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. **Journal of Dairy Science,** v. 80, p. 1447-1462, 1997.
- ASSOUMANI, B.; VEDEAU, F. ;JACQUOT, L. et al. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants, **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, p. 357-368, 1992.
- ATASOGLU, C.; GULIYE, A.Y.; WALLACE, R.J. Use of stable isotopes to measure de novo synthesis and turnover of amino acid-C and -N in mixed micro-organisms from the sheep rumen in vitro. **British Journal of Nutrition.** Vol. 91, p. 253-261, 2004.
- ATASOGLU, C.; NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J. Incorporation of [15N]Ammonia by the Cellulolytic Ruminal Bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, AND *Ruminococcus flavefaciens* 17. **Applied and Environmental Microbiology.** Vol. 67(6), p. 2819-2822, 2001.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S and STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 9-21, 2005.
- BRODERICK, G.A., MERCHEN, N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 75(9):2618-1632.
- CARDOZO, P. W; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science,** v. 83, 2000.
- CARDOZO, P. W; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science.** v. 82, p. 3230-3236, 2004.
- CARDOZO, P. W; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. **Journal of Dairy Science**, v. 85, 2002.
- CASPER, D.P.; MAIGA, H.A.; BROUK, M.J.; SCHINGOETHE, D. J. Synchronization of Carbohydrate and Protein Sources on Fermentation and Passage Rates in Dairy Cows. **Journal of Dairy science**, v. 82, p. 1779-1790, 1999.
- CECAVA, M.,J.; MERCHEN, N.R.; BERGER, L.L.; MACKIE, R.L.; FAHEY, G.C. Effects of dietary energy level and protein source of nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 2230-2243, 1991.
- CHEN, X.B.; GOMEZ,M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cazttle based on urinary excretion of purine derivatives na overview of te technical details. **Occasional publication of the international Feed Resources Unit Aberdeen**: Rowwelt Research Institute, 1992. 22p.

- CLARK, J.H., KLUSMEYER, T.H., CAMERON, M.R. 1992. Microbial protein syntesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 75:2304-2323.
- CSAPÓ, J.; SCHMIDT,J.; MATIN, T.G. Quantitativ determination of protein of bacterial origin. Trends in Analytical Chemistry, v.20,n.1,p. 42 48, 2001.
- DEHORITY, B.A. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. In. **Simpósio Internacional Sobre Exigências Nutricionais De Ruminantes**, 1995, Viçosa. *Anais...* Viçosa: DZO, 1995, p.121-138.
- DEMEYER, D.; V. FIEVEZ. Is the synthesis of rumen bacterial protein limited by the availability of pre-formed amino acids and/ or peptides? **Britsh Journal Nutrition**. V.91, p.175–176, 2004.
- DEVANT, M.; FERRET, A.; CALSAMIGLIA, S. et al. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 79 p.1944 -1953, 2001.
- FIRKINS, J.L.; ALLEN, M.S.; OLDICK, B.S.; ST-PIERRE, N.R. Modeling Ruminal Digestibility of Carbohydrates and Microbial Protein Flow to the Duodenum. Symposium: Evaluation of Quantitative Estimates for Meeting Amino Acid Requirements of Dairy Cows. Journal of Dairy Science. v. 81, p. 3350-3369, 1998.
- GRANT, R.J.; MERTENS, D.R. Influence of butter pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.10, p.2762-2768, 1992.
- GRISOWOLD, K.E.; HOOVER, W.H.; MILLER, T.K.; THAYNE, W.V. Effect of form of nitrogen on grow of ruminal microbes in continuous culture. **Journal of Animal Science.** v. 74, p. 483-491, 1996.
- HOOVER, W. H.; Stokes, S.R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science.** v. 74, p. 3630-3644, 1991.
- JOUANY, J. P. Effects of rumen protozoa on nitrogen metabolism by ruminants. **Journal of Nutrition**. V.126, p. 1335S–1346S, 1996.
- KOLVER, E.; MULLER, L.D.; VARGA, G.A.; CASSIDY, T.J. Synchronization of Ruminal Degradation of Supplemental Carbohydrate with Pasture Nitrogen in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2017-2028, 1998.
- McALLAN, A.B.; SUTTON, J.D.; BEEVER, D.E.; NAPER, D.J. Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. **Animal feed Science and Technology**, v. 46, p 277 291, 1994.
- MENG, Q.; KERLEY, M.S.; LUDDEN, P.A.; BELYEA, R.L. Fermentation Substrate and Dilution Rate Interactto Affect Microbial Growth and Efficiency. **Journal of Animal Science.** v. 77, p. 206-214, 1999.
- MOLINA, L. R.;RODRIGUEZ, N.M.;SOUSA, B. M. de *et al.* Parâmetros de degradabilidade potencial da matéria seca e da proteína bruta das silagens de seis genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) *Moench*), com e sem tanino no grão, avaliados pela técnica *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.222-228, a 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL NRC. 1996. *Nutrient requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy. 242p
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Ruminant nitrogen usage. **Washington: Nacional Acedam of Sciences**, 1985. 138 p.
- NOLAN, J. V. and DOBOS, R. C. Nitrogen Transactions in Ruminants *In:* **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. ed. 2, p. 177-205, 2005.
- NOUSIAINEN, J.; SHINGFIEL, K.J.; HUHTANEN, P. et al. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.2, p.386-398, 2004.
- NUTRIENT, requirements of dairy cattle 7ed. Washington, D.C.; National Academic Press, 381p. 2001.
- OLIVEIRA, M. V. M.; VARGAS JUNIOR, F. M. V.; SANCHEZ, L. M. B. et al. Degradabilidade Ruminal e Digestibilidade Intestinal de Alimentos por intermédio da Técnica *In Situ* Associada a do Saco de Náilon Móvel. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.32, n.6, p. 2023-2031, 2003.

- PEREIRA, E.S.; ARRUDA, A.M.V.; MIRANDA, L.F.; MIZUBUTI, I.Y.; MUNIZ, E.B.; PINTO, A.P. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n.1, p. 125-134, 2005
- REYNAL, S. M.; AND BRODERICK, G. A. Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, 2005.
- RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES, S.C.; CECON, P.R. Eficiência Microbiana, Fluxo de Compostos Nitrogenados no Abomaso, Amônia e Ph Ruminais, em Bovinos Recebendo Dietas Contendo Feno de Capim-Tifton 85 de Diferentes Idades de Rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30(2), p. 581-588, 2001
- RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551–3561, 1992.
- SANNES, R.A.; MESSMAN, M.A.; VAGNONI, D.B. Form of Rumen-Degradable Carbohydrate and Nitrogen on Microbial Protein Synthesis and Protein Efficiency of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 900-908, 2002.
- SANTOS, F.A.P. *et al.* Effects of rumen-undegradabl eprotein on dairy cow performance: a 12-year literature review.**Journal of Dairy Science.** v.81, p.3182-3213, 1998.
- SANTOS, G. T.; CAVALIERI, F. L. B.; MODESTO, L. C. Recentes Avanços em Nitrogênio não Protéico na Nutrição de Vacas Leiteiras. *In:* **2º Simpósio Internacional em Bovinocultura de Leite: Novos conceitos em Nutrição.** Maringá-PR, p. 199-228, 2001.
- SCHADT, I.; HOOVER, W.H.; WEBSTER, T.K.M.; THAYNE, W.V.; LICITRA, G. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. **Journal of Animal Science**. v.77, p. 485-491, 1999.
- SHABI, Z.; ARIELI, A.; BRUCKENTAL, I.; AHARONI, Y.; ZAMWEL, S.; BOR, A.; TAGARI, H. Effect of the Synchronization of the Degradation of Dietary Crude Protein and Organic Matter and Feeding Frequency on Ruminal Fermentation and Flow of Digesta in the Abomasum of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science.** v. 81. p. 1991-2000, 1998.
- SOUZA, M. S.; EZEQUIEL, J. M. B,; ROSSI JUNIOR, P. et al. Efeitos de fontes nitrogenadas com distintas degradabilidades sobre o aproveitamento da fibra, do nitrogênio e do amido em rações para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n. 2002.
- STERN, M.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. New Concepts in Protein Nutrition of Ruminants 21s Annual Southwest Nutrition & Management Conference, p.45-66, 2006.
- ST-PIERRE, N. R. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. **Journal dairy of Science**. v. 84, p. 741–755, 2001.
- TAMMINGA, S.; CHEN, X.B. Animal-based Techniques for the estimation of protein value. Forage Evaluation in ruminant nutrition. Wallingofort: CAB Publishing, 2000 cap. 11, p. 215 232.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1648-1658, 2000.
- TOMÁNKOVÁ, O. and JOPEČNÝ. J. Prediction of feed protein degradation in the rumen with brome lain. **Animal Feed Science and Technology**, v. 53, p. 1-89, 1995.
- VALADARES FILHO, S. Exigências Nutricionais de Gado de Leite. *In:* SIMPOSIO MINEIRO DE NUTRICAO DE GADO DE LEITE. 2002, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte:Escola de Veterinaria, UFMG.
- VALADARES FILHO, S.C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. In: **ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES**, 1995, Viçosa. *Anais...* Viçosa: DZO, p.355-388,1995
- VALADARES FILHO, S.C., COELHO DA SILVA, J.F., LEÃO, M.I. et al. 1990. Eficiência de 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.

- VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D.I. Determination of rumen microbial growth in vitro from 32 P labeled phosphate incorporation. **British Journal of Nutrition**, v. 38, p. 101 114, 1997.
- WALLACE, R. J. Ruminal Microbial Metabolism of Peptides and Amino Acids. *In*: **Altering Ruminal Nitrogen Metabolism to Improve Protein Utilization.** American Institute of Nutrition. 1996.
- WATTIAUX M. A. Metabolismo de proteína em Bovinos de leite *In:* **Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da pecuária Leiteira Internacional**. University of Wisconsin-Madison. 2002.
- WATTIAUX, M.; ARMENTANO, L. O metabolismo de carboidratos em bovinos de leite. **Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira**. Internacional University of Wisconsin-Madison. Disponível em: http://babcock.cals.wisc.edu/spanish/de/html/ch6/nutrition_spn_ch6.html . Acessado> 11/2007
- WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S.E. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. **Appl. Bacteriol.** 70:144–155, 1991
- ZEOULA, L. M. NETO, A. C. M.; KAZAMA, R. et al. *In situ* dry matter degradability and crude protein of concentrates of different energetic. **Acta Scientiarum Animal Sciences** v. 26, n. 02, 2004.
- ZINN, R.A., OWENS, F.N. 1983. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, 56:471-475