

JOÃO CHRYSOSTOMO DE RESENDE JÚNIOR

**COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO
CLEARANCE RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Resende Júnior, João Chrysostomo de
Comparação entre técnicas para a determinação do *Clearance*
ruminal de ácidos graxos voláteis / João Chrysostomo de
Resende Júnior. -- Lavras : UFLA, 2003.
133 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Ácido graxo volátil. 2. *Clearance*. 3. Absorção. 4.
Passagem. 5. Isótopo estável. 6. Taxa fracional. 7. Acidose. 8. Rúmen. 9.
Gado leiteiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.20855

JOÃO CHRYSOSTOMO DE RESENDE JÚNIOR

**COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO
CLEARANCE RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Ronaldo Braga Reis – UFMG

Prof. Dr. Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho – UFLA

Prof. Dr. Clóvis Eduardo Sidnei Corrêa – ReHAgro - Recursos Humanos no Agronegócio Ltda.

Prof. Dr. Euler Rabelo – ReHAgro - Recursos Humanos no Agronegócio Ltda.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira – UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

2003

*Dedico o presente trabalho à minha esposa, Adriana,
aos meus filhos, Mariana e Matheus, e à minha mãe, Zutinha.*

*Uma pessoa pode querer conquistar o Universo, mas
não dará sequer um passo sem o amor e o apoio das pessoas
queridas que a cercam.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que empresta talento ao homem para ser usado em prol do bem-comum.

Ao Prof. Dr. Marcos Neves Pereira, pela dedicação, empenho e competência na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Seerp Tamminga, pela orientação, apoio e amizade durante minha estadia na Holanda.

Ao Dr. Huug Boer e Dr. Jan Dijkstra, pelas valiosas sugestões e apoio logístico durante a fase experimental.

Aos amigos Bart Tas, Hassan Taweel, Harm Smit, Dick Bongers, Wilbert Pellikaan, Truus Post, Toos Lammers e tantos outros, pela grande contribuição operacional dada ao experimento.

A todas as pessoas do Animal Nutrition Group da Universidade de Wageningen, pela amizade, receptividade e ajuda.

Aos amigos Ajay Awati e Robert Tothia, pela convivência intensa e agradável.

A Ana Viveiros e seus familiares e também a Sandra Rodrigues, pela amizade e apoio no campo profissional e pessoal.

A todas as outras famílias brasileiras que proporcionaram à minha família uma estadia agradável em Wageningen.

Aos amigos e colegas Henrique Resende e Luciano Alonso, pelo incentivo e ajuda operacional na realização deste trabalho.

A todos os meus familiares e familiares de minha esposa, pelo incentivo e apoio à perseguição do objetivo.

Agradecer à minha esposa, Adriana, e aos meus filhos, Mariana e Matheus, não seria possível, diante da tamanha contribuição e dos sacrifícios aos quais foram submetidos. Só me resta retribuir a eles o melhor de mim.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Ácidos graxos voláteis no ruminoretículo	3
2.2 Formação de AGV no ruminoretículo	5
2.3 Interconversões envolvendo AGV	11
2.4 Clearance de AGV no ruminoretículo	14
2.4.1 Transporte e metabolização de AGV no epitélio ruminal.....	15
2.4.2 Mensuração das taxas fracionais de clearance de AGV do ruminoretículo	32
2.4.2.1 Coleta de sangue na veia porta e suas tributárias	32
2.4.2.2 Infusões intraruminais de soluções de AGV em rúmen sem digesta.....	37
2.4.2.3 Infusão contínua de AGV em rúmen de animais consumindo alimentos	46
2.4.2.3.1 Considerações sobre isótopos de carbono	46
2.4.2.3.1.1 Potencialidades do uso de isótopos em pesquisas.....	52
2.4.2.3.2 Infusão contínua de isótopo radioativo como marcador	59
2.4.2.3.3 Infusão contínua de isótopo estável como marcador	63
2.4.2.4 Infusão única de marcadores e checagem do seu desaparecimento ao longo do tempo	76
2.4.2.4.1 Infusão única de AGV marcado com ¹³ C associado a um marcador de passagem de fluido.....	76

2.4.2.4.2 Infusão única de valerato não-marcado associado a um marcador de passagem de fluido.....	77
2.4.3 Aspectos relacionados à passagem de AGV para compartimentos distais ao ruminoretículo.....	81
3 HIPÓTESE	84
4 MATERIAL E MÉTODOS	85
4.1 Experimento um.....	85
4.2 Experimento dois	95
4.3 Análises estatísticas.....	96
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÃO	121
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

RESUMO

RESENDE JÚNIOR, João Chrysostomo de. **Comparação entre técnicas para a determinação do *clearance* ruminal de ácidos graxos voláteis**. 2003. 133 p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

A remoção (*clearance*) de ácidos graxos voláteis (AGV) do rúmen ocorre por absorção pela parede do órgão ou por passagem com a fase fluida ruminal para o omaso. Conduziu-se este trabalho com o objetivo de comparar mensurações de taxas fracionais de *clearance* de AGV obtidas pela técnica Hval/Co com valores obtidos com AGV marcados com ^{13}C . A técnica do ^{13}C utilizou a queda exponencial ao longo do tempo na relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, após infusão no rúmen de ^{13}C -acetato, ^{13}C -propionato ou ^{13}C -butirato. A técnica Hval/Co foi baseada na queda exponencial na concentração ruminal de valerato, após pulso de 300 gramas no rúmen. Trinta gramas de Co-EDTA foram introduzidos no rúmen simultaneamente aos marcadores e a taxa fracional de desaparecimento do Co foi assumida como sendo representativa do *clearance* ruminal de AGV por passagem com a fase fluida. Cada um dos três AGV marcados e o valerato foram misturados ao conteúdo ruminal evacuado de seis vacas Holandesas, em 2 Quadrados Latinos 3x3. O desaparecimento por passagem com a fase fluida para o omaso representou cerca de 50% do *clearance* total, mostrando que o *clearance* por passagem foi proporcionalmente tão importante quanto o *clearance* por absorção pela parede do rúmen. As taxas fracionais de *clearance* não foram afetadas pelo tamanho da cadeia de carbono do AGV infundido ($P>0,21$ para o efeito de tipo de AGV). As taxas fracionais de absorção foram diferentes entre os tipos de AGV ($P<0,03$) sendo mais alta para o propionato do que para o butirato. Os coeficientes de determinação das regressões lineares utilizando a taxa fracional de *clearance* de valerato como estimador das taxas fracionais de *clearance* de acetato, propionato e butirato foram 0,51; 0,56 e 0,99, respectivamente. A taxa fracional de *clearance* de todos os AGV foi em torno de 30% h^{-1} e a de absorção variou de 14 a 19% h^{-1} , conforme o tipo de AGV. Em um segundo experimento, a estimativa da taxa fracional de *clearance* de ^{13}C -valerato foi similar à estimativa obtida com valerato não marcado pela técnica Hval/Co. Esses dados foram obtidos em 6 vacas nas quais o desaparecimento desse AGV foi mensurado simultaneamente pelas duas técnicas. Não houve aumento no enriquecimento de ^{13}C dos microorganismos ruminais quatro horas após a infusão intraruminal de valerato marcado. A estimativa da taxa fracional de absorção de AGV pela parede do rúmen obtida pela técnica de isótopos estáveis foi similar à obtida pela técnica Hval/Co; no

entanto ambas foram inferiores às estimativas da literatura geradas por outras metodologias.

Comitê Orientador: Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Prof. Seerp Tamminga – Universidade de Wageningen, Prof. Ronaldo Braga Reis – UFMG, Prof. José Camisão de Souza – UFLA, Prof^a. Lisete Chamma Davide – UFLA.

ABSTRACT

RESENDE JÚNIOR, João Chrysostomo de. **Comparison between techniques for determination of volatile fatty acids ruminal clearance.** 2003.133 p. Thesis (Doctor Program in Animal Science)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Removal (clearance) of volatile fatty acids (VFA) from rumen occurs by rumen wall absorption or by passage to omasum incorporated to ruminal the liquid phase. The objective was to compare measurements of clearance fractional rates obtained by the Hval-Co technique with measurements obtained from ^{13}C labeled VFA. The exponential drop of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ proportion after ^{13}C -Acetate, ^{13}C -Propionate or ^{13}C -Butyrate rumen infusion was used for clearance determination for the ^{13}C technique. The Hval-Co technique was based on exponential drop of ruminal valerate concentration after addition of 300 grams of valerate to ruminal content. Thirty grams of Co-EDTA was mixed to ruminal content in addition to other markers and the fractional rate of cobalt clearance was assumed as VFA ruminal clearance by passage with liquid phase. Each labeled VFA and unlabeled valerate was mixed to evacuated ruminal content of six Holstein-Friesian cows in two 3X3 latin square design. VFA clearance by passage to omasum incorporated to the liquid phase was about 50% from the total clearance, demonstrating that clearance by passage is as important as clearance by rumen wall absorption. Clearance fractional rates were not affected by infused VFA chain length ($P>0,21$ for VFA type effect). Absorption fractional rates were different among VFA ($P<0,03$) and propionate had absorption fractional rate higher than butyrate. Linear regression determination coefficients using valerate clearance fractional rate as estimator for acetate, propionate and butyrate ruminal clearance were 0,51, 0,56, and 0,99, respectively. Clearance fractional rate of all VFA was about 30% h^{-1} . Absorption fractional rate ranged from 14 to 19% h^{-1} according to VFA type. In a second experiment, the ^{13}C -Valerate clearance fractional rate estimative of was similar to that obtained from unlabeled valerate by the Hval-Co technique.

These data were obtained from six cows in which VFA clearance was measured by both techniques, simultaneously. There was no ruminal microbial ^{13}C enrichment four hours after ^{13}C -Valerate intraruminal infusion. VFA absorption fractional rate estimates obtained from the stable isotopes technique was similar to that obtained from Hval-Co technique, although both of them had been lower than estimates reported in the literature by other methods.

Graduate Committee: Marcos Neves Pereira– UFLA (Major Professor), Seerp Tamminga –Wageningen University, Ronaldo Braga Reis – UFMG, José Camisão de Souza – UFLA, Lisete Chamma Davide – UFLA

INTRODUÇÃO

A digestão de carboidratos, como a celulose e a hemicelulose, não pode ser feita por enzimas oriundas de mamíferos (Van Soest, 1994), exigindo um processo que envolve a colonização do trato gastro-intestinal por microorganismos simbióticos (Stevens & Hume, 1998). Os ácidos graxos voláteis¹ (AGV) produzidos no trato gastrointestinal como subprodutos do metabolismo microbiano de nutrientes podem prover até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes (Bergman, 1990). A remoção (*clearance*) desses AGV do ruminoretículo² ocorre por dois processos: absorção pela parede do órgão e passagem com a fase fluida ruminal pelo óstio retículo-omasal (Peters et al., 1990). Se a taxa de produção de AGV excede a taxa de *clearance*, haverá acúmulo desses dentro do ruminoretículo, podendo abaixar excessivamente o pH da digesta e desencadear o distúrbio metabólico conhecido como acidose ruminal (Barker et al., 1995). Essa pode ter efeitos negativos sobre o desempenho e a saúde dos animais, provocando efeitos deletérios sobre a ingestão de alimentos (Elliot et al., 1995), a degradação ruminal da fibra (Grant & Mertens, 1992), a motilidade do rúmen (Crichlow & Chaplin, 1985; Leek & Harding, 1975) e a morfologia da parede ruminal (Gabel et al., 2002).

¹ A palavra volátil foi usada porque esses ácidos eram medidos por destilação, após acidificação do conteúdo intestinal. Como essa técnica de mensuração foi substituída pela cromatografia gás-líquida, alguns autores estão substituindo essa terminologia por ácidos graxos de cadeia curta (Wrong, 1995).

² Não existe barreira anatômica consistente entre o rúmen e o retículo, as duas primeiras câmaras do estômago de ruminantes (Nickel et al., 1981). Sendo assim a digesta está constantemente circulando entre esses dois compartimentos devido à motilidade visceral e é razoável que sejam considerados como uma só câmara, denominada ruminoretículo.

Para o estudo e controle da acidose ruminal, são necessárias técnicas capazes de mensurar a capacidade de *clearance* ruminal de AGV, tanto por passagem com a digesta quanto por absorção pela parede ruminal. Para determinar a taxa de absorção, diversas técnicas têm sido utilizadas, como a coleta de sangue na veia porta e ou suas tributárias visando mensurar o aparecimento sanguíneo de AGV (Huntington et al., 1983), a infusão intraruminal de AGV marcado com isótopos radioativos (Rowe, et al., 1979) ou isótopos estáveis (Kristensen, 2001; Nozière et al., 2000), a evacuação ruminal e introdução de uma solução de AGV no saco ventral do rúmen (Dijkstra et al., 1993) ou a infusão contínua de AGV não marcado em rúmen não-evacuado (Peters et al., 1990). A mensuração do aparecimento portal dos AGV como medida de taxa de absorção encontra restrições devido à metabolização dos AGV pela parede do rúmen (Kristensen, 2001; Gabel, 1995; Bergman, 1990). Mensurações que utilizam radioisótopos são de alto custo e oferecem riscos à saúde humana e ao ambiente (Analysis, 2002). A utilização de isótopos estáveis apresenta grande potencial, mas o aparato tecnológico e o custo da técnica pode ser limitante nas pesquisas (Analysis, 2002). As técnicas que envolvem esvaziamento ruminal geram estimativas de absorção em animais com ausência de digesta, uma condição fisiológica atípica, além de não fornecerem informação sobre o desaparecimento de AGV por passagem.

A técnica que utiliza isótopos estáveis de carbono como marcador é baseada no princípio de que o AGV marcado com carbono treze (^{13}C -AGV) se comportará de maneira semelhante ao AGV, com predominância de ^{12}C , e ambos desaparecerão do rúmen similarmente por absorção e passagem com a fase fluida. A constante matemática que descreve a queda exponencial na relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no conteúdo ruminal é uma estimativa da velocidade de desaparecimento de AGV, a taxa fracional de *clearance* (Chen et al., 1997).

Uma técnica alternativa (Hval-Co) para mensurar o *clearance* ruminal de AGV é baseada na utilização de valerato como marcador (Allen et al., 2000). O valerato é um dos AGV produzidos naturalmente no ambiente ruminal (Gray et al., 1952). Trata-se de um ácido carboxílico de cinco carbonos, presente em baixas concentrações na digesta e que parece não ser significativamente metabolizado pelos microorganismos ruminais (Allen et al., 2000). A técnica é baseada na mensuração por cromatografia gás líquida da concentração ruminal de valerato ao longo do tempo, após infusão em dose única no rúmen, sendo a taxa fracional de *clearance* corrigida para a taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal (Allen et al., 2000). As vantagens dessa técnica são o baixo custo, a simplicidade operacional, a baixa invasividade e a possibilidade de mensurar as taxas fracionais de *clearance* de AGV por passagem e absorção em animais com ingestão normal de alimentos.

Realizou-se esse trabalho com o objetivo de comparar mensurações de taxas fracionais de *clearance* de AGV, absorção pela parede e passagem com a fase fluida para o omaso obtidas pelo método Hval-Co com valores obtidos utilizando AGV marcados com ¹³C. Outro objetivo foi obter estimativas da taxa fracional de *clearance* e absorção de acetato, propionato e butirato, baseando-se em dados obtidos pela técnica Hval-Co.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácidos graxos voláteis no ruminoretículo

Os AGV, principalmente acetato, propionato e butirato, mas também em menor quantidade, valerato, caproato, isobutirato, metilbutirato, 2-metilbutirato e traços de outros ácidos de cadeia mais longa, são produzidos no

ruminoretículo como alguns dos produtos resultantes da atividade microbiana sobre a matéria orgânica (France & Siddons, 1993). Durante o processo de fermentação¹, a energia é conservada na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e subseqüentemente utilizada para manutenção e crescimento da população microbiana do rúmen. Para os microorganismos ruminais, os AGV são substância de descarte, mas para o hospedeiro, eles representam a maior fonte de energia absorvida. Na maioria das dietas, 80% da energia utilizada no rúmen propiciam a produção de AGV, sendo o restante perdido como calor e metano. Além disso, os AGV produzidos no trato gastro-intestinal podem representar até 80% da energia metabolizável disponível para o ruminante (Bergman, 1990).

Pesquisas que envolvem AGV são realizadas há bastante tempo e já em 1884 Tappeiner, citado por Gray et al. (1952), constatou a presença de ácido fórmico, acético, propiônico e butírico no fluido ruminal. Em 1934, Mangold, também citado por Gray et al. (1952), relatou a existência de menores quantidades de ácidos saturados de cadeia mais longa. Em 1946, foi utilizada a técnica cromatográfica para separação de AGV. O ácido acético, propiônico e butírico foram estabelecidos como os principais componentes da mistura de ácidos graxos no fluido ruminal de carneiros e outros ruminantes. Foi cogitado ainda que a fração de ácido butírico continha outros ácidos de cadeia mais longa e que o ácido fórmico não era um componente da mistura (Elsden, 1946, citado por Gray et al., 1952). Utilizando conteúdo ruminal de carneiro, *incubado in vitro*, Gray et al. (1952) estabeleceram a presença de ácido fórmico (0-5%), acético (62-70%), propiônico (16-27%), butírico (6-11%), isobutírico (0,3-

¹Fermentação é um termo geral que denota a degradação anaeróbica da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para os diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (Lehninger et al., 1995). Os microorganismos ruminais geram energia pela fermentação, a qual é ligada à uma pequena cadeia de respiração anaeróbica, envolvendo reações do ciclo do ácido tricarboxílico, produzindo mais ATP (Vorobieva, 2000).

0,6%), valérico (1,6-3,2%), caprótico (0,5-1%) e provavelmente enantico¹ (0,04-0,05%).

2.2 Formação de AGV no ruminoretículo

Os carboidratos dietéticos, isto é, celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares solúveis são os principais substratos da fermentação. Eles são degradados para seus constituintes de hexoses e pentoses antes de serem fermentados para AGV via piruvato. As pentoses são convertidas para hexoses e trioses fosfato pelas reações das transcetolases e transaldolases do ciclo das pentoses, propiciando, então, que a maioria do metabolismo de carboidratos ocorra via hexoses, as quais são metabolizadas até piruvato quase exclusivamente pela via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas. A acetil CoA é um intermediário na formação de acetato e butirato a partir de piruvato, enquanto a formação de propionato ocorre principalmente via succinato, embora haja uma rota alternativa envolvendo acrilato. A sobra energética gerada durante a conversão de hexose para acetato ou butirato é utilizada, em parte, durante a formação de propionato, mas principalmente é convertida a metano. Resumidamente, as principais reações são as seguintes: uma molécula de hexose é transformada em duas moléculas de piruvato, liberando quatro H no processo. Para gerar uma molécula de acetato, a molécula de piruvato libera um CO₂ e dois H. Para formar butirato, são necessárias duas moléculas de piruvato e dois CO₂ são liberados no processo. Quando uma molécula de piruvato reage com quatro H, há a formação de uma molécula de propionato e uma H₂O. Uma molécula de CO₂ reagindo com oito H forma uma molécula de metano e duas H₂O (France & Siddons, 1993).

¹ Ácido heptanóico – C₆H₁₃COOH

Além dos carboidratos dietéticos, as proteínas e parcialmente os lipídios podem gerar AGV no rúmen. A contribuição de lipídios é muito pequena, porque somente a porção carboidrato, isto é, glicerol e galactose gerados a partir da hidrólise de lipídios, é fermentada, o que não ocorre com os ácidos graxos de cadeia longa. As proteínas, entretanto, podem ser uma fonte significativa de AGV quando as dietas têm alto teor de proteína degradável no rúmen. As proteínas são hidrolisadas para aminoácidos, os quais são desaminados antes da conversão para AGV. A partir dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, são formados os AGV isobutírico, 3-metilbutírico, e 2-metilbutírico, respectivamente. Esses AGV de cadeia ramificada representam fatores de crescimento essenciais para certas espécies de bactérias no rúmen (Cotta & Hespell, 1986).

A concentração de AGV no rúmen, a qualquer tempo, reflete o balanço entre a taxa de produção e a taxa de desaparecimento. Após a alimentação, a produção excede o desaparecimento e a concentração aumenta, porém, subseqüentemente, a situação é revertida e a concentração diminui. A concentração total de AGV pode cair abaixo de 30mM ou estar acima de 200 mM, mas está normalmente entre 70 e 130 mM (France & Siddons, 1993).

O padrão de fermentação é determinado pela composição da população microbiana, a qual é determinada pela dieta basal, particularmente pelo tipo de carboidrato dietético. Dietas baseadas em forragem, apresentando altos teores de fibra, estimulam o crescimento de espécies de bactérias produtoras de acetato e a proporção molar entre acetato : propionato : butirato estará em torno de 70 : 20 : 10, enquanto dietas com concentrados, ricas em amido, propiciam o desenvolvimento de bactérias produtoras de propionato e estão associadas com um aumento na proporção de propionato em detrimento do acetato, embora acetato seja sempre o mais abundante dos AGV. Sob certas condições, dietas concentradas podem estimular o desenvolvimento de uma grande população

microbiana e é acompanhado de aumento na proporção de butirato ao invés de propionato. Outros fatores podem também afetar o padrão de fermentação como a forma física da dieta, o nível de consumo, a frequência de alimentação e o uso de aditivos químicos (France & Siddons, 1993).

Peters et al. (1989) examinaram os fatores que afetam a produção de AGV por bactérias ruminais *in vitro*. Como doadores de fluido ruminal, utilizaram 4 novilhos de corte consumindo, uma vez ao dia, dieta contendo 41% de concentrado à base de milho e 59% de forragem. O fluido ruminal foi coletado 1,5 hora após a refeição e incubado anaerobicamente. Os tratamentos consistiram de alto e baixo pH inicial (6,7 e 5,7), osmolaridade (600 e 400 mOsmol) e concentrações de ácido acético (40 mM) ou propiônico (20 mM). As variáveis respostas mensuradas foram a produção de ácido acético, propiônico, AGV totais, produção de gás total e de metano. O pH inicial afetou a maioria das variáveis, independentemente ou em combinação com um ou mais dos outros fatores. A produção de ácido acético caiu 40% quando as concentrações iniciais de ácido acético foram 40 mM, comparadas com 0 mM. O pH inicial mais baixo refletiu em menor produção de ácido acético e o pH mais alto foi associado a maior produção de AGV total. A produção de ácido propiônico foi maior quando a osmolalidade foi mais baixa, embora a magnitude dessa diferença tenha dependido do pH inicial. Em baixo pH inicial, entretanto, nenhuma diferença foi observada devido à osmolalidade inicial, ao passo que em alto pH, a produção foi mais alta, para baixa do que para alta osmolalidade inicial. A menor produção de AGV totais em pH 5,7 ocorreu primariamente devido à produção reduzida de ácido acético, embora tenha sido detectado aumento na produção de ácido propiônico e butírico. A produção de gás total foi maior em alto do que em baixo pH; entretanto, a diferença foi maior em baixa do que em alta concentração inicial de propionato. A influência

mais marcante nos produtos oriundos da fermentação microbiana foi exercida pelo pH, embora outros fatores tenham tido importância relevante.

Outro bom trabalho relacionado ao padrão de fermentação ruminal determinado pelo substrato e população microbiana no rúmen foi realizado por Russell (1998), que investigou a importância do pH na regulação da proporção acetato : propionato e produção de metano, *in vitro*. Vacas fistuladas, não lactantes, foram alimentadas com dietas contendo 100% de forragem ou contendo 90% de grãos de cereais e 10% de forragem em quantidade suficiente para suprir as necessidades recomendadas pelo NRC. Os animais foram alimentados a cada duas horas para permitir uma situação de *steady state*. Os animais foram alimentados com cada dieta por aproximadamente três semanas antes de se coletar as amostras. Amostra do conteúdo ruminal (um litro) foi coletada do saco ventral e cranial do rúmen e teve seu pH determinado imediatamente. As partículas de alimento e protozoários foram removidos por centrifugação baixa e as bactérias foram isoladas por centrifugação alta. Aproximadamente 90% do fluido ruminal livre de células foram removidos. O meio de incubação, contendo vários nutrientes, foi saturado com CO₂, o pH foi ajustado pela adição gradativa de HCl concentrado e os substratos adicionados foram feno ou milho moído. Após colocado em tubos, o meio de incubação recebeu injeção de bactérias oriundas de vacas submetidas a cada uma das duas dietas, e foi mantido por 48 h a 39°C.

As vacas que foram alimentadas com 90% de concentrados tiveram pH mais baixo, AGV totais mais altos e proporção acetato : propionato mais baixa do que as vacas que foram alimentadas exclusivamente com forragem. A diminuição na relação acetato : propionato foi causada por um aumento no propionato e não houve efeito da dieta na concentração ruminal de acetato. A

adição de tricarbálico¹ de sódio não causou aumento detectável nos AGV totais, mas foi capaz de levar à diminuição do pH quando o substrato foi adicionado. O pH final foi menos que 0,3 unidade mais baixo do que o pH inicial, quando a concentração de feno foi menor do que 10 g l⁻¹ ou milho moído foi menor do que 5 g l⁻¹. O milho moído foi fermentado mais extensivamente do que o feno e a concentração dos AGV totais foram aproximadamente seis e três mmol/g de MS, respectivamente, quando o pH final foi 6,5. Quando o pH final foi diminuído com HCl, o total de AGV produzidos a partir de feno diminuiu em cerca de duas vezes e o tipo de inóculo (oriundos de vacas que ingeriram forragem ou concentrado) não teve efeito na concentração final de AGV, reforçando a premissa de que bactérias celulolíticas não conseguem se adaptar facilmente a baixo pH. As culturas que tiveram milho moído como substrato foram menos sensíveis à redução no pH do que o feno, mas apenas quando foi usado o inóculo oriundo de vacas que ingeriram concentrados. Bactérias desse inóculo produziram quase a mesma quantidade de AGV em pH 5,2 e em pH 6,5 (Russell, 1998).

Quando o milho moído foi incubado com bactérias oriundas de vacas alimentadas com forragem, a diminuição na produção total de AGV foi maior do que três vezes, mas o efeito foi dependente do pH, sendo a produção fortemente inibida em pH menor do que 5,5. Esses resultados indicam que algumas, mas nem todas, as bactérias fermentadoras de amido podem adaptar-se a baixo pH. Quando as bactérias obtidas de vacas alimentadas com forragem foram incubadas com feno, a relação acetato : propionato foi mais alta do que quando as bactérias oriundas de vacas alimentadas com concentrados foram incubadas com feno. Entretanto, a redução no pH causou diminuição

¹ O tricarbálico é um produto da fermentação microbiana ruminal, não metabolizável, formado a partir do aconitato, que é um intermediário do ciclo do ácido cítrico (Wolffram et al., 1993).

semelhante na relação acetato : propionato para ambos os tipos de inóculo. A relação acetato : propionato com substrato de milho moído foi mais baixa do que com feno. Uma diminuição no pH (6,5 para 5,5) causou um declínio na relação acetato : propionato. Quando o pH final foi menor do que 5,3, a relação acetato : propionato do meio incubado com milho moído aumentou dramaticamente e foi tão alta quanto no meio de incubação em que havia feno como substrato, indicando que as bactérias ruminais produtoras de propionato podem ser mais sensíveis a pH baixo do que algumas bactérias que produzem acetato e H₂. As mudanças na produção de CH₄ refletiram as mudanças na relação acetato : propionato quando o pH foi maior do 5,5, mas o efeito do inóculo não foi significativo, sendo esse resultado confirmatório da competitividade entre a produção de propionato e metano . Não houve acúmulo de H₂ até o pH final baixar de 5,5, e feno como substrato não produziu, em momento algum, aumento maior do que 0,02 mmol de H₂/mmol de AGV. Quando o pH do meio de cultura que tinha milho moído como substrato foi menor do que 5,3, uma grande quantidade de H₂ foi detectada, sugerindo que quando o pH abaixa, deve haver uma diminuição na metanogênese e não apenas um aumento na produção de propionato. É provável que muitas bactérias fermentadoras de amido prefiram produzir propionato, e o H₂ poderia não estar disponível para a produção de metano, em pH não muito baixo, uma vez que H₂ não foi detectado até que o pH baixasse de 5,5. A diminuição na relação acetato : propionato quando o substrato foi feno, a qual foi dependente do pH, causou uma diminuição no acetato. A relação acetato : propionato do milho moído diminuiu apenas seis décimos quando o pH variou de 6,5 para 5,3 e o pH não afetou a produção de acetato ou propionato. Em pH menor do que 5,3, a taxa de acetato : propionato aumentou de sete a oito vezes. A produção de butirato com feno aumentou quando o pH foi reduzido, mas o butirato sempre representou menos de 25% dos AGV totais. A produção de butirato no substrato de milho

moído também foi mais alta quando o pH foi mais baixo, mas o erro experimental foi algumas vezes muito alto (Russell, 1998).

2.3 Interconversões envolvendo AGV

A interconversão entre os diversos AGV produzidos no ruminoretículo é conhecida há muito tempo. Já no início da década de 50, Gray et al. (1952) estudaram a incorporação de ácido acético e propiônico marcados com ^{14}C na fermentação ruminal *in vitro*. Quando o ^{14}C acetato foi adicionado ao fluido ruminal de carneiro, incubado *in vitro*, a média de atividade molar do ^{14}C no pool de butirato foi de 90% em relação àquela atividade no pool de acetato. Para o pool de valerato, o valor dessa atividade molar foi de 49% e para o de propionato o valor médio foi de 13%. Quando o ^{14}C propionato foi adicionado ao inóculo, não se encontrou atividade molar do ^{14}C no acetato e nem no butirato, mas cerca de 40% foram encontrados no valerato. Os autores concluíram que grande parte dos ácidos butírico e valérico poderiam ser formados a partir de ácidos de cadeia mais curta, valendo-se de rotas metabólicas utilizadas por certos microrganismos ruminais.

Os primeiros experimentos freqüentemente usaram compostos nos quais os carbonos não foram marcados uniformemente. Presumivelmente isso não afetou a estimativa de conversão de acetato para butirato, porque essa conversão envolve condensação de duas moléculas de acetato sem perda de carbono e com carbono igualmente distribuído na molécula de butirato. A conversão de butirato para acetato pode ser mais complexa, porque os carbonos um e dois do butirato formam acetato, ao passo que os carbonos três e quatro formam acetil-CoA. Como a maioria dos experimentos de interconversão de butirato para acetato tem sido determinados com marcação no carbono um ou dois, essa

interconversão pode estar sendo superestimada, uma vez que acetil-CoA pode vir a ser convertido novamente em butirato (Armentano, 1982) .

Bergman et al. (1965) publicaram um dos primeiros estudos usando diluição de isótopos para medir produção e interconversão de AGV *in vivo*. Dois carneiros foram alimentados em intervalos de uma hora para permitir condições de *steady state*. Três diferentes infusões contínuas foram conduzidas usando-se [1-¹⁴C] acetato, [1-¹⁴C] butirato e [2-¹⁴C] propionato, e todos os três pools de AGV foram amostrados simultaneamente. Pouco ¹⁴C introduzido marcando propionato foi encontrado no pool de butirato, o mesmo acontecendo com o ¹⁴C introduzido marcando butirato encontrado no pool de propionato. Os autores então assumiram que a interconversão direta entre propionato e butirato foi irrelevante. Cerca de 61% do carbono introduzido marcando acetato foram encontrados no pool de butirato e 20% do carbono introduzido marcando butirato foram encontrados no pool de acetato, demonstrando considerável interconversão entre acetato e butirato.

Armentano & Young (1983), trabalhando com novilhos holandeses castrados alimentados com 70% de feno de alfafa e concentrado à base de milho, utilizaram a técnica de diluição de radioisótopos para determinar o efeito da suplementação de monensina nas taxas de produção e interconversão de acetato, propionato e butirato ruminais e acetato plasmático. Além disso, um método cinético geral para solução de sistemas abertos foi aplicado para quantificar o metabolismo de AGV ruminais e da glicose e produção de CO₂. Foram realizadas infusões intraruminais únicas de [1-¹⁴C]propionato, [U-¹⁴C]acetato, [U-¹⁴C]butirato e uma infusão intravenosa contínua de [U-¹⁴C]acetato. A porcentagem molar de propionato tendeu a aumentar em resposta à monensina. Comparado com outros experimentos com o mesmo tipo de animal, houve um aumento de 2,5% na proporção molar de propionato. A transferência de carbono entre o pool de acetato e propionato, seja diretamente

ou via CO₂ do sangue, foi desprezível. Em resposta à monensina, a taxa de produção de propionato aumentou em 3,4 mol de carbono por dia, e a taxa de produção de acetato diminuiu em 4,2 mol de carbono por dia. O total de hexose fermentada foi calculada com base na produção de AGV e foi 7,3 mol por dia e 7,2 mol por dia na dieta-controle e na dieta contendo monensina, respectivamente. A produção de CO₂ no rúmen foi 7,4 mol/dia para a dieta-controle e 7,7 mol por dia nos animais ingerindo monensina. A produção de metano calculada por balanço estequiométrico foi 4,8 mol/dia na dieta controle e 3,8 mol/dia na dieta contendo monensina. A porcentagem de acetato ruminal derivada do acetato plasmático foi $7,1 \pm 1,5\%$, indicando que existe fluxo, talvez direto do acetato plasmático para o acetato ruminal. Em um outro ensaio do mesmo experimento, os autores observaram que a transferência de carbono da glicose plasmática para os AGV intraruminais e do propionato para o butirato ruminais foi zero. A transferência de carbono do CO₂ sangüíneo para o butirato e acetato ruminais, bem como o fluxo entre acetato ruminal e propionato foram muito pequenos. A conversão de propionato para glicose representou cerca de 1/3 do propionato produzido. A maioria do propionato restante foi oxidado para CO₂. A produção total de glicose foi de 13,5 mol de carbono por dia. Corrigido para a descarboxilação do oxaloacetato, o fluxo de propionato para glicose foi de 3,4 mol de carbono por dia ou 25% da glicose produzida. Baseado nesse experimento, estimou-se que 27% da produção de glicose foi derivada de CO₂, acetato e butirato. Levando em conta esse e outros experimentos, tem-se encontrado de 25 a 32% da glicose oriunda de propionato, o que indica que uma grande fração de glicose tem que ser formada a partir de outras fontes, principalmente a partir de aminoácidos glicogênicos. Os AGV ruminais e a glicose plasmática sistêmica foram responsáveis por 35% da produção de CO₂. O aparecimento de acetato plasmático foi, em média, 68 moles de carbono por dia, dos quais apenas 19 moles foram produzidos no rúmen. Outras fontes

líquidas de acetato endógeno poderiam incluir a fermentação no intestino grosso, as proteínas e gorduras dietéticas e alguma glicose absorvida, retirada da primeira passagem pelo fígado (Armentano & Young, 1983).

2.4 Clearance de AGV no ruminoretículo

A concentração total de AGV no rúmen é relacionada com a taxa de fermentação, mas reflete também outros fatores, como a remoção por absorção, passagem e utilização dos AGV pelos microorganismos ruminais (Wheaton et al., 1970).

Os AGV produzidos no rúmen desaparecem por absorção pela parede do órgão ou por passagem, juntamente com a fase fluida para os compartimentos distais. Esse processo de desaparecimento envolvendo absorção e passagem é denominado *clearance* ruminal de AGV. A absorção através da parede do rúmen ocorre por difusão simples dos ácidos na forma protonada (Sehested et al., 1999a; Dijkstra et al., 1993), mas os AGV na forma aniônica também podem ser absorvidos, provavelmente devido a um mecanismo de troca iônica envolvendo Cl^- e HCO_3^- (Kramer et al., 1996; Gabel et al., 2001). É um processo dependente de concentração, portanto, normalmente mais alto para acetato do que para propionato e mais baixo para butirato, mas, por unidade de concentração, as taxas de absorção são similares em pH fisiológico do rúmen (Dijkstra et al., 1993.). Como os valores do pK_a dos ácidos são mais baixos do que o pH do conteúdo ruminal (Fukushima, 1995), eles estão presentes majoritariamente na forma aniônica. Queda no pH ruminal é associada a um aumento na proporção das formas protonadas e na taxa de absorção.

A passagem de AGV para os compartimentos distais está relacionada à passagem da fase líquida ruminal, uma vez que os AGV estão dispersos nessa

fase. A taxa de passagem de fluido é positivamente relacionada à motilidade do ruminoretículo e da quantidade total de AGV que passa; a maioria parece ser absorvida no omaso (Rupp et al., 1994).

2.4.1 Transporte e metabolização de AGV no epitélio ruminal

Gabel (1995) revisou a literatura a respeito do transporte de AGV no ruminoretículo. A função absorptiva desse órgão não é restrita a AGV. O sódio, cloro, magnésio e amônia ou uréia são transferidos do conteúdo do ruminoretículo para o sangue e a secreção de bicarbonato já foi demonstrada. Existem fortes indicativos de que o processo de transporte desses solutos são influenciados pelos AGV. O cálcio e o potássio também podem ser absorvidos no pró-ventrículo, mas nenhuma inter-relação entre esses elementos e os AGV foram demonstradas até o momento.

Em animais alimentados regularmente, os AGV são os ânions presentes em maiores quantidades no conteúdo do ruminoretículo. As concentrações de AGV total e individual são altamente variáveis, dependendo do tempo após alimentação e do tipo de dieta. A concentração total no ruminoretículo varia de 60-160 mM, sendo 40 a 75% acetato, 17 a 47% propionato e 7 a 18% butirato. A concentração de AGV no sangue portal normalmente é mais baixa do que 3,5 mM; portanto, há um grande gradiente de concentração levando à transferência de AGV do lúmen para o sangue em um processo de difusão passiva (Gabel, 1995).

Pelo fato de os AGV serem ácidos fracos com $pK \leq 4,8$ e pH do conteúdo ruminal dificilmente ser menor do que 5,8, a maioria dos AGV está presente no rúmen na forma dissociada ou ionizada. Para esclarecer se os AGV são absorvidos em sua forma não ionizada (HAGV) ou ionizada (AGV), vários

investigadores têm testado a influência do pH na taxa de absorção dos AGV. Parece haver maior permeabilidade da parede do órgão à forma não ionizada dos AGV, mas estudos têm indicado que a taxa de absorção não é determinada primariamente pela concentração de formas ionizadas e não ionizadas. A alta ou baixa concentração de AGV independentemente de sua forma iônica parece ser mais determinante de absorção (Gabel, 1995).

Os AGV são principalmente absorvidos na forma ionizada lipossolúvel; então, a absorção deveria ser correlacionada com sua habilidade para transpor a membrana lipídica. Foi demonstrado que a permeabilidade lipídica do propionato é 5,1 vezes maior do que do acetato, e a permeabilidade do butirato é cerca de 2,7 vezes à do propionato. As taxas de absorção, entretanto, apesar de obedecerem à mesma ordem absoluta (acetato < propionato < butirato), diferem em magnitude quando comparadas com a solubilidade lipídica. Em soluções com pH fisiológico, o *clearance* de propionato é 1,11 a 1,41 vezes o de acetato, e o *clearance* de butirato é, no máximo 1,35 vez o do propionato. Isto indica que a absorção não é primariamente determinada pela solubilidade lipídica (Gabel, 1995).

Existem evidências de um extenso metabolismo de AGV pelo epitélio ruminal. Mais de 90% do butirato que entra no epitélio é metabolizado por ele, sendo transformado em corpos cetônicos e dióxido de carbono. Acima de 50% do propionato é metabolizado pelo epitélio do rúmen, gerando lactato, dióxido de carbono e aminoácidos. O metabolismo de acetato no epitélio ruminal de carneiro foi estimado em mais de 30%. Portanto, a taxa metabólica relativa parece aumentar na mesma ordem que a taxa de *clearance*, isto é, butirato>propionato>acetato. Além do mais, tem sido demonstrado que as taxas de absorção dependem da atividade metabólica do epitélio. Tecidos em estado de anóxia que causa inibição do metabolismo tiveram a absorção líquida de AGV diminuída. Portanto, as diferenças nas taxas de absorção relacionadas ao

tamanho da cadeia dos AGV podem ser devidas ao fato de que os três principais ácidos são metabolizados em diferentes extensões e que esse metabolismo influencia a absorção. Com base nesses fatos, parece que o efeito do pH e do tamanho da cadeia dos AGV são muito menores do que o esperado e podem ser explicados por mecanismos secundários, tais como o metabolismo (Gabel, 1995).

Outros processos diferentes da difusão iônica podem estar envolvidos na absorção de AGV no ruminoretículo. Há relatos de acúmulo de bicarbonato dependente de AGV em fluido ruminoreticular. De acordo com modelos apresentados para o cólon, o acoplamento entre AGV e HCO_3^- pode ser devido a um processo de troca entre AGV e o bicarbonato liberado intracelularmente ou ser devido ao aparecimento de CO_2 oriundo do metabolismo intracelular de AGV. No último caso, o CO_2 é subsequente catalisado para HCO_3^- e liberado dentro do lúmen. A existência de uma troca entre AGV e HCO_3^- foi sugerida por experimentos em que a adição de um inibidor de mecanismos de troca iônica à mucosa diminuiu o fluxo de [^{14}C]propionato entre a mucosa e a serosa, em fragmentos de mucosa ruminal de carneiros. O acoplamento entre a absorção de AGV e a secreção de bicarbonato ajuda a manter o pH intraluminal alcalino, um processo que pode se tornar muito importante se os animais são alimentados com dietas altamente energéticas. Esse tipo de dieta normalmente tende a diminuir o pH intraluminal, uma vez que a produção de AGV está aumentada enquanto a produção de saliva está diminuída. Foi demonstrado que a adaptação do animal a dietas ricas em energia levou ao aumento de secreção de bicarbonato dependente de AGV, o que poderia compensar, ao menos parcialmente, o ganho de H^+ pelo aumento da produção de AGV e a diminuição do influxo de substâncias tamponantes da saliva. Devido à enorme secreção salivar de bicarbonato de sódio, a qual é 10 a 30 vezes maior em ruminantes do que em animais não-herbívoros de peso corporal comparável, existe um alto

influxo de sódio para o ruminoretículo. Quase metade do sódio secretado com a saliva pode ser reabsorvido dentro do pró-ventrículo (Gabel, 1995).

A taxa de absorção de sódio pode, ao menos parcialmente, depender da disponibilidade de AGV, uma vez que foi demonstrado que AGV estimula o transporte líquido de sódio através da mucosa ruminal isolada. A estimulação do transporte de sódio por AGV pode ser quase completamente abolida por um inibidor de troca de Na^+/H^+ . Isso leva à hipótese de que o transporte de sódio resulta da ativação da troca entre Na^+/H^+ no lado luminal do epitélio ruminal. A ativação dessa troca é provavelmente devida à acidificação intracelular, após o influxo de AGV através da membrana celular. Existem ao menos dois mecanismos para explicar como os AGV acidificam o citosol. Primeiro, a permeabilidade transmembrana de ácidos não-dissociados pode levar a um ganho direto de H^+ dentro do citosol. Segundo, a troca de ácidos dissociados com bicarbonato forneceria bases fracas (AGV^- ao invés de HCO_3^-) para o compartimento intracelular, com conseqüente redução da capacidade tamponante e, então, uma concentração intracelular de H^+ mais alta. Os efeitos dos AGV no pH intracelular, entretanto, não têm sido determinados e, portanto, essa teoria é apenas uma tentativa de explicação. O efeito estimulatório de AGV no transporte de sódio sugere que interações podem ocorrer também na direção oposta, isto é, o Na^+ ou a troca Na^+/H^+ poderiam influenciar no transporte de AGV. Entretanto, não foi possível demonstrar, *in vitro*, efeito do inibidor de troca Na^+/H^+ no fluxo de [^{14}C]propionato ou [^{14}C]acetato da mucosa para a serosa em epitélio ruminal isolado de carneiros, sugerindo que o transporte de AGV não depende da atividade de troca entre Na^+/H^+ , embora essa troca seja estimulada por AGV (Gabel, 1995).

Utilizando-se substitutos iônicos ou inibidores, foi concluído que absorção de cloro através do rúmen pode interferir na secreção de bicarbonato devido à presença da troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ na membrana apical. Entretanto, o cloro

pode também interagir com o transporte de AGV. Estudos demonstraram que a substituição de cloro por gluconato aumentou a absorção de acetato, propionato e butirato *in vitro* e *in vivo*. Em adição, a interação entre cloro e AGV foi recíproca. O aumento da concentração luminal de AGV diminuiu o desaparecimento de cloro *in vivo* e o fluxo de cloro da mucosa para a serosa *in vitro*. A explicação mais simples para a interação entre cloro e AGV é que o cloro e AGV na forma aniônica competiriam pelo mesmo sítio de ligação no mecanismo de troca iônica. A substituição do cloro por ânions de baixa afinidade para o sítio de ligação externo do sistema de troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ levaria à diminuição da extrusão de HCO_3^- na célula e, também a um aumento da quantidade de bicarbonato intracelular disponível para trocas com AGV^- (Gabel, 1995).

Maiores estudos são necessários para elucidar a significância dos mecanismos de troca iônica no epitélio do ruminoretículo. Existem evidências de que a absorção de magnésio no ruminoretículo é essencial para o balanço de Mg^{2+} e que impedimentos na absorção podem contribuir para sinais de tetania hipomagnesêmica. Visando a elucidar a fisiopatologia da tetania hipomagnesêmica, um experimento foi realizado para caracterizar a influência de AGV no transporte de Mg^{2+} . O aumento da concentração de AGV estimulou a absorção líquida de Mg^{2+} em ruminoretículo temporariamente isolado e lavado e em fragmentos de epitélio ruminal. Com respeito ao entendimento da estimulação do mecanismo de transporte de Mg^{2+} induzido por AGV, a absorção de magnésio tem sido mostrada ser ativa e provavelmente parcialmente devida ao sistema de troca $\text{Mg}^{2+}/2\text{H}^+$ na membrana apical do epitélio. O mecanismo básico de estimulação do transporte de Mg^{2+} induzida por AGV seria comparável à influência de AGV na troca de Na^+/H^+ , isto é, influxo de ácidos não dissociados ou troca de HCO_3^- por AGV^- , e subsequente acidificação do citosol e ativação do mecanismo de troca $\text{Mg}^{2+}/2\text{H}^+$ (Gabel, 1995).

Quantidades significantes de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ são produzidas no ruminoretículo pela quebra de proteínas e de compostos contendo nitrogênio não-protéico. A concentração intraruminal $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ varia entre 1,5 e 15 mM em animais que recebem N protéico, mas pode aumentar para 45 mM se os animais são alimentados com altas quantidades de compostos que contêm N de degradação rápida, tais como uréia. Guiados pelo gradiente de concentração entre o ruminoretículo e o sangue, uma grande proporção de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, não usados pelos microorganismos, atravessa diretamente a parede do pró-ventrículo. A taxa de transferência de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, entretanto, não é determinada somente pelo gradiente de concentração. Isso também pode ser influenciado por AGV. Tem sido demonstrado que o desaparecimento de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ do ruminoretículo lavado e isolado aumenta quando as concentrações de AGV estão elevadas. Parece que o processo de titulação recíproca pode explicar as interações entre amônia e AGV. Nas variações normais de pH ruminal, AGV e amônia estão predominantemente presentes como ânions no fluido ruminal. Pode ser assumido que NH_4^+ doa seu próton para AGV^- e que NH_3 e HAGV difundem através do epitélio. Como uma outra possibilidade, a secreção de HCO_3^- dependente de AGV pode prover HCO_3^- para titular NH_4^+ e levar a uma concentração de NH_3 constante na superfície absorptiva (Gabel, 1995).

Alguns experimentos importantes que tentam elucidar os fatores envolvidos no transporte de AGV foram realizados após a publicação da revisão supracitada. A influência do pH no transporte de AGV foi estudada *in vitro* por Kramer et al. (1996). O experimento foi delineado para determinar a forma de AGV (protonada ou aniônica) absorvidos no rúmen e também o papel do mecanismo de troca entre Na^+ e H^+ nesse processo. O experimento foi conduzido com ruminoretículo obtido de carneiros sacrificados. Um fragmento de 150 cm^2 do saco ventral do rúmen foi cortado e lavado em uma solução-

tampão a 37°C. O epitélio foi isolado, montado em uma câmara de Ussing¹ e adaptado às condições experimentais por 20 minutos. O fluxo de carbono através do epitélio foi determinado utilizando-se ¹⁴C-propionato. Para aumentar a concentração de propionato na forma protonada na solução tampão em contato com a mucosa, o pH foi gradualmente reduzido de 7,5 para 6,5. O pH do lado serosal da câmara de Ussing foi mantido a 7,5. Essa redução gradual do pH levou a um aumento significativo no fluxo de propionato da mucosa para a serosa, e o fluxo da serosa para a mucosa não foi afetado significativamente. Se fosse assumido que o propionato só pudesse ser absorvido na forma protonada, o aumento do fluxo poderia ser predito utilizando-se a equação de Henderson-Hasselbalch. A concentração de propionato na forma protonada, calculada por essa equação, entretanto, aumentou dez vezes, ao passo que o fluxo da mucosa para a serosa aumentou apenas duas vezes. Esses resultados sugeriram que o propionato pode também ser absorvido na forma aniônica, provavelmente devido a um mecanismo de troca iônica, fato já conhecido em outros epitélios gastrointestinais. No presente experimento, quando foi adicionado um inibidor do mecanismo de troca iônica, houve redução do fluxo de cloro, sugerindo realmente a existência desse mecanismo. Esse inibidor também reduziu significativamente o transporte de propionato. Um efeito similar foi induzido por nitrato, o qual também é capaz de inibir o mecanismo de troca iônica. Com base nesses dados pode ser concluído que ânions de propionato podem ser absorvidos por mecanismos de troca iônica. A elevação da concentração mucosal de Cl⁻ de 4 para 44 mM resultou em uma redução significativa do fluxo de propionato da mucosa para a serosa e também do fluxo líquido. Além disso, uma marcante queda no fluxo de cloro da mucosa para serosa foi constatada quando se aumentou a concentração de propionato de dois para 112 mM. Um

¹ A câmara de Ussing recebeu esse nome em homenagem ao fisiologista dinamarquês Hans Ussing. FONTE: <http://www.octopus.furg.br/ensino/Praticas/transion/ussing.html>

ensaio *in vivo*, no mesmo trabalho, foi também conduzido utilizando-se a técnica do ruminotéclico temporariamente isolado, esvaziado e lavado. Para evitar o fluxo de saliva para o órgão, um coletor de saliva foi colocado na porção caudal do esôfago. A saliva que acumulou cranialmente ao coletor foi aspirada continuamente e infundida no omaso por meio de um cateter fixado no óstio retículo-omasal. A presença do cateter nesse local também impedia a saída da solução experimental do ruminotéclico. Para determinar a absorção líquida, uma solução-tampão de 2,5 litros a 39°C, contendo acetato, propionato e butirato, foi colocada no ruminotéclico. A pressão osmótica inicial foi ajustada para 290 mOsmol. Amostras foram coletadas antes da introdução da solução e depois, a curtos intervalos de tempo. A teofilina¹ foi usada como agente bloqueador do sistema de troca Na⁺/H⁺. Estudos prévios haviam demonstrado que a teofilina leva à inibição do transporte de sódio sensível à amilorida². A adição de 10 mmol l⁻¹ de teofilina no ruminotéclico causou um significativo declínio na absorção líquida de sódio, ao passo que a absorção de AGV permaneceu quase constante, demonstrando que o transporte de AGV no rúmen, pelo menos nas condições desse experimento, ocorreu independente da atividade do sistema de troca Na⁺/H⁺. No intestino grosso, esse sistema de troca tem grande importância no transporte de AGV. Em contrapartida o Cl⁻ mostrou um efeito marcante no transporte de AGV. A absorção líquida de AGV foi

¹ Substância derivada da metilxantina – inibidor da fosfodiesterase citoplasmática a qual cataboliza o metabolismo do AMP cíclico.
FONTE: http://www.tsa.org.br/livro/p_0042.asp

² 3,5-diamino-N-(aminoiminomethyl)-6-chloropyrazinecarboxamide – A amilorida normalmente é usada para prevenir ou tratar hipopotassemia. Age no rim interferindo na troca de potássio e sódio no túbulo distal, túbulo coletor cortical e no ducto coletor pela inibição sobre sódio e potássio ATPase.
FONTE: http://www.sintetica.com.br/literaturas/AMILORIDE_HCL_FARM.htm

maior na ausência de Cl⁻, confirmando a interação entre o transporte desses elementos, demonstrada *in vitro* (Kramer et al., 1996).

Visando a verificar o transporte e metabolismo ruminal de AGV pelo epitélio ruminal de bovinos, Sehested et al. (1999a) observaram, *in vitro*, o efeito do pH e do tamanho da cadeia do AGV nessas variáveis. O epitélio ruminal foi proveniente de animais adultos de várias raças, idade, sexo e dieta, os quais foram sacrificados em matadouro. Aproximadamente 15 minutos após o sacrifício, uma peça uniforme de tecido foi coletada do saco ventral a cerca de 10 cm do pilar longitudinal esquerdo em direção ventral. O tecido foi lavado e transportado para o laboratório em solução de ringer oxigenada e aquecida. No laboratório, a mucosa foi separada das outras camadas da parede e lâminas do tecido epitelial foram montadas em uma câmara de Ussing com abertura de dois cm², banhadas com a respectiva solução experimental e submetidas à corrente elétrica. AGV marcados com ¹⁴C foram utilizados para determinação das taxas de fluxo. As taxas de fluxo foram medidas em condições de pH 7,3 e 6,0, e foram usados dois tipos de soluções, com misturas de AGV (acetato, propionato e butirato) ou com AGV isolados. Em pH 7,3, existiu secreção líquida pequena, mas significativa, de acetato e propionato. A absorção líquida de butirato foi alta e significativa nas condições de mistura de AGV ou com butirato sozinho. O fluxo de acetato foi diminuído em cerca de 13-17% na solução conjunta, comparada com a solução que continha somente acetato. Diferentemente, propionato e butirato tiveram seus fluxos estimulados pela presença de outros AGV. O fluxo líquido de propionato foi estimulado 77% pela presença de acetato e butirato. O fluxo líquido de butirato aumentou 78% na solução conjunta, quando comparado com o fluxo líquido da solução que continha apenas butirato. A presença de análogos do butirato aumentou em 100% (isobutirato) e 140% (2-metil-butirato) o fluxo líquido de butirato. O fluxo mucoserosal de AGV aumentou, em geral, embora não proporcionalmente com

o aumento do tamanho da cadeia de carbono e da solubilidade lipídica do AGV. A redução do pH aumentou, significativamente, tanto o fluxo mucoserosal quanto o seromucosal dos AGV. Considerando o balanço dos fluxos, houve menor secreção de propionato e acetato em pH 6,0 do que em pH 7,3. As taxas de fluxo de AGV foram mais sensíveis à solubilidade lipídica em pH 6 do que em pH 7,3, mas o aumento da taxa de fluxo ficou ainda longe de ser proporcional ao aumento da solubilidade lipídica. Para estudar metabolismo, uma solução contendo AGV marcados com ^{14}C foi colocada de um lado da câmara de Ussing, e outra solução sem AGV foi colocada do outro lado. As soluções foram tamponadas a pH 7,3. As taxas de fluxo baseadas em medições químicas dos AGV não-marcados foram diferentes daquelas baseadas no fluxo dos AGV marcados. Considerando as soluções contendo acetato, o aparecimento desse AGV foi 100% mais alto do que a quantidade transportada oriunda do lado oposto do epitélio (baseado no fluxo de marcadores). Isso sugere que existe uma produção endógena considerável de acetato pelo epitélio ruminal. Para propionato e butirato esse aparecimento foi apenas 39 e 6 por cento, respectivamente, mais alto do que o estimado pelo fluxo do marcador, mostrando que os 61 e 94%, respectivamente, apareceram como metabólitos que não eram CO_2 no lado serosal. Da serosa para a mucosa, o aparecimento de propionato e butirato como metabólito não CO_2 foi bem mais baixo, sendo 27 e 31%, respectivamente. A quantidade total de propionato e butirato metabolizado (metabólitos de CO_2 ou não) foi 78 e 95% na direção mucoserosal, mas apenas 37 e 38% na direção seromucosal, respectivamente. O metabolismo de acetato não pode ser estimado devido a grande produção endógena de acetato. Os dados desses experimentos demonstraram que a rota mucoserosal é diferente da rota seromucosal e que butirato é tratado diferentemente pelo epitélio do que o acetato e propionato, mas é importante lembrar que em condições fisiológicas, *in vivo*, o gradiente de concentração

existente, provavelmente irá inibir o fluxo de acetato e propionato constatado nesse estudo. Os autores também discutem que, baseados na assimetria e metabolismo extensivo de AGV, há indicação de que a principal rota para os AGV é transcelular, fato já confirmado por outros pesquisadores (Stevens & Stettler, 1966, citados por Sehested, 1999a), os quais constataram que a difusão paracelular de AGV (dos quais 95-99% estão ionizados no pH fisiológico do rúmen) através do epitélio ruminal de bovinos foi insignificante e que um potencial elétrico aplicado entre as lâminas de epitélio, *in vitro*, não influenciou o transporte transepitelial de AGV.

Sehested et al. (1999b) investigaram, *in vitro*, o transporte de butirato através do epitélio ruminal de bovinos e sua interação com sódio, cloro e bicarbonato. Os epitélios ruminais utilizados no experimento foram oriundos de bovinos de várias raças, sexo, idade e dietas, os quais foram escolhidos aleatoriamente em um matadouro. No laboratório, a mucosa foi separada da camada muscular e as lâminas de tecido epitelial foram montadas em uma câmara de Ussing com abertura de dois cm² e, após ajustes, 10 ml das soluções experimentais, juntamente com marcadores para determinação das taxas de fluxo, foram colocados a cada lado da câmara de Ussing. Os fluxos foram medidos sob condições de potencial eletroquímico igual a zero, exceto em um experimento, cujo objetivo era medir o efeito da diferença de potencial elétrico. Os tecidos ficaram em adaptação por 45 minutos após a adição de ²²Na (93 kBq) e ³⁶Cl ou [1-¹⁴C]butirato (93 kBq) no lado serosal e mucosal do tecido. As taxas de transporte foram então acompanhadas por 1 hora. Em alguns experimentos, amilorida foi introduzida após esse período e o fluxo foi acompanhado durante a hora seguinte. As soluções experimentais foram baseadas numa solução-padrão e tamponadas a pH 7,3. O fluxo de butirato em direção da serosa para a mucosa aumentou linearmente com a concentração e mostrou ser um processo de ação de massa regulado passivamente. O fluxo de

butirato em direção da mucosa para a serosa, entretanto, respondeu curvilinearmente à concentração. O fluxo líquido foi positivo quando a concentração de butirato na solução experimental variou de 5 a 40 mmol l⁻¹. Quando a concentração esteve em 60 mmol l⁻¹, o fluxo ainda foi positivo, mas não foi estatisticamente diferente de zero. A curva do fluxo teve as características da cinética de saturação de Michaelis-Menten, com Km = 7,2 mmol l⁻¹. O fluxo máximo esteve em 20 mmol l⁻¹ e o fluxo de 30 mmol l⁻¹ induziu uma quebra abrupta na curva. Quando a concentração de butirato na solução experimental aumentou, o fluxo líquido de sódio respondeu, quantitativamente, de maneira similar ao fluxo líquido de butirato, isto é, o transporte máximo de sódio ocorreu quando a concentração de butirato estava em 20 mmol l⁻¹, decaindo quando a concentração de butirato foi maior. O fluxo líquido de butirato foi maior na solução contendo sódio na ausência de cloro do que nas soluções contendo sódio e cloro, sugerindo competitividade entre o cloro e o butirato ionizado no mecanismo de troca iônica. Considerando o transporte que ocorreu por diferença de potencial elétrico, a permeabilidade epitelial ao butirato protonado (ou butirato ionizado via rota eletroneural) em direção da mucosa para a serosa foi três a quatro ordens de magnitude maior do que a permeabilidade ao butirato ionizado pela rota paracelular ou eletrogênica. Existe uma barreira epitelial altamente seletiva na direção da serosa para a mucosa, o que sugere não haver transporte de butirato por diferença de potencial elétrico da serosa para a mucosa, sendo provável que o transporte nessa direção ocorra apenas por difusão de butirato protonado. Na presença de bicarbonato, houve um fluxo líquido significativo de butirato, o qual foi abolido quando se retirou bicarbonato. A ausência de fluxo líquido nessa última condição foi devido à diminuição significativa do fluxo da mucosa em direção serosal e aumento significativo do fluxo inverso, mostrando interação do transporte de butirato com o transporte de bicarbonato.

Até então o transporte através do epitélio ruminal tinha recebido bastante atenção. No entanto, os detalhes intracelulares durante o transporte e metabolização dos AGV no epitélio ruminal permaneciam ainda desconhecidos. Atentos a esse fato, Gabel et al. (2001) compararam, utilizando a técnica do ruminoretículo isolado e lavado *in vivo*, o transporte transepitelial do butirato que é facilmente metabolizável, com o transporte do isobutirato que é mais resistente ao metabolismo. No experimento *in vivo*, foram usados seis carneiros com fístula permanente no saco dorsal do rúmen. Os animais foram alimentados com feno *ad libitum* e concentrado baseado em 100 g de aveia por kg de peso vivo fornecido duas vezes ao dia. O ruminoretículo foi esvaziado e lavado com solução-tampão a 39°C. Foi usado coletor de saliva, conforme descrito por Kramer et al. (1996). Para determinação da absorção líquida, foi introduzida uma solução tampão aquecida a 39°C, contendo butirato (15 mmol . l⁻¹) ou isobutirato (15 mmol . l⁻¹) ou ainda concentrações equimolares dos dois ácidos na mesma solução. A solução continha também Cr-EDTA e outras substâncias. A pressão osmótica e o pH da solução foram ajustados para 260 mOsmol . l⁻¹ e 6,7, respectivamente. O butirato foi sempre absorvido em maior extensão do que o isobutirato e não houve interação entre as absorções desses dois ácidos. A absorção líquida de butirato aconteceu no mesmo nível, independentemente se houvesse ou não presença de isobutirato. A recíproca foi verdadeira. Apesar das evidências de que o cloro seria absorvido pelo mesmo mecanismo de troca iônica do que os AGV (Kramer et al.,1996), as taxas de absorção de cloro sob as mesmas condições nesse experimento foram independentes da presença de qualquer forma de butirato na solução. Os mesmos fatores também foram avaliados *in vitro*, verificando-se o transporte desses componentes através do epitélio ruminal de carneiros colocado em câmara de Ussing. O fluxo foi calculado pela adição de ¹⁴C-AGV na câmara de Ussing no lado da mucosa e no lado da serosa, medindo-se a radioatividade posteriormente. Para checar se a

diferença observada *in vivo* na magnitude da absorção de ambas as formas de butirato poderia ser constatada *in vitro*, mediu-se o fluxo direcional da mucosa para a serosa, mantendo-se um gradiente de concentração de 30 mM no lado da mucosa contra 0 mM no lado da serosa. O fluxo de butirato foi 68% maior do que o de isobutirato. Para checar o fluxo na ausência de gradiente de concentração, as mensurações foram feitas com 10 mmol . l⁻¹ de ambas as formas de butirato nos dois lados do epitélio. O fluxo de isobutirato foi significativamente menor do que o fluxo de butirato em direção da mucosa para a serosa. Cogitou-se que o maior fluxo de butirato poderia ser devido à contribuição significativa do sistema de troca iônica ruminal (Kramer et al.,1996). Sendo assim, os autores investigaram o fluxo desses ácidos na presença de um inibidor de troca iônica adicionado à mucosa, mas não houve influência desse no fluxo dos AGV sob essas condições. Outra investigação foi feita colocando-se um inibidor da produção de ATP celular (DNP – 2,4-dinitrofenol) na solução. Esse inibidor diminuiu marcadamente o fluxo líquido de AGV. Essa diminuição no fluxo líquido refletiu a diminuição do fluxo mucoserosal e aumento do fluxo seromucosal tanto para butirato quanto para isobutirato. As mudanças nas taxas de fluxo foram acompanhadas por aumento na condutividade elétrica transepitelial. Em um outro experimento, foram comparadas as sensibilidades do transporte de acetato, propionato e butirato à presença de DNP. Em condições controladas, o fluxo de acetato é igual ao do propionato e ambos são menores do que butirato. A adição de DNP diminuiu o fluxo mucoserosal de butirato e, segundo os autores, tendeu a diminuir o fluxo de acetato e propionato. O efeito do DNP no fluxo dependeu do tipo de AGV. Enquanto o fluxo seromucosal de butirato aumentou, o fluxo seromucosal de acetato e propionato tendeu a ser reduzido. Esses resultados demonstram que a absorção de butirato depende grandemente da disponibilidade de ATP e sugerem que acetato e propionato possam também ter alguma dependência de

ATP e essa provavelmente esteja relacionada à quebra metabólica dos AGV. Os dados desse estudo reforçam a idéia de que o metabolismo intra-epitelial de butirato favorece a absorção líquida desse, porque tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, a absorção do butirato, que é facilmente metabolizável, foi maior do que a do isobutirato que, por sua vez, é pouco metabolizado. Fica evidente que a atividade metabólica do epitélio tem efeito regulatório no processo de absorção. No caso do transporte de butirato, o metabolismo não só aumentou o *status* energético das células e o gradiente transapical de butirato, mas parece que também estabeleceu um gradiente basolateral adicional para corpos cetônicos, os quais podem servir como fonte de energia para o animal, após absorção.

Em um congresso na Dinamarca, Kristensen & Danfaer (2001) argumentaram que, por quase 30 anos, a hipótese de que grande quantidade de AGV são metabolizados no epitélio do trato gastrointestinal foi aceita sem maiores questionamentos, mas existem evidências atuais de que apenas uma pequena quantidade de acetato, propionato e isobutirato são metabolizados durante a absorção. Os autores argumentaram que os estudos realizados que compararam infusões intraruminais de AGV e a recuperação desses na circulação portal, sofreram grande influência do uso de AGV por microorganismos ruminais, que parece não ser pequeno. Além do mais, ponderaram que as estimativas de produção de AGV ruminais baseados em diluições isotópicas podem não ser afetadas por trocas de carbonos entre os AGV, mas poderiam também ser superestimadas pela incorporação do AGV marcado em outros constituintes microbianos. Ácidos graxos de cadeia média (C₁₅ e metil-C₁₅ ramificados) dos microorganismos ruminais foram altamente enriquecidos experimentalmente com ¹³C e esses puderam ser absorvidos através do epitélio do pró-ventrículo, explicando parcialmente o fluxo de carbono através do pool de acetato no rúmen. Os autores propuseram que apenas os AGV de cadeia mais longa, ou seja, butirato e valerato, são realmente

metabolizados em grande escala pelo epitélio ruminal. Afirmaram ainda que a absorção líquida dos seguintes ácidos pode se estimada através do aparecimento portal: o acetato deve ser corrigido para a utilização do acetato arterial pelas vísceras drenadas pela veia porta e essa estaria em torno de 32%. O propionato aparentemente perde 5% por metabolização no epitélio. O isobutirato aparentemente não apresenta metabolismo no epitélio. O butirato e outros ácidos de cadeia mais longa são altamente metabolizados pelo epitélio ruminal e têm recuperação na veia porta em torno de 25% (Kristensen & Danfaer, 2001).

Uma boa contribuição para a elucidação dos mecanismos de metabolização de AGV pelo epitélio ruminal foi dada por Waldron et al. (2002), os quais estudaram, *in vitro*, o metabolismo de AGV por células epiteliais isoladas de diferentes regiões do rúmen. As células foram coletadas de quatro localizações do rúmen de quatro ovelhas de dois a três anos alimentadas com feno. Cento e cinquenta centímetros quadrados de tecido foram coletados na região situada cranialmente ao pilar cranial, no assoalho do saco ventral, na superfície situada caudalmente ao pilar caudal e no teto do saco dorsal. As células foram isoladas usando-se digestão serial em tripsina. Um mililitro do material isolado foi incubado por duas horas em seis e meio mililitros de cultura contendo 25 mM de propionato e 10 mM de butirato. As incubações terminaram nos tempos zero, 30, 60, 90 e 120 minutos e foram analisadas para β -hidroxibutirato, acetoacetato, lactato e piruvato. A concentração de AGV ruminal total imediatamente antes do sacrifício dos animais foi de 54 mM e a proporção acetato : propionato : butirato foi 75 : 18 : 4. Isobutirato, metilbutirato e valerato foram 1,06, 1,2 e 0,47 % do AGV total, respectivamente. A produção de todos os quatro metabólitos aumentou ao final dos 120 minutos de incubação em cada tecido amostrado, exceto a produção de piruvato na superfície do pilar caudal e no teto do saco dorsal do rúmen. Esse fato demonstrou a continuidade da atividade celular até aos 120 minutos de

incubação. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as produções dos metabólitos, com exceção da região localizada cranialmente ao pilar cranial, que tendeu a produzir mais lactato e piruvato do que a região situada caudalmente ao pilar caudal, indicando que a região do rúmen não é relevante em delineamentos experimentais que visem a estudar o metabolismo de AGV pelo epitélio ruminal.

Para esclarecer a influência das condições do meio de cultura no sistema de troca entre Na^+ e H^+ (NHE), Galfi et al. (2002) estudaram esse mecanismo de troca em culturas de células epiteliais do rúmen de carneiros. As culturas celulares foram submetidas a diversos tratamentos para induzir diferentes graus de estratificação e conseqüentemente queratinização. Um grupo de células foi cultivado na ausência de butirato e mostrou crescimento celular tanto estratificado quanto não-estratificado. Essa cultura celular foi a mais ineficiente na utilização de sódio. Outro grupo de célula foi cultivado na presença de butirato e mostrou crescimento não estratificado na maioria das células. A utilização de sódio por essas células foi duas vezes mais alta do que nas primeiras. Quando essas células foram subculturadas, as células jovens em crescimento acelerado tiveram a utilização de sódio mais alta entre as três culturas. A utilização do sódio nas duas culturas tratadas com butirato foi inibida por amilorida, uma substância bloqueadora do mecanismo de troca Na^+/H^+ , indicando que esse mecanismo é ativo em culturas de células epiteliais do rúmen. Os resultados desse experimento indicam que a utilização de sódio pelo mecanismo de troca Na^+/H^+ é determinada pela quantidade e taxa de estratificação, a qual reflete a queratinização celular, uma vez que a taxa de diferenciação celular é associada à taxa de estratificação.

Muller et al. (2002) investigaram o transporte de corpos cetônicos e lactato em epitélio ruminal de carneiros e encontraram a presença do transportador monocarboxilato ligado a próton, no estrato basal de células do

epitélio, o qual pode ser o principal mecanismo de remoção de corpos cetônicos e lactato unidos a H⁺ do citosol para o sangue.

2.4.2 Mensuração das taxas fracionais de *clearance* de AGV do ruminoretículo

Há muito tempo, diversas pesquisas têm sido feitas visando a estabelecer detalhes sobre o processo pelo qual os AGV desaparecem do rúmen após a sua formação dada pela fermentação. Inicialmente havia indícios de que o desaparecimento dos AGV ocorria antes do abomaso, uma vez que Phillipson & Mcanally (1942), citados por Barcroft et al. (1944), mostraram que a concentração de AGV na ingesta ruminal era alta, mas na ingesta abomasal, era muito baixa. Várias técnicas já foram utilizadas para mensurar as taxas fracionais de *clearance* de AGV e todas apresentam vantagens e desvantagens.

2.4.2.1 Coleta de sangue na veia porta e suas tributárias

As primeiras estimativas de absorção de AGV foram realizadas estabelecendo-se a diferença entre as concentrações de AGV presentes no ruminoretículo e aquelas presentes no sangue da veia porta¹ e suas tributárias. O maior inconveniente dessas mensurações é a metabolização dos AGV pela

¹ O sangue drenado do rúmen, retículo, omaso e abomaso confluem para a veia lienal vinda do baço. O sangue drenado dos intestinos é drenado pela a veia mesentérica cranial. A veia lienal e mesentérica cranial (tributárias) unem-se para formar a veia porta, a qual leva o sangue diretamente ao fígado (Nickel et al. 1981).

parede do ruminoretículo, o que prejudica o estabelecimento da quantidade realmente absorvida.

Barcroft et al. (1944) realizaram um experimento para determinar a absorção de AGV do canal alimentar de carneiros e outros animais. Cirurgicamente, eles incisaram os carneiros do lado direito da cavidade abdominal, permitindo acesso ao ceco, intestino delgado e abomaso. Dessa maneira, os pesquisadores obtinham sangue das veias que drenavam o rúmen, retículo, omaso e abomaso e faziam a pesquisa dos AGV no sangue. A concentração de AGV no sangue vindo do rúmen e do retículo foi praticamente a mesma, mas no sangue vindo do omaso era bem mais baixa e era quase insignificante no sangue oriundo do abomaso. O sangue drenado do ceco mostrou concentração semelhante àquela presente naquele drenado do omaso. Esses mesmos autores fizeram também a comparação entre a concentração de AGV presentes no conteúdo do rúmen e outras porções do canal alimentar e aquela encontrada nas respectivas veias de drenagem. Eles observaram que havia maior proporção de acetato em relação a outros ácidos de cadeia mais longa no sangue do que no conteúdo ruminal. Para checar essa situação, realizaram outro experimento com dois carneiros com uma fístula no saco dorsal e outra no saco ventral do rúmen. Esvaziaram o conteúdo ruminal e lavaram o rúmen. Coletaram uma amostra de sangue proveniente do rúmen e logo após fizeram infusão de acetato de sódio e novamente coletaram outra amostra de sangue. Retiraram o acetato por lavagem e coletaram sangue novamente. O mesmo procedimento foi feito em infusões de propionato e butirato. O acetato apareceu no sangue em quantidade apreciável já aos cinco minutos após infusão. No mesmo espaço de tempo, houve menor aparecimento de propionato e menor ainda de butirato. Houve também aumento desses AGV no sangue periférico, mas em menores proporções do que no sangue vindo do rúmen. Constatou-se também menor absorção de acetato quando esse foi

infundido após as infusões de butirato do que quando infundido pela primeira vez. Um outro experimento foi feito; dessa vez, fazendo-se ligaduras no esôfago e na entrada do abomaso. O conjunto foi lavado e foram feitas infusões seqüenciais de água, propionato, água e acetato. O aparecimento de propionato no sangue foi menor do que de acetato no mesmo tempo de coleta. Infundiram 25 g de acetato e recuperaram apenas 15 gramas 1,5 hora depois e a redução do volume de líquido ruminal no mesmo espaço de tempo foi de apenas 150 ml. Para estabelecer o fluxo sangüíneo, os autores canularam uma veia do rúmen e mediram o volume que saía durante dois e meio a três minutos. Os autores concluíram que a taxa de absorção não dependia da concentração de AGV na ingesta (Barcroft et al., 1944).

Quatro décadas depois, Huntington, Reynolds & Tyrrell (1983), trabalhando com vacas holandesas não-gestantes, objetivaram definir o padrão diário de absorção líquida de vários nutrientes e estabelecer os efeitos de infusões intraruminais de ácido acético nas concentrações do fluido ruminal e na absorção líquida de vários metabólitos. Essas características foram medidas em amostras de sangue, coletadas a cada hora através de cateteres mantidos na veia porta e na artéria circunflexa externa do ílio¹. Amostras de fluido ruminal foram também coletadas a cada hora. O período de coleta foi de 24 horas, antes e após cinco dias de infusão intraruminal de ácido acético em quantidade suficiente para prover energia igual a 10% da ingestão diária de energia metabolizável. As vacas receberam dieta completa, divididas em duas alimentações diárias, contendo 60% de silagem de milho e 40% de grãos em quantidade para suprir a manutenção. A ingestão do alimento ocorreu dentro de 30

¹ Apesar de estar citado pelo autor dessa maneira, parece haver um engano anatômico, uma vez que a artéria circunflexa superficial do ílio só existe em carnívoros (Nickel et al., 1981). Provavelmente a artéria canulada foi a artéria circunflexa profunda do ílio (ramo cranial), a qual corre na região do flanco.

minutos e houve aumento de fluxo sanguíneo após alimentação da manhã e da tarde. O padrão do pH do fluido ruminal e da absorção líquida de uréia foi inverso às outras variáveis, apresentando o pico nas primeiras horas da manhã e valores mais baixos após alimentação. As concentrações plasmáticas arteriais de acetato, propionato, butirato, AGV total e uréia foram mais altas após a alimentação da manhã (de 7 às 17 horas) do que após a alimentação da tarde (de 17 às 6 horas). O mesmo comportamento foi observado nas concentrações no plasma portal de isobutirato e 3-metilbutirato, uréia-N, na absorção líquida de isobutirato e no volume intracelular. As infusões intraruminais de acetato aumentaram as concentrações plasmáticas de acetato e dos AGV totais. Aumentaram também as diferenças entre as concentrações plasmáticas portais e arteriais de acetato e os AGV totais e o nitrogênio de uréia. Diminuíram a diferença entre as concentrações plasmáticas portais e arteriais de butirato e amônia-N. A infusão intraruminal de acetato aumentou a absorção líquida de acetato e AGV total e diminuiu a absorção líquida de uréia. O fluxo sanguíneo portal, as concentrações plasmáticas e absorção líquida de outros nutrientes não foram afetadas significativamente pelas infusões, mas houve tendência de aumento na absorção líquida de propionato e glicose e diminuição na absorção líquida de butirato. As infusões intraruminais de acetato aumentaram a concentração ruminal desse ácido, bem como sua porcentagem molar, mas não afetaram a concentração ruminal de amônia, outros AGV e o pH do fluido ruminal. As infusões de acetato causaram aumentos persistentes da concentração plasmática arterial de acetato e diminuições persistentes do nitrogênio de uréia durante as 24 horas. Houve correlação positiva entre as taxas de aparecimento portal líquido e as concentrações ruminais de acetato ($r^2 = 0,31$), propionato ($r^2 = 0,52$), butirato ($r^2 = 0,39$), valerato ($r^2 = 0,61$) e nitrogênio de amônia ($r^2 = 0,82$). Os autores argumentam que a correlação mais alta entre a concentração e o aparecimento portal líquido encontrada para propionato e

amônia do que para acetato e butirato poderia refletir maior utilização desses últimos pela parede do rúmen (Huntington et al., 1983). Essas correlações devem ser encaradas com cautela, uma vez que os produtos de fermentação do intestino grosso também são drenados para a veia porta e o padrão de fermentação no intestino poderia ser diferente do rúmen.

Reynolds & Huntington (1988) investigaram o aparecimento portal líquido de AGV e lactato em vacas holandesas lactantes. O aparecimento portal líquido foi determinado em primíparas às quatro, oito, doze, dezesseis e vinte semanas de lactação. Foram instalados cateteres crônicos entre sete a quatorze dias após o parto na veia porta hepática e mesentérica cranial e também na porção caudal da artéria aorta abdominal, para determinação do fluxo sanguíneo e do aparecimento portal líquido de nutrientes. As vacas foram alimentadas com uma dieta completa composta de 60% de silagem de milho e 40% de concentrados, baseados na matéria seca e os animais foram ordenhados a cada 12 horas. A ingestão média de energia metabolizável foi de 2,8 vezes a manutenção e a média de produção de leite foi de 24 kg. O aparecimento portal líquido de lactato, AGV individuais ou totais não foi afetado pela semana após o parto. O aparecimento portal líquido de lactato, AGV e N α -amino representaram na soma 53,6% da energia metabolizável ingerida. A contribuição energética dos nutrientes absorvidos foi de 29,5% cada para acetato e propionato, 23,4% para N α -amino, 5,4% para lactato, 5,3% para butirato, 2,8% para metilbutirato e de 1,2 a 1,6% para 2-metilbutirato, metilbutirato e valerato. Diferenças entre concentrações portais e arteriais foram maiores para acetato e propionato plasmático durante a oitava semana. Entretanto, não houve diferença entre semanas nas taxas de aparecimento portal líquido de AGV recuperados no plasma ou sangue. Os autores compararam os dados das taxas de aparecimento portal líquido obtidas nesse experimento com aqueles obtidos em vacas não-lactantes, de peso similar e com a mesma dieta,

por Huntington et al. (1983). Pelos dados demonstrou-se que um aumento de 2,7 vezes na ingestão de matéria seca foi associado ao aumento similar no aparecimento portal líquido de lactato, butirato e 2-metilbutirato. Entretanto, mudanças nos padrões de absorção ou fermentação são sugeridos por mudanças relativamente menores de acetato (2 vezes), isobutirato (1,7 vezes) e metilbutirato (2,1 vezes) e por mudanças relativamente maiores na absorção de propionato (3,5 vezes) e valerato (3,6 vezes). A taxa de aparecimento portal líquido de acetato : propionato foi 3,5 : 1 para vacas não-lactantes e 2,1 : 1 para vacas lactantes, sugerindo mudança no padrão de fermentação ou absorção que proporcionaram um suprimento mais alto de propionato como precursor de glicose para vacas em lactação. As concentrações arteriais de lactato (apenas plasmático), acetato, isobutirato e metil-butirato aumentaram linearmente após a vigésima semana de lactação, o que aconteceu também com as diferenças portais-arteriais da concentração de isobutirato e valerato. As concentrações e o aparecimento portal líquido aumentaram após alimentação, decaindo gradualmente no tempo até a próxima refeição. Comparações pareadas mostraram concentrações mais baixas e menores diferenças portal-arterial de todos os AGV no sangue do que no plasma. Entretanto, o aparecimento portal líquido computado no sangue foi mais alto do que no plasma para acetato, propionato, isobutirato e 2-metilbutirato, demonstrando, com isso, o papel das células sangüíneas no transporte desses elementos. Esses achados demonstram que taxas de aparecimento portal líquido calculadas com base apenas em concentrações plasmáticas podem estar subestimadas (Reynolds & Huntington, 1988).

2.4.2.2 Infusões intraruminais de soluções de AGV em rúmen sem digesta

Mensurações das taxas de absorção de AGV do ruminoretículo também podem ser feitas pela retirada da digesta e subsequente lavagem do órgão. Depois é introduzida uma solução de AGV de concentração conhecida e, por meio de coletas seriadas, verifica-se a queda na concentração de AGV ao longo do tempo, determinando-se, assim, a taxa fracional de *clearance*, uma vez que não há produção concomitante de AGV devido à ausência de digesta. Alguns experimentos foram feitos obstruindo-se o orifício retículo-omasal para que a solução não passasse aos compartimentos distais. Outros usaram marcadores de passagem de fluido para checar o desaparecimento da solução por passagem e, por diferença, determinar a absorção.

Outra possibilidade é o não-fornecimento de alimento aos animais durante um período de adaptação, mantendo-se os animais nutridos por infusões intragástricas. Após a adaptação, suspende-se a infusão de nutrientes e faz-se infusão da solução marcadora e realizam-se coletas ao longo do tempo para determinar o *clearance* de AGV.

Essas técnicas têm o inconveniente de gerar taxas fracionais de *clearance* em condição fisiológica atípica fato que pode dificultar a extrapolação dos resultados para animais que estejam consumindo alimentos.

Usando a técnica do rúmen evacuado e lavado, Dijkstra et al. (1993) realizaram um dos experimentos mais elucidativos a respeito do *clearance* ruminal de AGV em vacas leiteiras. Os autores objetivaram quantificar o efeito do volume de líquido do rúmen, pH e concentração de AGV nas taxas fracionais de absorção dos ácidos acético, propiônico e butírico. Foram usadas duas vacas holandesas lactantes de 7 anos, equipadas com cânulas ruminais, apresentando dois a três meses de lactação e produzindo em média 16,5 kg de leite por dia. As vacas, durante o período experimental de dois meses, pastaram junto com os outros animais do rebanho e receberam adicionalmente dois quilos de concentrado comercial por dia. Doze soluções experimentais foram preparadas

contendo três níveis de concentrações individuais de AGV (20, 50 ou 100mM de ácido acético, propiônico ou butírico) e quatro níveis de pH (4,5; 5,4; 6,3; 7,2) e foram introduzidas no rúmen em dois volumes diferentes (10 ou 30 litros). Todas as soluções continham 170 mM de AGV. O pH das soluções foi ajustado para o desejado por adição de NaOH ou HCl e, quando necessário, NaCl foi adicionado para propiciar osmolaridade de aproximadamente 400 mOsmol/l. A taxa fracional de passagem do fluido ruminal foi estimada utilizando-se Co-EDTA (Uden et al., 1980) como marcador de fase fluida. Durante o período experimental, as vacas foram confinadas em um estábulo após a ordenha da manhã às segundas, quartas e sextas-feiras. O conteúdo ruminal foi removido e estocado em um container isotérmico até o retorno ao rúmen. Após esvaziado, o rúmen foi lavado quatro vezes com água aquecida e imediatamente foi lavado mais duas vezes com cinco litros da solução experimental à temperatura corporal. Após esse procedimento 10 ou 30 litros da solução experimental foi introduzida no rúmen e deixada por 60 minutos. Amostras do fluido ruminal foram coletadas imediatamente após a introdução da solução e a cada 10 minutos, para determinação do pH, osmolaridade e concentração de Co e AGV. Após 60 minutos, o fluido foi removido e teve seu volume medido. Cada combinação de pH (n = quatro), AGV (n = três) e volume (n = dois) da solução foi alocada aleatoriamente aos animais e dias. A taxa fracional de passagem não foi afetada pelo pH ou volume, mas a composição da solução tendeu a afetar a taxa de passagem, apresentando maior passagem quando a solução era composta de 100, 50 e 20mM de acetato, propionato e butirato, respectivamente. Em todos os tratamentos, houve influxo líquido de água para dentro do rúmen. Com o aumento do pH inicial, o influxo líquido tendeu a aumentar. Similarmente o influxo líquido de fluido foi maior quando o volume inicial era mais alto. Como o volume final de fluido é uma função do volume inicial, taxa de passagem e influxo de água, tanto o volume inicial

quanto o pH afetaram significativamente o volume final de fluido. Após 1 hora, o pH do fluido ruminal alcançou um valor final de 8 a 8,2, exceto para as soluções com um pH inicial de 4,5. O pH final foi significativamente mais baixo quando o volume de líquido inicial foi mais alto. A média de osmolalidade inicial do fluido foi de 392 mOsmol/l e não foi relacionada ao pH inicial, volume ou composição da solução. Após 60 minutos, a osmolalidade do fluido caiu e teve média de 288 mOsmol/l. O baixo volume e pH inicial resultaram em baixos valores de osmolalidade, mas nenhum efeito da composição da solução foi detectado. As taxas fracionais de absorção de ácido propiônico e butírico foram mais altas quando o pH inicial foi mais baixo, mas a taxa fracional de absorção de ácido acético não foi afetada pelo pH inicial, embora a taxa estimada de absorção tenha havido tendência de diminuição quando o pH foi mais alto. As taxas fracionais de absorção dos AGV em pH inicial de 4,5 foram em ordem: ácido butírico > ácido propiônico > ácido acético. Em pH 5,4, essa ordem foi ácido butírico = ácido propiônico > ácido acético. Em pH 6,3 e 7,2, nenhuma diferença entre as taxas fracionais de absorção foi detectada. A composição da solução teve um efeito significativo nas taxas fracionais de absorção de ácido acético, e o nível intermediário de concentração (50mM) teve absorção maior do que o nível baixo (20mM). As taxas fracionais de absorção de ácido propiônico tenderam a aumentar com a diminuição de concentração desse ácido presente na solução, mas as taxas fracionais de ácido butírico não foram afetadas. Para todos os AGV, as taxas fracionais de absorção foram mais altas com o volume de 10 litros do que com o de 30 litros de solução. A comparação das taxas fracionais de absorção entre os AGV em pH 6 sugerem um potencial máximo de absorção mais alto para ácido butírico do que para os outros dois ácidos e mais alto para ácido propiônico do que para ácido acético. Com a diminuição do pH, a taxa fracional de absorção

de ácido butírico aumentou mais do que a dos outros dois ácidos e a do ácido propiônico aumentou mais do que a do ácido acético (Dijkstra et al., 1993).

A partir de então, ficou definitivamente estabelecida a importância do pH, concentração de AGV e volume de líquido, o qual representa indiretamente a superfície de absorção no *clearance* ruminal dos AGV. Outro fator importante foi a indicação de que as concentrações relativas de AGV no fluido ruminal podem não representar as taxas relativas de produção e que tentativas para estimar produção individual de AGV a partir de digestão de substratos devem levar em conta o pH e a concentração de AGV.

Um outro fator importante na cinética de *clearance* ruminal de AGV é a pressão osmótica. Lopez et al. (1994) estudaram o efeito da mudança da pressão osmótica ruminal na cinética de água no rúmen de carneiros nutridos por infusões intragástricas. Foram estabelecidas as variações na taxa de passagem de fluido, na absorção aparente de água e absorção de AGV induzidas pela infusão de sais minerais (NaCl) em diferentes concentrações. Foram conduzidos dois experimentos, nos quais a pressão osmótica ruminal foi alterada por infusões de NaCl dentro do rúmen. Quatro carneiros com cânulas ruminais e cateteres abomasais foram mantidos sem alimentação, nutridos por infusões intragástricas, em um delineamento em quadrado latino. Cada período experimental consistiu de um dia. Em cada dia experimental, a pressão osmótica foi modificada e mantida estável por nove horas e meia. Marcadores de fase fluida foram administrados e amostras foram coletadas a diferentes intervalos. A principal diferença entre os experimentos foi a raça dos carneiros e as pressões osmóticas impostas. No experimento 1 as pressões osmóticas foram 300, 340, 380 e 420 mOsmol/kg. No segundo experimento, as pressões osmóticas foram 260, 350, 420 e 490 mOsmol/kg. Na pressão osmótica de 260 mOsmol/kg, no experimento 2, nenhum NaCl foi infundido no rúmen e a pressão osmótica foi aquela naturalmente observada quando os animais foram

mantidos no nível basal de AGV e infusões de tampão. Após a recuperação cirúrgica, infusões intragástricas de nutrientes foram introduzidas progressivamente durante 10-12 dias em um período de adaptação em que os alimentos sólidos foram retirados na segunda metade desse período. Os carneiros foram mantidos em gaiolas de metabolismo e nutridos por infusões intraruminais de uma solução de AGV com acetato (650 mmol/mol de AGV totais), propionato (250 mmol/mol de AGV totais) e butirato (100 mmol/mol de AGV totais). A solução também continha macrominerais (Ca, P e Mg) e separadamente era infundida uma solução tampão intraruminal. Foram realizadas também infusões intra-abomasais de uma solução de caseína, vitaminas e microminerais. Para manter a pressão osmótica desejada, NaCl foi infundido continuamente em diferentes concentrações. A pressão osmótica era monitorada a cada cinco a trinta minutos, dependendo da estabilidade, e a concentração da solução salina era modificada conforme a necessidade. Inicialmente uma amostra de fluido ruminal foi coletada com uma seringa e depois foi injetado Cr-EDTA através da cânula e misturado ao conteúdo ruminal por três minutos, quando, então, foi coletada outra amostra de fluido ruminal. Nessa ocasião, foi coletada também uma amostra de fluido abomasal através do cateter normalmente usado para infusões. Quando as amostras eram coletadas, essas tinham seu pH e pressão osmótica determinados. No experimento 1, em cada tempo de coleta, foram também coletadas amostras de urina (determinação de pH e pressão osmótica) e de sangue (determinação de pressão osmótica e composição de sólidos totais no plasma). No experimento 1, não houve efeito significativo da pressão osmótica ou tempo de coleta no volume de líquido ruminal. Apesar disso, parece que alta pressão osmótica foi associada com aumento no volume de fluido ruminal. No experimento 2, houve um efeito linear, tendo o aumento da pressão osmótica levado ao aumento do volume de líquido ruminal. Em ambos experimentos, quando houve aumento de

volume de fluido, esse foi completo após três horas e meia de manutenção da pressão osmótica. Em ambos os experimentos, o aumento da pressão osmótica foi associado à maior saída de líquido do rúmen, quando expresso como taxa ou como fluxo absoluto. Houve efeito linear do tempo no fluxo absoluto de fluido para fora do rúmen em ambos os experimentos. Uma vez que a taxa de infusão de água no rúmen foi constante, um relacionamento similar, porém, inverso, foi observado na absorção aparente de água. A pressão osmótica ruminal afetou o movimento líquido de água através do epitélio ruminal, determinando sua extensão e direção. Assim, em baixos valores de pressão osmótica existiu pouco efeito líquido de absorção de água através da parede do rúmen, mas quando a pressão foi de 340 mOsmol/kg ou maior, existiu um influxo de água para o rúmen oriundo do fluxo de saliva ou diretamente do plasma através da parede do rúmen. Em ambos os experimentos, o pH diminuiu linearmente à medida que a pressão osmótica aumentou. A mudança de pressão osmótica no rúmen não afetou a concentração de AGV no rúmen, embora os valores tendessem a ser mais altos com alta pressão osmótica. Houve efeito linear significativo da pressão osmótica na proporção molar de AGV, demonstrando um aumento na proporção de acetato e diminuição na proporção de propionato e butirato à medida que a pressão osmótica aumentou. Houve efeito da pressão osmótica nas taxas de absorção de AGV com uma resposta linear e uma quadrática em relação à pressão osmótica. A taxa de absorção foi sempre mais alta na pressão osmótica de 350 mOsmol/kg e, para pressão osmótica mais alta, houve um declínio linear na taxa de absorção de AGV à medida que a pressão osmótica aumentou. Em relação à absorção dos AGV individuais, as taxas de absorção refletiram o que ocorreu na concentração, com diminuição da absorção de acetato e aumento na absorção de propionato e butirato à medida que a pressão osmótica aumentou. A pressão osmótica da urina passou de cerca de 375 para cerca de 600 mOsmol/kg e a pressão osmótica do plasma aumentou com o

aumento do teor de NaCl infundido e a variação do teor de sólidos refletiu a desidratação que ocorreu nos animais submetidos a altas doses de salina.

Krehbiel et al. (1995) examinaram o efeito da acidose severa induzida por infusão intraruminal de glicose na taxa de absorção ruminal de AGV e na atividade plasmática das enzimas pancreáticas em ovelhas. Vinte ovelhas com cânula ruminal e cateter na veia jugular foram usadas em um delineamento inteiramente casualizado. Os animais receberam, *ad libitum*, uma dieta contendo 50% de concentrado na base seca. A acidose ruminal foi induzida por infusões de glicose, via cânula, nas doses de zero, seis, doze e dezoito gramas por quilo de peso corporal. Amostras de fluido ruminal foram coletadas zero, quatro, oito, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 horas após a administração de glicose. Dez dias após a indução da acidose ruminal, procedeu-se à determinação das taxas fracionais de absorção de AGV e de passagem de fluido. Essas mensurações foram repetidas aos três e aos seis meses após a indução da acidose ruminal. A magnitude da diferença na taxa de passagem de líquido, no décimo dia, foi maior entre os animais que receberam zero e 18 gramas de glicose por quilo de peso vivo. Portanto, as mensurações subseqüentes foram repetidas apenas nos animais desses dois tratamentos. Na manhã de cada período experimental, o conteúdo ruminal foi evacuado e o rúmen foi lavado com água aquecida. Quatro litros de uma solução hipotônica contendo concentrações equimolares (60 mM) de acetato, propionato e butirato e dois e meio por cento de Cr-EDTA foram colocados dentro do rúmen. Amostras de 20 ml de fluido foram coletadas a cada meia hora nas primeiras quatro horas após infusão e uma vez a cada hora por mais duas horas. Uma alíquota de 20 ml da solução foi retida para determinar a concentração inicial de AGV e Cr. A concentração total de ácidos orgânicos ruminais foi calculada como a soma das concentrações totais de AGV, L(+)-lactato, e D(-)-lactato. O aumento da dose de glicose de zero para 18 g/kg de PV aumentou severamente a acidose ruminal demonstrada por

diminuição do pH ruminal e aumento na concentração total de ácidos orgânicos ruminais. A concentração de AGV ruminais diminuiu e as concentrações ruminais de L (+) lactato e D (-) lactato sofreram interação entre tratamento e tempo em resposta ao aumento da dose intraruminal de glicose. O aumento da glicose ruminal resultou em resposta linear e quadrática da concentração de acetato. A concentração de acetato diminuiu à medida que aumentou a dosagem de glicose de 0 para 12 g/kg de PV, mas foi semelhante entre 12 e 18 g/kg de PV. A concentração ruminal de propionato sofreu resposta quadrática; a concentração aumentou quando a dose de glicose aumentou de 0 para 6 g/kg de PV, mas diminuiu quando a dosagem de glicose passou para 12 e 18 g/kg de PV. As concentrações de butirato e metil-butirato também responderam quadraticamente; as concentrações diminuíram quando a dose de glicose foi de seis ou 12 g/kg de PV, mas quando a dose foi 18 g/kg de PV, as concentrações foram semelhantes às do controle. O pH sanguíneo declinou agudamente 8 a 12 horas após a administração de glicose, mas retornou ao normal à medida que o pH ruminal aumentou. As concentrações plasmáticas de L (+) lactato não foram afetadas pela acidose ruminal. Em contrapartida, as concentrações plasmáticas de D (-) lactato aumentaram linearmente com o aumento da severidade da acidose ruminal. A atividade plasmática da lipase e amilase não foi influenciada pela administração de glicose. Entretanto, houve uma interação entre tratamento e tempo na atividade da amilase plasmática. As taxas fracionais de absorção e passagem de fluido não foram afetadas pelo aumento da glicose ruminal aos 10 dias após a administração. Aos três meses após a indução de acidose, a taxa de passagem de fluido não foi afetada pela administração de glicose. A taxa fracional de absorção de propionato foi mais baixa aos três meses após acidose nos animais que receberam 18 g/kg de PV de glicose, mas as taxas fracionais de absorção de acetato e butirato não foram afetadas. Aos 6 meses após a acidose ruminal, os animais que receberam 18 g/kg de PV de

glicose tiveram taxa de passagem de líquido mais baixa do que os animais-controle. Quando expressas como porcentagem das taxas fracionais ocorridas nos animais-controle, houve redução de 36 e 43% das taxas fracionais de absorção de AGV aos 3 e aos 6 meses após a indução da acidose, respectivamente.

2.4.2.3 Infusão contínua de AGV em rúmen de animais consumindo alimentos

Infusões contínuas de soluções de AGV em rúmen não-evacuado e em animais que estejam consumindo alimentos normalmente podem ser usadas para determinação das taxas fracionais de *clearance* de AGV do ruminoretículo. Essas infusões são feitas por uma bomba peristáltica e amostras de fluido ruminal são coletadas ao longo do tempo. O cálculo das taxas de *clearance* é feito considerando as concentrações de AGV da solução infundida e do fluido ruminal coletado ao longo do tempo. O inconveniente desse tipo de técnica é a dificuldade de se trabalhar com grande número de unidades experimentais, principalmente vacas leiteiras, sem tirá-las da rotina do processo produtivo.

Nesse tipo de técnica são usados marcadores de passagem de fase fluida para determinação do desaparecimento de AGV por passagem para o omaso, bem como marcadores que permitam separar o AGV infundido do AGV produzido. Esses últimos normalmente são isótopos de carbono.

2.4.2.3.1 Considerações sobre isótopos de carbono

Os isótopos são átomos cujo núcleo contém o mesmo número de prótons, mas um número diferente de nêutrons. O termo isótopo significa mesmo local, indicando que esses ocupam a mesma posição na tabela periódica. Apenas 21 elementos na tabela periódica são elementos puros, ou seja, têm apenas um isótopo estável. Todos os outros elementos são misturas de pelo menos dois isótopos. O Carbono tem dois isótopos estáveis, que são o ^{12}C e o ^{13}C , o qual contém um próton extra no seu núcleo. A proporção que esses isótopos ocorrem pode variar substancialmente (Analysis, 2002).

Os isótopos são divididos em duas categorias: os radioativos e os estáveis. O núcleo dos isótopos radioativos desintegram-se espontaneamente para formar um átomo de um outro elemento, ocorrendo, algumas vezes, emissão de radioatividade perigosa (Analysis, 2002). A concentração de isótopos radioativos em uma amostra está em constante diminuição ao longo do tempo (Yeh & Wang, 2001). Os isótopos estáveis têm o núcleo estável e não oferecem riscos fisiológicos conhecidos (Analysis, 2002) e sua concentração na amostra é função de suas propriedades termodinâmicas. Os isótopos e compostos isotópicos são entidades químicas diferentes. As diferenças são pequenas e geralmente diminuem com o aumento do peso atômico (Yeh & Wang, 2001).

O uso de isótopos estáveis tem várias aplicações em pesquisa nos mais diversos campos. Nessas aplicações deve-se considerar duas categorias de isótopos estáveis: aqueles que ocorrem em abundância natural e aqueles de caráter investigatório (marcadores). Esses últimos são materiais manufacturados com concentrações elevadas de isótopos pesados, por exemplo, a abundância natural do ^{15}N no ar é de 0,366%, ao passo que um marcador manufacturado, como o nitrato de amônia utilizado em pesquisas agronômicas, pode conter 99% de ^{15}N (Analysis, 2002). O valor médio para a abundância natural do ^{13}C é 1,1080% em pedra calcárea, 1,0867 % em plantas C_3 , 1,1023% em plantas C_4 ,

1,1030% no CO₂ atmosférico e 1,1112% em uma rocha calcárea oriunda da Carolina do Sul, composta de Belemnite (*Belemnite Americana* - Pee Dee Belemnite – PDB), a qual é usada como padrão de referência mundial para comparação da concentração de ¹³C entre os diferentes materiais (Yeh & Wang, 2001). A seguinte fórmula é usada para se relatar a abundância relativa de isótopos estáveis no carbono e, da mesma maneira, é utilizada para outros elementos, com o objetivo de permitir comparações entre diferentes laboratórios:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{amostra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \right] - 1 \times 10^3$$

O padrão usado para reportar o valor de $\delta^{13}\text{C}$ é a proporção ¹³C/¹²C da rocha calcárea da Carolina do Sul (PDB). Os valores podem ser positivos ou negativos. Um valor positivo significa que a amostra contém mais ¹³C do que o padrão e vice-versa. Diferenças de composição de isótopos de carbono entre amostras é a diferença entre os seus valores de $\delta^{13}\text{C}$, sendo conhecido como valor delta (Δ) e também pode ser positivo ou negativo:

$$\Delta = (\text{valor } \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ da amostra A}) - (\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ da amostra B}).$$

Quando o delta é positivo, significa que a amostra A tem maior teor de ¹³C do que a amostra B e vice-versa (Yeh & Wang, 2001).

Um dos principais fatores que determinam o valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ das plantas é esse valor na fonte de CO₂, que pode variar significativamente. As plantas terrestres captam o CO₂ do ar de um determinado ambiente, que pode ter uma atmosfera normal ou modificada. As atmosferas modificadas podem conter grande quantidade de CO₂ geradas a partir do carbono orgânico ou baixas concentrações como consequência de fixação ativa de carbono por fotossíntese. Um outro fator determinante do valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de uma planta é o transporte do CO₂ desde o ar ambiente até o sítio onde ocorre a carboxilação. Deve ser enfatizado que em cada passo dessa migração existe um valor de delta

específico e esses valores são apenas parcialmente conhecidos, sendo necessárias maiores pesquisas nessa área (Yeh & Wang, 2001). Nos tecidos vegetais terrestres, a principal fonte de variação de ^{13}C é derivada das diferentes rotas de fotossíntese para a fixação de dióxido de carbono (Analysis, 2002). As plantas incorporam o dióxido de carbono por três mecanismos diferentes: pela rota do ciclo de Calvin, que ocorre nos chamados vegetais C_3 , predominantes em climas frios, nos quais o primeiro passo na fixação do carbono é a reação do CO_2 com a ribulose-1,5-bifosfato para formar 3-fosfoglicerato, mas a enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), que catalisa a reação, não é eficiente em especificar o uso de CO_2 em detrimento do O_2 , ocorrendo, portanto, reações improdutivas de oxigenase, implicando em desperdício energético. O outro mecanismo é a rota utilizada pelas maior parte das plantas tropicais, bem como as plantas de cultivo agrícola da zona temperada, mas originárias dos trópicos, como o milho, a cana-de açúcar e o sorgo, os quais são chamados de vegetais C_4 . Essas plantas desenvolveram um mecanismo para evitar perda de energia pela fotorrespiração. Nessas plantas, o último passo da fixação de CO_2 em um produto de três átomos de carbono, 3-fosfoglicerato, é precedido por vários passos, nos quais um deles é uma fixação preliminar de CO_2 em um composto de 4 átomos de carbono (Lehninger et al., 1995). Um terceiro processo ocorre no caso da rota do metabolismo ácido das crassuláceas – MAC. Esse processo ocorre em dois tempos distintos: fixação noturna do CO_2 formando ácido dicarboxílico, o qual é estocado nos vacúolos; durante o dia, esse ácido é descarboxilado e o CO_2 se torna disponível para ser processado pela via das pentoses-fosfato no cloroplasto da mesma célula (Larcher, 2000). A rota C_3 resulta em grande mudança nas proporções dos isótopos do carbono em relação ao dióxido de carbono atmosférico (Yeh & Wang, 2001). Nessa rota, a fixação de carbono é consumada quando o CO_2 combina com a ribulose 1,5 bifosfato para gerar duas moléculas de açúcar de três carbonos. Essa reação é

catalisada pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase e o valor de delta para essa carboxilação é -29‰ . A rota C_4 produz uma mudança muito menor e, no caso desse tipo de planta, o CO_2 primeiro combina com o fosfoenolpiruvato para formar oxaloacetato em células mesofílicas. Essa reação de carboxilação é catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase e o valor de delta é -2‰ (YEH e WANG, 2001). Parece que a enzima ribulose bifosfato carboxilase, na rota C_3 de fotossíntese, tem maiores restrições ao uso do $^{13}\text{CO}_2$ do que a fosfoenolpiruvato carboxilase na rota C_4 . Como resultado, o conteúdo de ^{13}C nas plantas C_4 é maior do que nas plantas C_3 (O'Leary, 1981 citado por Liang et al., 1998). As plantas MAC facultativas usam ambas as rotas de fixação de carbono e as MAC obrigatórias usam a rota C_4 . Dessa maneira, o valor delta depende da importância relativa das rotas C_3 ou C_4 empregadas na carboxilação da planta e a amplitude de variação está entre os valores encontrados em C_3 e C_4 (Yeh & Wang, 2001).

O valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de amostras de folhas de plantas, o qual reflete bem o da planta inteira, varia de -8 a -30‰ . Essa variação, além de ser uma consequência das diferentes rotas metabólicas, é secundariamente atribuída a condições genéticas da planta e condições ambientais sob as quais a fixação do carbono acontece. As variações genéticas poderiam estar relacionadas a diferenças na eficiência de fotossíntese, estrutura da folha, etc. Condições ambientais que influenciem o transporte de CO_2 podem resultar em diferenças isotópicas, como, por exemplo, a temperatura ambiente, a umidade, a proporção O_2/CO_2 da atmosfera, as características de irradiação, as condições físico-químicas do solo, o vento, etc. Para as plantas C_3 , a variação nos valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ é de -22 a -38‰ ; para as C_4 , essa variação está entre -8 a -15‰ , e para as CAM, os valores estão entre -13 a -30‰ . Além disso, têm sido encontradas variações consideráveis em amostras de plantas C_3 de uma mesma floresta. Parece que o valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de amostras de folhas pode refletir a história da

origem e crescimento dessas plantas. Existem também variações no valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, principalmente entre os lipídios e outros compostos bioquímicos (proteínas e carboidratos) de um mesmo tecido da planta. Os lipídios têm, geralmente, menor teor de ^{13}C do que os outros compostos da mesma planta. Tem sido mostrado que o processo de síntese de lipídios a partir de carboidratos pode produzir uma grande diferença isotópica. Entre outros compostos, as diferenças são insignificantes, mas já foram demonstradas diferenças consideráveis entre lignina e celulose. Entretanto, as dificuldades técnicas para a separação física entre esses dois compostos requerem que esse assunto seja mais bem estudado (Yeh & Wang, 2001).

O espectrômetro de massa é um instrumento capaz de separar moléculas pela massa ou peso. O espectrômetro de proporção de massa de isótopos (*Isotope Ratio Mass Spectrometer* - IRMS) separa as moléculas baseado na massa e é utilizado para medir proporções de massa de isótopos específicos. O aparelho funciona pela introdução de um gás puro como o N_2 , através de um pequeno orifício, dentro de uma câmara de ionização que é mantida sob alta pressão de vácuo. Uma vez dentro da câmara iônica, um elétron é desnudado pela molécula de gás formando um ion. O ion é lançado para fora da câmara, através de um campo elétrico de alta voltagem, e introduzido em um campo magnético. O ion será submetido à força magnética e percorrerá um trajeto tortuoso associado à sua massa. Os ions que contêm massas mais pesadas são menos desviados do que os de massa mais leve e, então, serão separados na saída do campo magnético. Após a separação os ions são coletados e medidos com a utilização de um detector simples (Analysis, 2002).

Atualmente tem sido usada a espectrometria de massa de alta precisão para determinação da proporção de isótopos estáveis em compostos orgânicos. Esses procedimentos consistem na associação do IRMS com a cromatografia

gasosa de combustão e permite a análise individual, com alta precisão, de compostos orgânicos voláteis presentes em amostras quimicamente complexas (Liang et al., 1998).

2.4.2.3.1.1 Potencialidades do uso de isótopos em pesquisas

Mayes et al. (1984), compararam a taxa de fluxo do CO₂ no sangue de carneiros e a marcação da glicose plasmática quando o [¹⁴C] ou [¹³C] carbonato de sódio, infundidos na veia jugular externa através de bomba peristáltica, foram usados como marcadores. Subseqüentemente, efetuaram infusões simultâneas de [¹⁴C] glicose e [¹³C] carbonato de sódio para checar as transferências de carbono no modelo glicose-CO₂. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes das infusões e a cada hora durante o período de cinco horas de infusões. Houve diferença significativa entre as médias de taxa de fluxo sanguíneo de CO₂ estimadas por ¹³C (193gC/dia) e ¹⁴C (199gC/dia), sugerindo pequena influência da técnica nas estimativas. Não houve diferença entre a proporção média de glicose plasmática derivada do CO₂ sanguíneo quando determinadas por infusão de [¹⁴C] glicose ou [¹³C] carbonato de sódio.

Tyrrell et al. (1984) avaliaram o uso de ¹³C como marcador em estudos de metabolismo, baseando-se apenas na diferença de abundância natural de ¹³C entre as plantas C₃ e C₄. Três dietas foram fornecidas para suprir a manutenção de duas vacas holandesas não-lactantes e não-gestantes. As mesmas dietas foram fornecidas *ad libitum* a quatro vacas holandesas em meio de lactação com o propósito de medir o valor energético de uma dieta de baixa proteína (12%) baseada em silagem de milho comparada com duas dietas contendo 15% de proteína, em que metade da silagem de milho foi substituída por silagem de alfafa tratada ou não tratada com ácido fórmico ou formaldeído na época da

ensilagem. Todas as dietas contiveram 60% da matéria seca de silagem e 40% da matéria seca de concentrado baseado em cevada. Pelos resultados demonstrou-se que a quantidade de carbono em todas as frações medidas, exceto para os tecidos corporais, foi maior para vacas em lactação do que para vacas secas. As dietas não tiveram efeito significativo em qualquer fração de carbono mensurada, exceto aquela sem alfafa, a qual resultou em menos carbono no leite do que as outras duas dietas. O estágio de lactação não afetou o teor de enriquecimento de ^{13}C . Entretanto, nessa variável, houve diferenças significativas entre dietas em todas as frações medidas, exceto no plasma sanguíneo. O valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ das silagens usadas nas dietas foi $-12,4\text{‰}$ para silagem de milho, $-29,9\text{‰}$ para silagem de alfafa não-tratada e $-30,1\text{‰}$ para silagem de alfafa tratada. O valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ do concentrado foi de $-24,8\text{‰}$ na dieta somente com silagem de milho, $-31,0\text{‰}$ na dieta com alfafa não tratada e $31,5\text{‰}$ na dieta com alfafa tratada. Essa diferença se justifica, uma vez que a dieta sem alfafa continha 1,1% de uréia, a qual foi substituída por cevada nas outras duas dietas. O valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ do CO_2 comparado com o valor do carbono ingerido ou metabolizável foi afetado pela dieta. O CO_2 produzido por vacas secas e em lactação que consumiram alfafa tratada apresentou teor mais alto de ^{13}C do que aquele da dieta ingerida, enquanto o CO_2 produzido por vacas que consumiram dieta sem alfafa não teve enriquecimento diferente da dieta ingerida. Vacas que consumiram alfafa não-tratada tiveram valores intermediários. O plasma sanguíneo de vacas que consumiram dietas sem alfafa teve menor teor de ^{13}C do que da dieta consumida, enquanto nas dietas com alfafa o teor de ^{13}C do plasma foi semelhante ao da dieta ingerida. Esse estudo demonstrou que alimentos naturais podem ser usados para formular dietas de bovinos induzindo a diferenças mensuráveis na concentração de isótopos estáveis. Durante a sexta semana de alimentação, o valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ da urina, do CO_2 (exceto nas vacas secas alimentadas com alfafa tratada) e do leite

refletiram diferenças dietéticas, mas o mesmo fenômeno não foi observado no carbono do plasma sanguíneo. Esse foi um fato de difícil explicação, uma vez que o carbono da urina, CO₂ e leite passa através do pool de carbono plasmático. O carbono metabolizável pareceu refletir o carbono dietético, indicando pouca diferenciação entre as fontes de carbono dietético através do processo digestivo. O CO₂ produzido por vacas que consumiram alfafa tratada foi significativamente mais enriquecido em ¹³C, indicando que o carbono derivado de silagem de milho é preferencialmente oxidado, ao passo que o carbono derivado da fração não milho da ração, principalmente em alfafa tratada com ácido fórmico e formaldeído contribui menos para gerar CO₂. O leite produzido pelas vacas que ingeriram alfafa tratada, entretanto, não foi deprimido em ¹³C, comparando-se com o carbono dietético ou metabolizável.

Wilson et al. (1988) estimaram a proporção de carbono nos constituintes individuais do leite oriundos da alimentação ou dos tecidos corporais em vacas, tirando vantagem da variação natural que ocorre na taxa de ¹³C : ¹²C presentes em espécies de plantas C₃ ou C₄. A proporção de ¹³C : ¹²C dos constituintes corporais, bem como dos constituintes do leite, refletem a proporção ¹³C:¹²C da dieta ingerida. Utilizando-se essa técnica, os autores tiveram sucesso em várias mensurações, com acurácia razoável e os detalhes são colocados a seguir. Quatro vacas, as quais foram previamente alimentadas com planta C₃ (ryegrass – *Lolium spp* e trevo branco - *Trifolium repens*), foram adaptadas em confinamento recebendo uma dieta composta apenas de material de plantas C₃. Abruptamente substituiu-se para uma dieta composta de materiais oriundos de plantas C₄ (Feno de grama-comprida - *Paspalum dilatatum*, silagem e fubá de milho) por um período de oito a nove dias no início ou no final da lactação. Durante o início da lactação, foi estimado que 54% do C da gordura do leite foi derivado das reservas de gordura corporais em vacas de alto mérito genético. Valores correspondentes para caseína e lactose foram 34 e 24%,

respectivamente, assumindo-se que foram derivadas das reservas protéicas corporais. Em contrapartida, AGV presentes na gordura do leite foram quase inteiramente derivados de fontes dietéticas. A contribuição proporcional de C oriundo de tecidos corporais para os constituintes individuais do leite variou consideravelmente entre os animais e foi provavelmente associado ao mérito genético ou ao tamanho das reservas corporais disponíveis para mobilização. No estágio final da lactação, quando as vacas atingiram equilíbrio no balanço protéico e energético, a contribuição do C oriundo dos tecidos corporais para a formação da gordura, caseína e lactose do leite ficou em torno de 19, 19 e 8%, respectivamente. A perda estimada de C endógeno nas fezes foi 12 e 9% no início e final da lactação, respectivamente. Para a perda urinária de C endógeno, os valores foram 23% no início e 15% no final da lactação (Wilson et al., 1988). Estava estabelecido que a utilização de isótopos estáveis constituía ferramenta de uso ilimitado em experimentos de nutrição animal.

Considerando que características específicas da digestão de ruminantes ainda não tinham sido estudadas, utilizando-se a relação $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$, Metges et al. (1990) estudaram as mudanças do conteúdo de ^{13}C no leite, soro, CO_2 da respiração e nos produtos da fermentação ruminal em resposta às variações sistemáticas do conteúdo de ^{13}C das dietas. Seis vacas leiteiras de duas raças foram alimentadas durante três períodos alternados com produtos oriundos de plantas C_3 e C_4 para induzir enriquecimentos diferentes no teor de ^{13}C da dieta. Antes do período experimental, as vacas foram alimentadas com uma dieta composta por plantas C_3 e C_4 , em que aproximadamente metade da energia foi suprida por silagem de milho. O resto da energia foi suprida com feno, silagem de gramínea e concentrados. No período experimental, duas dietas principais foram usadas, baseadas em plantas C_4 e plantas C_3 , as quais forneciam extremos de enriquecimento de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C} -13,7 \text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C} -28,0 \text{‰}$, respectivamente). Amostras de cada componente da ração foram tomadas no início e no final do

período. Amostragem do leite foi feita diariamente e a amostragem do CO₂ da respiração foi feita semanalmente, mas no período de transição entre as duas dietas, foi feita diariamente. Amostras de sangue foram obtidas de uma veia do úbere e foram coletadas no final dos períodos em que foram fornecidas as dietas principais. Para a simulação da fermentação ruminal, 50 ml de fluido ruminal foram coletados de carneiros fistulados que comiam 400 g de feno e 600 g de concentrado por dia. O conteúdo foi incubado anaerobicamente a 39°C na presença de tampão-fosfato e substrato. Um dispositivo foi usado para coletar o CO₂ e CH₄ oriundos da fermentação. Os AGV presentes no meio de incubação foram isolados antes e depois da fermentação. Esses foram destilados, neutralizados, secos e queimados a CO₂, o qual foi analisado para detecção do conteúdo de ¹³C. As mudanças nas dietas induziram alterações correspondentes no valor δ¹³C no CO₂ da respiração. O teor de ¹³C do CO₂ da respiração de vacas que ingeriram dieta de planta C₄ foi igual ao da dieta ou levemente enriquecido. Nas vacas que ingeriram dietas de plantas C₃, entretanto, o CO₂ da respiração encontrava-se fortemente enriquecido em ¹³C (4-5 ‰), comparando-se com a dieta. O mesmo aconteceu nos animais ingerindo a dieta pré-experimental. Em razão disso, os fenômenos de fracionamento da fermentação ruminal foram examinados para se estabelecer uma estimativa do balanço isotópico do metabolismo do carbono em vacas. Considerando que variáveis, como fluxo de deposição de gordura e produção de gás, requeridas para o estabelecimento de um balanço isotópico, são complicadas para se medir *in vivo*, os autores separaram a fermentação ruminal do metabolismo tissular. Isso foi baseado na fermentação *in vitro* de vários alimentos, seguida por análise isotópica do CO₂, CH₄ e AGV gerados. A maior discriminação isotópica de carbono foi observada no processo de fermentação. Comparando-se com o teor de enriquecimento em ¹³C dos substratos C₃ ou C₄, o metano produzido pela fermentação foi extremamente menos enriquecido (δ¹³C 43,1 e 44,2 ‰ mais

negativo), mas o CO₂ gerado foi bem mais enriquecido ($\delta^{13}\text{C}$ 18,5 e 10,9 ‰, mais positivo). O CO₂ atua como acceptor de hidrogênio na formação de metano e existe uma grande discriminação ao uso de ¹³C nessa reação. Conseqüentemente, o metano formado será bem menos enriquecido e o CO₂ remanescente tende a ser mais concentrado em ¹³C. Em relação aos AGV, o enriquecimento foi semelhante quando foram usados substratos C₃, mas estavam menos enriquecidos quando o substrato era oriundo de plantas C₄. Os autores cogitam que isso pode estar relacionado ao uso de fluido ruminal de carneiros que estavam sendo alimentados com plantas C₃ e pode representar uma situação similar à influência do pool endógeno ocorrida nos experimentos *in vivo* (Metges et al., 1990). Esse trabalho, até então, foi o mais completo e elucidativo em relação à fisiologia nutricional do ruminante e suas interfaces em relação ao balanço isotópico de carbono.

Argumentando que a marcação de plantas com as formas isotópicas do carbono apresentava grande potencial, Svejcar et al. (1990) propuseram um procedimento para marcar plantas com ¹³CO₂ que pudesse ser adaptado às condições de campo ou laboratoriais. Usando espectrometria de massa de isótopos, diferenças isotópicas pequenas como 0,4 µg de ¹³C puderam ser detectadas em cheatgrass (*Bromus tectorum* L.) de 23 dias. O mérito desse experimento foi demonstrar mais uma vez que a relação ¹³C : ¹²C poderia ser usada de diversas maneiras em variados tipos de experimentos.

Em outro experimento do mesmo grupo, Svejcar et al. (1993) enriqueceram alfafa com ¹³C e alimentaram carneiros com feno oriundo dessas plantas para demonstrar o potencial do uso dessa técnica em estudos de nutrição e metabolismo. A alfafa foi marcada no campo com ¹³CO₂ 99 atom% e cortada no mesmo dia ou 30 dias após a marcação. A alfafa cortada no mesmo dia continha 84% do ¹³C no conteúdo celular, enquanto a cortada com 30 dias continha 47%. O feno dessas plantas foi fornecido, *ad libitum*, a seis ovelhas. A

proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foi determinada na respiração, fezes, sangue e soro sanguíneo das ovelhas que ingeriram feno cortado no primeiro dia e em sangue e fezes das ovelhas ingerindo feno da alfafa cortada aos 30 dias de tratamento. Nos animais que consumiram alfafa cortada no primeiro dia, houve o pico de ^{13}C no CO_2 da respiração, quatro horas depois da alimentação, declinando para o teor basal em 40 horas após a administração. O conteúdo de ^{13}C nas fezes aumentou levemente entre 12 a 40 h após a ingestão. Os valores do $\delta^{13}\text{C}$ no soro sanguíneo aumentou em aproximadamente 5 ‰ de zero a quatro horas após a ingestão e permaneceu relativamente constante depois disso. Os valores de ^{13}C no sangue total foram constantes. Nos animais que ingeriram alfafa cortada com 30 dias, o pico de ^{13}C nas fezes ocorreu 30 a 36 horas após a dosagem, declinando a seguir. Isso demonstrou que quando incorporado ao material da parede celular o ^{13}C aparecia em maiores quantidades nas fezes do que quando presente apenas no conteúdo celular da forragem marcada. Quando o conteúdo celular solúvel foi marcado com ^{13}C , o marcador foi detectado no CO_2 da respiração logo após a ingestão. Esses resultados demonstraram a exequibilidade do uso de forragens marcadas com ^{13}C em estudos de metabolismo e nutrição.

Greathead et al. (2001) utilizaram [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetato para mensurar a lipogênese em ruminantes *in vivo*, com infusão intravenosa contínua dessa substância. Em um ensaio, os autores avaliaram a incorporação [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetato no tecido adiposo de um carneiro e um novilho de corte mantidos em condições de *steady state* metabólica. Amostras de tecido adiposo obtidas por biópsia durante as seis horas de infusão contínua de [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetato demonstraram que a incorporação dessa substância nos lipídios do tecido adiposo subcutâneo foi linear durante o período de infusão. Em outro ensaio, mensurações das taxas de incorporação de [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetato nos lipídios do tecido adiposo foram feitas em amostras desse tecido tomadas em um único tempo durante o período de

infusão. Dessa vez, a técnica foi usada para medir a taxa de lipogênese no tecido adiposo subcutâneo de 24 novilhos de corte alimentados com dieta de gramínea peletizada em quantidade variando desde 1,1 vez a energia metabolizável requerida para a manutenção até a ingestão *ad libitum* por 11 semanas. As taxas de lipogênese aumentaram linearmente com o aumento da ingestão de energia metabolizável. Os autores concluíram que o método é uma técnica efetiva para mensuração das taxas de lipogênese em depósitos de tecido adiposo específicos em ruminantes *in vivo*.

2.4.2.3.2 Infusão contínua de isótopo radioativo como marcador

A utilização de isótopo radioativo permite determinação das taxas de produção e desaparecimento de AGV ruminais e também o acompanhamento do carbono marcado nas rotas metabólicas que ocorrem no animal. O manuseio desse tipo de composto, entretanto, acarreta risco à saúde humana e exige um aparato tecnológico bastante específico.

Rowe et al. (1979), trabalhando com carneiros adultos com cânula ruminal recebendo dieta baseada em melaço, fizeram infusões de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ou $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ acetato no rúmen ou de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ no sangue com dois dias de intervalo. Cada período de infusão durou 12 horas e amostras de fluido e sangue foram retiradas a cada hora durante as últimas 6 horas de infusão. Os autores observaram que 44 g de C por dia entrou no pool de CO_2 do sangue a partir de acetato. Houve transferência direta considerável do carbono presente no acetato ruminal para o CO_2 ruminal (6g de C por dia). Quatorze por cento do acetato foi oxidado no rúmen.

Muito já havia sido feito tentando-se elucidar os mecanismos envolvidos na produção e *clearance* de AGV do ruminoretículo. A

diferenciação entre os dois fatores de *clearance* (absorção e passagem) e a quantificação da participação de cada fenômeno no processo, em bovinos que ingeriram grandes quantidades diárias de MS foi realizada em dois experimentos publicados no início da década de 90. Peters et al. (1990a) objetivaram estabelecer a variação de pH do fluido ruminal, a concentração de propionato e fluxo de líquido ocorrendo em novilhos de corte com alimentação dividida em 8 refeições diárias. Propuseram também determinar o desaparecimento ruminal por absorção e passagem de ácido propiônico nesses animais, os quais tinham alta taxa de produção desse ácido. Três bovinos machos com cânula ruminal foram alimentados a cada três horas com uma dieta contendo, na base seca, 54% de feno e 46% de concentrado à base de milho em quantidade suficiente para suprir as exigências de manutenção. Para a determinação da produção basal de propionato, *in situ*, foi dada uma dose de 6,30 g de LiCrEDTA (Uden et al. 1980) como marcador de fase líquida, juntamente com uma dose de 1-¹⁴C-propionato (270 µCi; 50 µCi/ µmol). Essa solução foi misturada ao conteúdo dentro do rúmen aproximadamente 1 hora antes da primeira refeição do dia. Essa dose continha 1-¹⁴C-propionato suficiente para elevar a atividade específica do propionato ruminal para aproximadamente 1,500 dpm ¹⁴C/ µmol de propionato. Após a mistura, iniciou-se infusão contínua de uma solução contendo os mesmos marcadores (135 mg de cromo/h e 81,5 µCi/h; 50 µCi/ µmol de 1-¹⁴C-propionato). A taxa de infusão ruminal foi de 0,34 litros por hora, calculada para promover condições de *steady state* para concentração de cromo e para radioatividade específica do propionato. O conteúdo ruminal foi misturado uma vez a cada hora, bem como imediatamente antes de cada amostragem. Amostras de conteúdo ruminal de cinco locais do rúmen foram retiradas manualmente e iniciaram-se duas horas e meia após a primeira refeição do dia e a cada 30 minutos até sete horas após a primeira refeição, perfazendo um total de dez amostras. As infusões de

marcadores foram interrompidas antes da última amostragem, mantendo-se apenas infusão de água. Para monitorar o desaparecimento de Cr e ^{14}C , uma amostra foi coletada a cada hora por mais 4 horas após interrupção das infusões. Para simular uma produção elevada de propionato, outro ensaio foi realizado. Em cada dia experimental, foi dada uma dose de LiCrEDTA e ácido propiônico tamponado não marcado com radioisótopo. Essa solução foi misturada ao conteúdo dentro do rúmen em cada um dos três animais, aproximadamente 1 hora antes da primeira refeição do dia. Essa dose continha uma quantidade de ácido propiônico calculada para elevar a quantidade de propionato ruminal de 2 a 9 vezes acima da concentração basal, estabelecida previamente. Após a dosagem inicial, iniciou-se infusão contínua de LiCrEDTA e ácido propiônico tamponado à taxa de 0,34 litros por hora. O pH da solução infundida foi ajustado para 5,7 pela adição de uma mistura de sais inorgânicos. As amostragens foram conduzidas como descrito previamente. A produção de ácido propiônico *in situ*, determinada pela infusão contínua de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -propionato, foi 142 mmol/hora. A meia vida ruminal de ácido propiônico foi estimada em uma hora e meia e a taxa de fluxo de líquido foi três litros e oitocentos mililitros por hora. Independentemente da taxa de produção (basal ou infundida), aproximadamente 66% do ácido propiônico desapareceram presumivelmente por absorção e 34% passaram do ruminoretículo para os compartimentos subsequentes do trato gastrointestinal juntamente com a fase líquida. A absorção e a concentração de propionato foram relacionadas linearmente com a sua taxa de produção. A passagem de fluido também foi relacionada com a taxa de produção, mas não houveram evidências suficientes para concluir que a taxa fracional de diluição ou volume ruminal foram relacionadas similarmente. Quando a produção ruminal de ácido propiônico foi elevada, o rúmen teve uma capacidade adicional para remover propionato, mas a taxa fracional de remoção parece ser constante. Os autores concluíram que o trato digestivo distal ao

ruminoretículo era provavelmente um importante sítio de absorção de propionato em bovinos, quando a taxa de produção desse ácido era alta (Peters et al., 1990a).

Outro experimento importante publicado na mesma época do anterior foi realizado por Peters et al. (1990b), no qual foi investigado o desaparecimento de ácido propiônico ocorrendo antes do intestino e no intestino delgado de novilhos de corte. Apesar de não ter havido uso de isótopos radioativos nesse ensaio, os autores tomaram como referência a produção basal de propionato estabelecida no experimento anterior, por infusão contínua de propionato marcado com ^{14}C . Quatro novilhos com cânula ruminal, duodenal e ileal foram alimentados oito vezes ao dia para suprir as exigências de manutenção em energia, proteína e minerais pelo menos duas semanas antes do início do experimento. A dieta, na base seca, consistiu de 54% de feno moído e 46% de concentrado à base de milho. A água esteve disponível *ad libitum* exceto durante o experimento, quando essa foi retirada durante as infusões e durante a coleta de amostras. Os tratamentos simularam níveis de produção de propionato acima das concentrações basais estabelecidas no experimento de Peters et al. (1990a). Em cada experimento, uma dose inicial contendo um marcador de fase líquida (LiCrEDTA – aproximadamente seis gramas de cromo) e ácido propiônico tamponado foi administrada dentro do rúmen de cada um dos quatro novilhos e misturadas manualmente. Imediatamente após a administração da dose inicial iniciou-se infusão contínua, à taxa de 0,34 litro por hora, de uma solução que continha os mesmos componentes. A quantidade de propionato infundida foi 142, 567 ou 997 mmol/h. Amostras foram coletadas nas três cânulas antes da dose inicial, a cada 30 minutos nas primeiras 10 horas e a cada 20 minutos entre 18 e 23 h e 40 minutos após o início das infusões. O fluxo de líquido foi 2,75 l/h no rúmen, 3,57 l/h no duodeno e 0,92 l/h no íleo e não foi afetado pela taxa de produção de propionato. A diferença entre os sítios de

coleta foi significativa, refletindo adição de líquido entre o ruminotécio e o duodeno e remoção de líquido dentro do intestino delgado. Independente do nível de produção de propionato, o desaparecimento desse por absorção no ruminotécio foi 40 a 57% e o restante passou para os segmentos distais juntamente com a fase fluida. Do propionato que deixou o ruminotécio por passagem, 97 a 99% desapareceram antes de atingir o duodeno, independente do nível de produção intraruminal. A passagem de ácido propiônico no duodeno não diferiu do íleo e ambas não diferiram significativamente de zero, não sendo constatada, portanto, absorção de propionato no intestino delgado, a menos que houvesse uma taxa de produção igual à taxa de absorção. Resultados semelhantes foram observados para outros AGV, exceto para a taxa de isobutirato que desapareceu antes do duodeno (47 a 63%), a qual foi mais baixa do que todos os outros AGV (acima de 90%). As concentrações de acetato, isobutirato e butirato diminuíram à medida que se aumentou a quantidade infundida de propionato, mas as concentrações de metil-butirato e valerato não foram afetadas. Os autores concluíram que a absorção de AGV parece não ser um processo biológico limitante em bovinos de corte e que o aumento da capacidade absorptiva do rúmen não necessariamente significaria aumento da performance animal (Peters et al., 1990b), embora essa afirmação não leve em conta os benefícios causados pelo aumento da absorção do epitélio ruminal no controle da acidose ruminal, o que, indiretamente, poderia aumentar a performance de produção

2.4.2.3.3 Infusão contínua de isótopo estável como marcador

Martin et al. (2001) compararam o uso de AGV marcados e não marcados com ^{13}C na determinação da taxa de produção de AGV no rúmen de

carneiros que ingeriram duas quantidades diferentes de matéria seca. Seis carneiros castrados, com cânulas ruminais, receberam dieta com 70% de feno de alfafa e 30% de milho moído, baseados na matéria seca e divididos equitativamente em oito refeições diárias, a intervalos de três horas. Os animais, submetidos a um delineamento em crossover, foram alocados em dois grupos, os quais recebiam 90% ou 45% do consumo *ad libitum*, estabelecido previamente. Cada carneiro recebeu cinco soluções de AGV infundidas continuamente no rúmen por 24 horas à taxa de 250 e 165 ml/h, respectivamente, para os animais com maior e menor nível de ingestão. A primeira infusão, considerada como tratamento-controle, consistiu de sete milimoles por dia de uma solução de [1-¹³C]propionato. As outras quatro soluções foram misturas isoenergéticas (1,9 MJ EM/Kg de matéria seca ingerida) de propionato e butirato não-marcados com isótopo estável em diferentes concentrações por quilo de matéria seca ingerida e são apresentadas a seguir: a) 0,90 mol de butirato; b) 0,60 mol de butirato misturados a 0,45 mol de propionato; c) 0,30 mol de butirato misturado a 0,90 mol de propionato; d) 1,35 mol de propionato. O experimento consistiu de dois períodos de seis semanas divididos em três semanas de adaptação seguidas por três semanas de infusões e coleta de dados. As infusões de cada um dos cinco tipos de soluções foram feitas durante 24 horas em diferentes dias da semana, intercalando-se um ou dois dias entre períodos de infusão. Amostras de fluido foram colhidas dos sacos dorsal, ventral e cranial do rúmen através da cânula. A primeira amostra foi coletada imediatamente antes do início da infusão para ser usada como branco nas análises de ¹³C e Cr-EDTA. Outras seis amostras foram coletadas 16,5, 18, 19,5, 21, 22,5 e 24 horas após o início da infusão. Os tempos de coletas foram escolhidos para permitirem três coletas em momentos de alimentação e três coletas entre refeições. Foram efetuadas análises para AGV, enriquecimento de ¹³C e pressão osmótica. Nas amostras coletadas às 22 horas e

meia após o início da infusão, foi feita a contagem de protozoários. Uma dose única de solução de Cr-EDTA foi infundida em cada carneiro através da cânula imediatamente antes do início de cada infusão de AGV. Amostras de fluido ruminal foram tomadas às 3, 4h30, 6, 7h30, 13h30, 16h30, 19h30 e 22h30 após o início da infusão para determinação de Cr. Pelo desaparecimento exponencial da concentração de cromo no tempo, calcularam-se o volume e a taxa de renovação da fase fluida do rúmen. Após a linearização semilogarítmica, a inclinação da reta representou a taxa de diluição do fluido (h^{-1}), e o volume da fase líquida no rúmen foi calculado a partir do intercepto no tempo zero. Para o estabelecimento da taxa de produção de AGV pela técnica do $[1-^{13}C]$ propionato, os cálculos foram baseados na cinética de diluição do marcador em *steady state*. O fluxo de carbono através do pool de propionato ruminal foi medido e dividido por 3 para obter o fluxo de propionato ruminal por meio da seguinte equação:

(Fração atômica infundida – fração atômica basal) X taxa de infusão

Fração atômica durante a infusão em equilíbrio X 3

A fração atômica é estimada pela equação: $^{13}C = \frac{^{13}C}{(^{12}C + ^{13}C)}$.

Nas estimativas de produção de propionato e butirato pelo método dos AGV não marcados, uma regressão foi usada dividindo-se o intercepto “a” pela inclinação “b” na regressão: $y = a + bx$, em que y representa a concentração (mM) ou proporção molar (%) de propionato ou butirato presentes no fluido ruminal e x é a quantidade de propionato ou butirato infundida (mol/dia). As inclinações da equação de regressão, as quais representam as taxas fracionais de desaparecimento, obtidas a partir da concentração absoluta ou da proporção de propionato ou butirato em relação aos AGV total, bem como suas taxas de infusão, foram testadas por análise de covariância. Em ambos os métodos, as taxas de produção de outros AGV individuais foram obtidas, respectivamente, pela multiplicação da taxa de produção de propionato ou butirato pela proporção entre a concentração do AGV (qualquer) e a concentração de

propionato ou butirato. Os dados foram analisados pelo GLM do SAS e as diferenças foram testadas usando-se o teste de Duncan, sendo consideradas significativas com o $P < 0,05$. Não houve influência das misturas infundidas na digestibilidade da dieta para os dois níveis de ingestão (Martin et al., 2001), sugerindo viabilidade de uso de AGV marcados ou não marcados em experimentos de produção ou absorção de AGV sem afetar o desempenho dos animais. A população de protozoários ruminais permaneceu constante entre tratamentos, sugerindo que as infusões de AGV não desencadearam mudanças significativas no ecossistema microbiano (Martin et al. 2001). Independentemente do nível de ingestão, as inclinações das equações de regressão, obtidas a partir da concentração absoluta ou proporção molar, foram similares para butirato em ambos os níveis de ingestão. Para o propionato, essas taxas fracionais de desaparecimento quando foram estimadas utilizando-se a proporção molar desse ácido em relação ao pool total AGV, apresentaram-se mais baixas do que as taxas calculadas pelo desaparecimento da concentração absoluta de propionato. Isto ocorreu em ambos os níveis de ingestão de propionato. Os autores postularam que essa observação sugeriria um aumento na taxa de absorção de propionato quando houve maior taxa de infusão desse ácido. A quantidade de propionato infundida no tratamento onde esse AGV foi usado puro e sem marcação com ^{13}C foi relativamente alta e correspondeu a 1,4 mol de propionato/Kg de matéria seca ingerida ou 22% da energia metabolizável ingerida pelos animais submetidos ao alto nível de ingestão. Para os animais com menor nível de ingestão esses valores foram de 1,7 mol de propionato/Kg de matéria seca ingerida ou 27% da energia metabolizável ingerida. Outra análise foi feita para determinar a taxa fracional de desaparecimento de propionato, quando esse foi infundido em menor concentração misturado ao butirato. Dessa vez não houve diferença significativa entre as taxas fracionais calculadas pelas diferentes maneiras citadas. Os autores

concluíram, baseados nesses resultados, que podem ocorrer modificações nas condições ruminais quando a quantidade de propionato infundida excede um mmol kg^{-1} de matéria seca ingerida ou 20% da energia metabolizável fornecida pela dieta. Considerando esse fato, esses autores excluíram esse tratamento com altas doses de propionato infundida para efeito de cálculo das taxas de produção de propionato. As estimativas das taxas de produção ruminal para os diferentes AGV calculadas pelo método do propionato e butirato não marcados foram semelhantes, dentro do mesmo nível de ingestão. Essas estimativas, entretanto, diferiram entre o método do propionato e butirato não marcados e o método do propionato marcado com ^{13}C , independente do nível de ingestão dos animais. Os valores foram, em média, 1,5 mais alto quando estimados pelo método do $[1-^{13}\text{C}]$ propionato do que quando estimados pelo método do butirato e propionato não-marcados. Independentemente do método usado para cálculo, as taxas de produção de AGV, expressas em mol/dia, diferiram entre os dois níveis de ingestão. A produção de AGV total foi, em média, 1,7 vez mais alta nos animais submetidos a alto nível de ingestão (1550g de MS) do que naqueles que ingeriram menor quantidade de alimento (810g MS). Ambos os métodos utilizados para a estimativa das taxas de produção de AGV foram baseados na hipótese de que a proporção molar dentro do rúmen reflete as taxas diferenciadas de produção de cada AGV e assume que as taxas de absorção são similares. As taxas de produção individual de cada AGV, calculadas a partir de propionato ou butirato não-marcados, foram semelhantes dentro do mesmo nível de ingestão. Segundo os autores, isso indicou que as taxas fracionais de absorção foram similares entre os diferentes AGV. A taxa de produção média de acetato, propionato e butirato foi de 4,3, 1,3 e 0,9 mol kg^{-1} de matéria seca ingerida, respectivamente. A título de comparação, os autores calcularam a produção de AGV usando o princípio estequiométrico, assumindo que a digestibilidade da matéria orgânica no trato digestivo total é 2% mais alta do

que a digestibilidade da matéria seca, e que a matéria orgânica aparentemente digerida no rúmen é 0,75. Os valores encontrados foram 3,5, 1,1 e 0,8 mol kg⁻¹ de matéria seca ingerida, estando bem próximos das estimativas feitas pelo método dos AGV não-marcados. A taxa de produção do pool total de AGV calculada pela soma das taxas de produção de acetato, propionato e butirato foi 6,5mol kg⁻¹ de matéria seca ingerida, equivalendo a 7,8 MJ de energia metabolizável kg⁻¹ de MS ingerida. Comparando-se com a energia metabolizável ingerida (9.8 MJ ME kg⁻¹ de MS ingerida), a produção de AGV ruminal equivaleu a 79% da energia metabolizável ingerida, estando próximo dos valores citados na literatura. A produção de AGV determinada pelo método do [1-¹³C]propionato mostrou superestimar os valores de produção comparados com aqueles encontrados pelo método dos AGV não-marcados. A taxa de produção de AGV total, calculada pelo método do [1-¹³C]propionato, foi de 15,6 mol/kg de matéria orgânica digestível, contra 10,0 mol calculados pelos AGV não-marcados. A produção de AGV ruminal calculada pelo [1-¹³C]propionato equivaleu a 11,8 MJ EM/Kg de MS ingerida representando 120% do total de energia metabolizável ingerida, enfatizando, assim, a superestimativa das taxas. As taxas de produção individual de cada AGV foram, em média, uma vez e meia mais altas quando estimadas pelo método do [1-¹³C]propionato do que quando estimadas pelo outro método. Os autores discutem que a interconversão de propionato para outros AGV dentro do rúmen, bem como a incorporação na biomassa ruminal poderiam explicar essa superestimativa, embora esses fenômenos sejam de ocorrência pouco provável, baseados em dados da literatura. A revisão elaborada por Sutton (1985), citada por Martin et al. (2001), relata problemas de superestimativa de produção de ácido propiônico quando [1-¹⁴C]propionato foi usado comparado ao uso de [2-¹⁴C]propionato devido à natureza lábil do grupo carboxila ser transformado em ¹⁴CO₂. Na opinião dos autores, a posição onde o propionato foi marcado pelo

¹³C é a razão mais provável da superestimativa devido ao argumento citado acima (Martin et al., 2001).

Nozière et al. (2000) delinearão experimento com o objetivo de determinar se a composição de AGV infundidos intraruminalmente mudaria a quantidade e a composição da energia que alcança a veia porta. Os autores usaram três infusões, que forneceram diferentes perfis de AGV simulando dietas ricas em forragem, ricas em cereais ou ricas em carboidratos solúveis. Foram usadas quatro ovelhas adultas não-lactantes e não-gestantes, com cânula ruminal e com cateteres na artéria mesentérica cranial e nas veias porta e mesentérica cranial. Os animais ingeriram 482 g de MS/dia de feno de gramínea provendo 8,14 MJ/kg de MS de energia metabolizável e 89,5 g/Kg de MS de proteína bruta. Isso significou o provimento de 53 e 54% das exigências líquidas de energia e N, respectivamente. Os animais também receberam mistura mineral e vitamínica e tiveram livre acesso à água. O feno foi fornecido a cada três horas, perfazendo oito refeições eqüitativas por dia. Os animais receberam quatro tipos de infusão em um delineamento em quadrado latino 4 X 4. Cada infusão foi mantida por uma semana com uma taxa de fluxo de três litros por dia. A infusão-controle consistiu de apenas água e as outras três foram misturas isoenergéticas de AGV, tendo-se variado as proporções acetato : propionato : butirato da seguinte maneira: Infusão A: 70:20:10, infusão P: 13:77:10 e infusão B: 0:20:80. As proporções foram calculadas para que, considerando a fermentação ruminal do feno, promovessem as seguintes proporções molares entre acetato : propionato : butirato: Infusão A: 70:20:10, infusão P: 50:40:10 e infusão B: 50:20:30. Para calcular o volume de líquido e a taxa de renovação da fase líquida, uma única dose de Cr-EDTA foi infundida no rúmen às 8h55. Amostras de fluido foram retiradas do saco ventral do rúmen às 8h50, 11horas, 13 horas e 23 horas do mesmo dia e às 8 horas e 13 horas do dia seguinte. A taxa de produção de AGV foi medida a partir da degradação do

feno na dieta-controle nas quatro ovelhas uma semana após o término do quadrado latino. Por considerar a taxa de interconversão de propionato quantitativamente insignificante, baseados no trabalho de Peters et al. (1990a), os autores escolheram o [¹³C]propionato como referência para estimar a taxa de produção de todos os outros AGV *in vivo*. Após retirar uma amostra de fluido ruminal para ser utilizada como branco, uma solução de 0,460 mmol/hora de [1-¹³C]propionato com 99% de enriquecimento foi infundida continuamente no rúmen por 24 horas. Após o início da infusão, seis amostras de fluido ruminal foram coletadas a cada uma hora e meia. O volume e a taxa de renovação da fase líquida foram calculados baseados na diminuição exponencial da concentração ruminal de cromo no tempo. Após a linearização semi-logarítmica, a inclinação, a taxa de renovação por hora e o volume de líquido no rúmen foi calculado como a quantidade de cromo infundida dividida pela exponencial do intercepto ao tempo zero. A taxa de produção de propionato (mmol/h) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{(\text{Fração atômica infundida} - \text{fração atômica basal}) * \text{taxa de infusão}}{(\text{Fração atômica ruminal} - \text{fração atômica basal}) * 3}$$

em que a fração atômica de ¹³C = ¹³C/(¹²C+¹³C) e a taxa de infusão é expressa em mmol/hora. As taxas de produção de acetato e butirato foram obtidas pela multiplicação da taxa de produção de propionato pela taxa de proporção entre acetato : propionato e butirato : propionato, respectivamente. Tanto o pH quanto a osmolalidade aumentaram com as infusões de AGV. O pH foi mais alto nas infusões de P e B do que nas infusões A (Noziere et al., 2000), o que poderia sugerir maior capacidade de absorção devido a maior superfície do epitélio ruminal estimulada por propionato e butirato (Sander et al., 1959; Sakata & Tamate, 1979; Sakata & Tamate, 1978), resultando em um *clearance* mais eficiente de AGV (Dirksen et al., 1984). Entretanto, os autores do trabalho sugeriram que o aumento do pH foi induzido pela solução-tampão infundida

concomitantemente com os AGV e baseando-se nos dados de Bueno et al. (1972), postularam que esse aumento não seria capaz de modificar a taxa fracional de desaparecimento uma vez que essa seria estável entre pH 6 e 7,5. O aumento da osmolalidade de 200 para 300 mOsmol/l pode ter diminuído a taxa de absorção de AGV, apesar de os autores citarem o trabalho de Tabaru et al. (1990), o qual diz que essa diminuição na taxa de absorção devido à osmolalidade está em torno de 3% por hora para acetato, propionato e butirato. A taxa de renovação da fase fluida foi maior nas infusões B (Noziere et al., 2000), o que poderia estar refletindo uma maior motilidade do ruminotético aumentando a taxa de passagem de fluido (Dado & Allen, 1995). A concentração de valerato foi mais alta com as infusões de AGV e, entre esses, as infusões P e B proporcionaram maior concentração de valerato. A taxa de produção ruminal de AGV medida *in vivo* na dieta-controle foi de 90, 23,1 e 8,8 mmol/hora para acetato, propionato e butirato, respectivamente. As concentrações arteriais de acetato, propionato e butirato aumentaram linearmente, conforme o aumento das taxas de infusão de cada um. Não houve diferença entre tratamentos nas concentrações dos AGV minoritários. A concentração arterial de β -hidroxibutirato não foi modificada pela infusão A, mas foi diminuída pela infusão P e aumentada pela infusão B. A concentração arterial de amônia e glicose foram semelhantes entre tratamentos e a concentração arterial de uréia diminuiu com as infusões de AGV, independente de sua composição. A concentração arterial de lactato aumentou com a infusão P e a de AGNE diminuiu com a infusão A e P. As infusões de AGV levaram à diminuição da concentração arterial de aminoácidos tanto essenciais (metionina, lisina e arginina) quanto não-essenciais (glutamina, ornitina, glicina e asparagina). A diminuição foi mais marcante para glutamina e menos marcante para glicina e alanina com a infusão B. Foi também menos marcante para arginina com a infusão A. As taxas de fluxo de sangue ou plasma portais não

foram afetadas pelos tratamentos. O aparecimento portal líquido de acetato e propionato aumentou linearmente de acordo com sua taxa de infusão ($r^2 = 0,66$ e $0,87$) e foi de 74% para acetato e 67% para propionato em relação à quantidade infundida. A recuperação portal de butirato foi de 31% ($r^2 = 0,96$). O aparecimento portal líquido de valerato aumentou com as infusões de AGV, mas foi significativa apenas nas infusões B (Noziere et al., 2000), o que poderia reforçar os achados de literatura, que afirmam que os ácidos graxos de cadeia mais longa são mais metabolizados pela parede do rúmen, então, uma vez aumentada a infusão de butirato, caso haja preferência de metabolismo desse ácido em detrimento do valerato pela parede do rúmen, esses achados seriam esperados. O fluxo líquido de isobutirato, metil-butirato e AGNE não variou entre tratamentos. A liberação líquida de β -hidroxibutirato e a utilização líquida de glicose aumentaram com as infusões de AGV, independente de sua composição (Noziere et al., 2000), talvez refletindo o aumento de demanda metabólica das células do epitélio e conseqüentemente aumento do uso dos substratos preferenciais. A liberação líquida de amônia e utilização da uréia diminuíram com as infusões de AGV, independente do tipo. A liberação líquida de lactato diminuiu com a infusão B. O fluxo portal líquido de AA indicou maior utilização líquida desses compostos pelas vísceras drenadas pela veia porta no tratamento-controle, devido principalmente ao uso da glicina, glutamato e glutamina. Essa utilização diminuiu com as infusões de AGV e mudou para produção líquida com as infusões A e P. Isso refletiu um aumento na liberação líquida de AA essenciais (isoleucina e leucina) e também tirosina e a uma diminuição na utilização de AA não-essenciais, tais como glutamato, mas não glutamina. O somatório do fluxo líquido de energia portal aumentou com as infusões de AGV, independente de sua composição, partindo de 99,9 kJ/h no tratamento-controle para uma média de 147,9 kJ/h, com infusões A, P e B (Noziere et al., 2000).

Kristensen (2001) realizou um experimento, em vacas, para estudar a utilização de ^{13}C pelos microrganismos ruminais a partir da infusão contínua de $[2-^{13}\text{C}]$ acetato e o impacto desse fenômeno nas estimativas de disponibilidade de acetato calculadas pela técnica de diluição intraruminal de isótopos. Foram usadas três vacas holandesas, sendo uma não-lactante e duas em final de lactação, todas com cânula no rúmen, duodeno e íleo. Os animais foram alimentados visando a suprir 125% das exigências de manutenção e entraram na dieta experimental 14 dias antes do início das infusões intraruminais de $[2-^{13}\text{C}]$ acetato. Do 14º até o 4º dia anteriores às infusões, os animais foram alimentados duas vezes ao dia; do 4º dia ao 1º dia a alimentação foi fornecida quatro vezes ao dia e a partir do 1º dia anterior e durante todo o período de infusões, os animais foram alimentados 12 vezes ao dia em refeições equitativas. A dieta consistiu de 2,5 kg/dia de feno de alfafa e 4,6 kg/dia de concentrado (cevada, polpa de beterraba, farelo de soja, melão e minerais). Amostras de sangue foram coletadas por meio de cateteres inseridos na veia jugular externa em duas vacas e mediante punção na terceira vaca. Dois dias antes das infusões de $[2-^{13}\text{C}]$ acetato, iniciaram-se infusões de Co-EDTA (9,5 g/dia em 10 litros de água). As infusões de $[2-^{13}\text{C}]$ acetato de sódio (176,1 mmol/dia) foram realizadas por uma bomba peristáltica que introduzia a solução na parte ventral do saco ventral do rúmen, juntamente com a solução de Co-EDTA. As amostras de sangue, conteúdo ruminal e duodenal foram coletadas três horas antes e uma, quatro, sete, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 horas após o início das infusões de $[2-^{13}\text{C}]$ acetato. Após análise através do IRMS interconectado a um sistema de cromatografia gás-liquida, o excesso percentual de ^{13}C foi calculado como sendo:

$$100 * \left\{ \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra em qualquer tempo de coleta} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra coletada antes do início das infusões de } [2-^{13}\text{C}] \text{ acetato} \right\}$$

A produção bruta de acetato no rúmen foi calculada como a seguir:

$$\text{Taxa de infusão intraruminal de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} * \left\{ \left[\left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da solução infundida no rúmen} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra coletada antes do início das infusões de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} \right] \right. \\ \left. \left[\left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra em qualquer tempo de coleta} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra coletada antes do início das infusões de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} \right] \right\}$$

A proporção de ^{13}C infundido no rúmen e recuperado no duodeno foi calculada como se segue:

$$\text{Fluxo de carbono} * \text{no duodeno} \left\{ \left[\left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra em qualquer tempo de coleta} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra coletada antes do início das infusões de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} \right] \right. \\ \left. \left[\text{Taxa de infusão intraruminal de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} * 2 * \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da solução infundida no rúmen} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}} \right] \text{ da amostra coletada antes do início das infusões de } [2\text{-}^{13}\text{C}] \text{ acetato} \right] \right\}$$

A proporção de ^{13}C infundido intraruminalmente absorvido do rúmen como propionato, butirato e valerato foi estimada para cada AGV como sendo:

$$\left(\frac{\text{Concentração ruminal do AGCC (propionato, butirato ou valerato)}}{\text{Concentração ruminal de acetato}} \right) * \left(\frac{\text{Número de carbonos do AGCC (propionato, butirato ou valerato)}}{\text{Número de carbonos do acetato}} \right) * \text{Enriquecimento relativo do AGCC (propionato, butirato ou valerato) comparado ao acetato}$$

As comparações entre as frações atômicas das amostras coletadas antes do início das infusões e as frações atômicas médias das amostras coletadas após as infusões de [2-¹³C]acetato foram feitas pelo teste “t” pareado, utilizando-se o procedimento de médias do SAS. As vacas tiveram alimentação restrita para assegurar que a quantidade total do alimento em cada refeição fosse ingerida, o que realmente aconteceu. O pH ruminal foi 6,4±0,2 e o padrão de fermentação ruminal foi caracterizado por uma concentração de butirato relativamente alta. A fração atômica de ¹³C do acetato ruminal aumentou após a infusão intraruminal de [2-¹³C]acetato. Houve aumento do teor de ¹³C presente no propionato, isobutirato, butirato, valerato, acetato duodenal e acetato plasmático após a infusão intraruminal de [2-¹³C]acetato. Entre os compostos analisados, apenas o metil-butirato não sofreu alteração no teor de ¹³C após infusões. O enriquecimento relativo de butirato (39,2%) foi duas vezes maior do que o observado no propionato e valerato (12,3 e 15,1%, respectivamente). No butirato absorvido, foram recuperados 16% do ¹³C infundido no rúmen como [2-¹³C]acetato e quatro a cinco por cento no propionato e valerato, respectivamente. A produção bruta de acetato no rúmen foi 38 mol/dia, equivalendo a 38% da energia digestível ingerida (calor de combustão do acetato 875kj/mol). A taxa de fluxo do fluido duodenal, baseada na concentração de cobalto, foi 177 litros por dia. A fração de acetato produzido no rúmen que alcançou o duodeno foi 0,75%, baseado no fluxo de fluido

duodenal e na concentração de acetato. A fração de ^{13}C infundida no rúmen que alcançou o duodeno, entretanto, foi 7,6% ou aproximadamente 10 vezes a fração recuperada de acetato. O autor assumiu que ao menos 28% do ^{13}C infundido no rúmen como [2- ^{13}C]acetato deixou o rúmen na forma de outros metabólitos, sendo assim, no máximo 72% da produção ruminal bruta estariam disponíveis para o animal na forma de acetato. O autor argumenta que a divergência entre os valores de acetato infundido ou produzido e aqueles recuperados no sangue portal corrigidos para o aporte arterial seria devida à utilização de acetato pelos microrganismos ruminais e não à metabolização do acetato pela parede do rúmen.

2.4.2.4 Infusão única de marcadores e checagem do seu desaparecimento ao longo do tempo

Essa técnica é baseada na infusão de um determinado marcador em uma única dose, homogeneizando-o ao conteúdo ruminal. Uma amostra é coletada no momento da adição dos marcadores para checar a concentração do marcador infundido diluído pela digesta ruminal. Amostras seriadas são coletadas ao longo do tempo e as taxas fracionais de *clearance* são estimadas pela queda de concentração do marcador ao longo do tempo. Normalmente Co-EDTA ou Cr-EDTA (Uden et al., 1980) são usados como marcadores de passagem de fluido.

2.4.2.4.1 Infusão única de AGV marcado com ^{13}C associado a um marcador de passagem de fluido

Infusões contínuas de AGV marcados com ^{13}C , como já descrito, são largamente usadas para determinação da *clearance* de AGV. O uso de infusão única desse tipo de marcador associado a um marcador de passagem é relativamente incipiente e a técnica tem sido desenvolvida por um grupo de pesquisadores lotados na Universidade de Wageningen na Holanda. Essa técnica foi descrita por esse grupo em um simpósio (Chen et al, 1997), mas trabalhos completos ainda não foram publicados. A metodologia é relativamente simples, não há necessidade de bomba peristáltica, tornando os procedimentos experimentais mais simples. Os marcadores são misturados ao conteúdo ruminal evacuado e esse é retornado ao rúmen, sendo a taxa fracional de *clearance* determinada pela queda na relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ao longo do tempo (Tamminga¹, comunicação pessoal). A principal desvantagem é o alto custo desses marcadores e a necessidade de um aparato tecnológico específico para determinação dos teores de isótopos estáveis nas amostras.

2.4.2.4.2 Infusão única de valerato não-marcado associado a um marcador de passagem de fluido

Assim como a técnica anterior, a utilização de valerato como marcador para estimativas das taxas fracionais de *clearance* ruminal de AGV também é incipiente. Existe publicação em um simpósio e alguns dados ainda não publicados, mas trabalhos completos não estão ainda disponíveis. A vantagem dessa técnica é o baixo custo, a simplicidade de aplicação e a possibilidade de

¹ Prof. Dr. Seerp Tamminga. Animal Nutrition Group, Wageningen Institute of Animal Science – Wageningen University - The Netherlands. email: Seerp.Tamminga@wur.nl

se utilizá-la em vacas leiteiras lactantes que estejam ingerindo grandes quantidades de matéria seca, sem retirá-las do processo produtivo.

Utilizando essa técnica, Allen et al. (2000) estudaram o *clearance* de valerato como estimador do *clearance* de outros AGV. O rúmen de três carneiros, alimentados *ad libitum*, foi evacuado e lavado. Um peso de 900 g foi inserido no saco ventral. Três litros de uma solução de Co-EDTA (0,2 g/litro) e AGV foi inserido no rúmen: 101,9 mM de acetato, 33,6 mM de propionato, 18,6 mM de butirato, 11,2 mM de isobutirato, 9,5 mM de metil-butirato e 10,8 mM de valerato. A osmolaridade foi ajustada para 365 mOsmol/l e o pH, para 6,4. Amostras do fluido foram obtidas a intervalos de 10 minutos por 1 hora. Durante o período de amostragem, o óstio retículo-omasal e o cárdia não foram obstruídos e nem se tentou controlar o pH da solução. Os AGV foram analisados por cromatografia gás-líquida e o Co, por espectroscopia de corrente direta de emissão de plasma. A taxa fracional de absorção de AGV foi calculada por regressão linear do logaritmo natural da concentração de AGV dividida pela concentração de Co. O pH da solução aos 10 minutos após a infusão foi 7,3 e aos 60 minutos foi 8,1. A taxa fracional de absorção dos AGV foi: 0,43 h⁻¹ para acetato, 0,46 h⁻¹ para propionato, 0,39 h⁻¹ para butirato e 0,52 h⁻¹ para valerato. A taxa fracional de queda na concentração de Co, a qual indica a taxa fracional de passagem de fluido, foi 0,18/h. De acordo com os autores, nesse estudo realizado com valores de pH próximos da neutralidade, as taxas fracionais de absorção de acetato, propionato, butirato e valerato foram similares. Considerando que o metabolismo de valerato pelos microorganismos ruminais poderia resultar em superestimativa de taxas calculadas por esse método, os autores avaliaram concentração ruminal de valerato ao longo do tempo após infusão única do marcador *in vitro*. Três concentrações de valerato (zero, nove e 18 mM) foram simuladas no fluído ruminal. As incubações foram realizadas em duplicata ao longo de zero, três, seis, nove, 12, 18 e 24 horas. As concentrações

de valerato nos tubos com nove e 18 mM de valerato foram ajustadas para a concentração nos tubos não-dosados com o ácido. A taxa de queda na concentração ruminal de valerato foi 0,003/h, muito pequena proporcionalmente à taxa fracional de absorção de AGV do rúmen (Allen et al., 2000). A taxa fracional de absorção de valerato foi também avaliada em 29 vacas holandesas com fístula ruminal com uma semana de lactação. Foram infundidos valerato (1,84 mmol) e Co-EDTA (10g) em cinco locais do rúmen e foram coletadas amostras de fluido ruminal nos tempos zero, uma e meia, duas, duas e meia, três, três e meia, quatro, seis, oito, 12, 16, 20, 24 e 36 horas após infusão. As amostras foram coletadas dos cinco locais de infusão e foram misturadas para obter uma amostra composta. A taxa fracional de *clearance* total média foi de 51 % h⁻¹ (29 a 88 % h⁻¹). A taxa fracional de passagem média foi 18 % h⁻¹ (nove a 26 % h⁻¹). Por diferença, a taxa de absorção média foi 32 % h⁻¹ [13 a 57 % h⁻¹] (Allen et al., 2000).

Em outro experimento, Pereira¹, (comunicação pessoal – dados não publicados) avaliou a sensibilidade da técnica à variação na capacidade de absorção da parede do rúmen. Três carneiros do experimento anterior foram submetidos a jejum de 72 horas para induzir hipotrofia papilar e queda na capacidade de absorção da parede do rúmen. A taxa fracional de absorção de AGV determinada pela técnica de esvaziamento e lavagem caiu após o jejum. Avaliou-se a taxa fracional de *clearance* de AGV antes e após o período de jejum pela técnica de AGV/Co. Os ovinos receberam infusão única no rúmen de valerato (0,52 ml/kg PV^{0,75}) e Co-EDTA (3 g/kg PV^{0,75}) diluídos em solução mineral (200 ml/kg PV^{0,75}). O pH da solução foi ajustado para o pH ruminal, imediatamente antes da infusão, por adição de NaOH a 50%. Um tubo de látex

¹ Prof. Dr. Marcos Neves Pereira – Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia – UFLA/DZO. Caixa Postal 37 – Lavras, MG, Brasil – email: mpereira@ufla.br – Telefax: 55 (35) 38291231.

de 30 cm de comprimento conectado a um amostrador metálico posicionado no saco ventral do rúmen foi utilizado tanto para infusão da solução marcadora quanto para obtenção de amostras de fluido ruminal ao longo do tempo. As amostras de fluido, 30 ml, foram aspiradas a intervalos de 30 minutos por quatro horas, iniciando-se 30 minutos após a infusão. Papilas ruminais foram coletadas por biópsia antes e após o período de jejum para avaliar mudanças na morfologia da parede do rúmen induzidas pelo regime alimentar. A largura papilar, determinada a 1 e 2 mm abaixo da extremidade distal da papila, foi 2,52 e 2,29 cm, antes e após o jejum, respectivamente. O *clearance* ruminal de valerato por absorção pela parede do rúmen foi menor, depois do jejum, nos três ovinos ao longo do período amostral de quatro horas, demonstrando que a técnica foi sensível à queda na capacidade de absorção da parede do rúmen, induzida experimentalmente. Os autores observaram que, ao longo do desenvolvimento da técnica de AGV/Co, nenhum animal mostrou qualquer sinal clínico de distúrbio durante ou após a execução dos experimentos (24 em ovinos e 14 em vacas). Volume de infusão superior a nove litros, contendo 300 ml de valerato e 10 g de Co-EDTA, parece ser necessário para que se consiga uma mistura instantânea e homogênea dos marcadores em vacas Holandesas não-lactantes e volumes acima de 16 litros parecem ser indicados para vacas em lactação. O pH das soluções deve ser ajustado para o pH ruminal no tempo 0 com solução de NaOH a 50%. As regressões representando a queda exponencial na concentração ruminal de valerato e Co sempre tiveram r^2 acima de 0,9. O desaparecimento de AGV por passagem foi estimado como sendo próximo a 50% do *clearance* total, similar a estimativas feitas em novilhos de corte (Peters et al, 1990a). O autor concluiu que esse método permite a determinação da taxa fracional de *clearance* de valerato por absorção pela parede do rúmen e passagem com a fase fluida para o omaso em rúmen intacto. A técnica permite a

avaliação de fatores determinantes da absorção de AGV pelo rúmen, úteis em estudos da morfofisiologia ruminal.

2.4.3 Aspectos relacionados à passagem de AGV para compartimentos distais ao ruminotético

A absorção pela parede do ruminotético era um fator muito importante que, até então, vinha recebendo bastante atenção dos pesquisadores. No entanto, sabia-se que a passagem dos AGV junto com a fase fluida da dieta também era fator preponderante no mecanismo de *clearance*. Entre os fatores que poderiam influenciar a velocidade com que a fase fluida passasse para o omaso, levando conseqüentemente parte dos AGV produzidos no ruminotético, a motilidade aparecia com grande importância. Gregory (1987) investigou o efeito dos AGV e ácido láctico na inibição da motilidade do ruminotético de carneiros. A motilidade foi detectada pela eletromiografia em vinte e quatro animais mantidos com infusões intragástricas de uma dieta líquida completa, em três animais ingerindo gramínea peletizada e em nove animais vagotomizados. Infusões abomasais e duodenais de AGV foram também testadas em cinco carneiros ingerindo gramínea peletizada. As infusões de AGV e ácido láctico inibiram progressivamente a amplitude das contrações ruminoreticulares. Em muitos ensaios não houve efeito na freqüência de contrações até a cessação de todas as contrações do ruminotético no ponto em que a concentração máxima de AGV detectada no abomaso foi 28 mM para ácido acético, 12mM para AGV totais e 20 mM para ácido láctico. As concentrações de AGV não dissociados que causaram interrupção das contrações ruminoreticulares foram similares tanto em carneiros vagotomizados quanto naqueles com vago intacto. O tempo de duração das infusões até a

abolição completa da motilidade ruminoreticular foi de 51 minutos para ácido acético, 27 minutos para propiônico, 22 minutos para butírico e 62 minutos para ácido láctico. As infusões abomasais de AGV ou ácido láctico inibiram a amplitude das contrações ruminais, especialmente as contrações ruminais primárias quando a concentração de ácidos não-dissociados foi de 60 mM ou mais. Essas mesmas infusões foram capazes de aumentar a frequência de contrações reticulares e ruminais primárias quando a concentração esteve em torno de 80mM. As infusões de AGV e ácido láctico (100mM – 5ml/min) inibiram fortemente a motilidade abomasal sem afetar a motilidade ruminoreticular e quando a taxa de infusão foi mais alta (100 mM – 10ml/min) aboliu a motilidade inibindo a amplitude e frequência das contrações ruminoreticulares. O autor concluiu que a inibição inicial da motilidade ruminal na acidose ruminal provavelmente não envolve qualquer influência significativa dos receptores abomasais ou duodenais. A interrupção final da motilidade ruminal na acidose ruminal poderia envolver efeitos locais de AGV no ruminoretículo bem como excitação de receptores ruminoreticulares sensíveis aos ácidos (Gregory, 1987). Esse experimento demonstrou a influência negativa do acúmulo de AGV, especialmente butirato, na motilidade do ruminoretículo. A manutenção da motilidade normal parece ser fator preponderante para um *clearance* eficiente de AGV do ruminoretículo.

Até então sabia-se da importância da taxa de passagem dos AGV com a fase fluida no *clearance* ruminal. Sabia-se, no entanto, que a maioria dos AGV desaparecia antes do duodeno (Peters et al., 1990a; Peters et al., 1990b), mas faltava estabelecer a importância quantitativa de absorção do omaso e abomaso. Rupp et al. (1994) procederam a um experimento para mensurar o desaparecimento de AGV e o fluxo através do abomaso em bovinos utilizando-se uma técnica de canulação do abomaso. Seis novilhos de corte com média de 295 kg e 11 meses de idade foram estudados. Os animais foram equipados com

cânulas permanentes no rúmen, óstio omaso-abomasal, abomaso e duodeno. A cânula do óstio omaso-abomasal tinha uma manga de nylon flexível que podia ser exteriorizada através da cânula abomasal para coletar o conteúdo do omaso. Três experimentos foram conduzidos com as seguintes dietas: 95% de concentrado para suprir a manutenção, 95% de concentrados *ad libitum* ou somente feno moído *ad libitum*. Óxido de cromo foi usado como marcador de fluxo de digesta e as dietas foram divididas em 12 refeições diárias. Após 14 dias do período de adaptação da dieta, foram realizadas as coletas de amostras. Amostras de fluido ruminal foram coletadas às 13 horas nos dias 15 e 16. A manga da cânula omaso-abomasal foi exteriorizada através da cânula abomasal e a digesta foi coletada (250 ml) às 8 e 19 horas no dia 15 e às treze horas no dia 16. A digesta duodenal foi coletada (250 ml) às 13 horas no dia 15 e às 8 e 19 horas no dia 16. O conteúdo ruminal foi totalmente evacuado no dia 17 e a digesta foi pesada, subamostrada e o conteúdo foi retornado ao rúmen. A concentração de AGV no fluido ruminal (84 a 109 mM) foi maior do que no fluido omasal que estava passando para o abomaso (32 a 40 mM) e essa foi maior do que a duodenal (7 a 14 mM) (Rupp et al., 1994).

Esses dados demonstram que 37 a 38% dos AGV presentes no rúmen atingiram o abomaso e que 8 a 13% atingiram o duodeno, caracterizando o abomaso como um importante sítio de absorção de AGV, o que poderia ser facilitado pelo baixo pH do lume, o qual levaria à presença de AGV não dissociados favorecendo a absorção passiva pela parede do órgão. Na dieta com 95% de concentrado para suprir a manutenção, o fluxo de AGV no fluido do omaso passando para o abomaso foi 34% e no duodeno 12%, em relação ao fluxo ruminal. Na dieta com 95% de concentrado *ad libitum*, o fluxo de AGV no fluido do omaso passando para o abomaso foi de 45% e no duodeno de 17%, em relação ao rúmen. Na dieta baseada apenas em forragem, esse fluxo de AGV foi de 35% no fluido do omaso passando para o abomaso e 21% no duodeno.

Detalhando um pouco mais os dados de Rupp et al. (1994), no experimento com 95% de concentrado para suprir a manutenção ou *ad libitum* houve similaridade proporcional do acetato no rúmen e omaso, mas no duodeno, a proporcionalidade desse ácido em relação aos demais foi significativamente maior do que no rúmen e omaso. A proporção de propionato diminuiu do rúmen para o omaso e desse para o duodeno. No experimento com dieta somente com feno, a porcentagem de acetato aumentou e a de propionato diminuiu do rúmen para o duodeno. A proporção de butirato foi mais baixa do que de acetato ou propionato. No experimento com 95% de concentrado *ad libitum*, a proporção de butirato foi significativamente mais baixa no duodeno. No experimento com forragem, a proporção de butirato foi significativamente mais alta no fluido ruminal do que no fluido omasal e os valores foram similares entre omaso e duodeno. A proporção de isobutirato, valerato e metilbutirato foi menor ou igual a 4% em todos os sítios, em todos os experimentos. O fluxo de fluido no omaso foi 13 a 18 litros por dia menor do que o fluxo no duodeno. O fluxo de AGV totais no omaso foi 377 a 573 mmol/dia maior do que no duodeno (Rupp et al., 1994). Esse experimento primou pela dificuldade e caráter inovador da técnica de canulação do omaso e apresentou evidências de grande participação do abomaso na absorção de AGV.

3 HIPÓTESE

As técnicas ^{13}C -AGV e Hval-Co são eficientes na determinação do *clearance* ruminal de AGV. O *clearance* de acetato propionato e butirato pode ser estimado pelo *clearance* de valerato (Hval-Co) com os devidos ajustes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram realizados no Wageningen Institute of Animal Science na cidade de Wageningen - Holanda, entre junho e setembro de 2001.

4.1 Experimento um

Nesse trabalho foram utilizadas seis vacas Holandesas fistuladas no rúmen que, no início do período experimental, estavam com 48 ± 39 dias da 2ª ou 3ª lactação. Os animais foram aleatoriamente alocados em dois Quadrados Latinos 3 x 3 com períodos de 14 dias. Os tratamentos consistiram de infusões ruminais dos ácidos acético, propiônico ou butírico. Durante todo o experimento, as vacas foram estabuladas em instalações tipo *Tie Stall* com camas de borracha sobre cimento.

As vacas foram alimentadas com azevém fresco e suplementadas com 2,8 kg diários de concentrado comercial peletizado fornecido duas vezes ao dia separadamente da forragem. Por volta das 13 horas, o azevém era colhido mecanicamente no campo e estocado ao longo das próximas 24 horas em câmara fria a 2°C. Às 15 horas do mesmo dia e às seis horas do dia seguinte as sobras alimentares eram removidas, pesadas e amostradas imediatamente antes das alimentações com concentrados. Após a ingestão do concentrado o cocho era constantemente mantido com forragem disponível aos animais em quantidade *ad libitum*.

A coleta de dados ocorreu no 14º dia de cada período e nesse dia a alimentação concentrada das 15 horas foi suprimida. Os procedimentos

amostrais iniciaram-se às 19 horas e consistiram de uma evacuação ruminal para coleta de amostras e adição de marcadores à digesta e coletas sequenciais de fluido ruminal desde antes da evacuação até $13,3 \pm 0,4$ horas depois. Durante esse tempo, os animais foram mantidos em jejum.

Nas evacuações, o conteúdo ruminal era retirado com a mão e transferido para uma caixa isotérmica. A cada dez porções de conteúdo ruminal evacuado, uma era separada para determinação do teor de matéria seca em uma amostra composta por vaca por período. A matéria seca foi determinada por secagem a 103°C por quatro horas.

Uma solução de marcadores foi adicionada ao conteúdo ruminal por ocasião da evacuação. Essa solução teve volume de dois litros e meio contendo 30 g de Co-EDTA (Uden et al., 1980) e 300 g de ácido valérico PA (MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha). Conforme o tratamento em que estavam alocadas em cada período, as vacas receberam junto com a solução de valerato e Co-EDTA 500 mg de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Acetato de sódio ou 600 mg de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Propionato de sódio ou ainda 650 mg de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Butirato de sódio, todos com 99% de enriquecimento (CAMPRO SCIENTIFIC – Veenendaal -The Netherlands). Essa quantidade foi calculada para fornecer aproximadamente 1,1033 % de ^{13}C em relação ao carbono total de AGV no conteúdo ruminal, prevendo uma relação 65:20:15 entre acetato, propionato e butirato. Antes da mistura das soluções ao conteúdo ruminal evacuado, o pH foi ajustado para 6,5 por adição de NaOH a 50%. Em cada porção retirada do rúmen, foi pulverizada uma pequena quantidade da solução de AGV e Co-EDTA. Após todo o conteúdo ruminal ter sido transferido para a caixa, realizou-se uma intensa mistura manual. Após a mistura dos marcadores à digesta, o conteúdo ruminal foi pesado e retornado ao rúmen.

Imediatamente antes da evacuação, uma amostra de cerca de 100 ml de fluido ruminal foi coletada no saco ventral do rúmen, utilizando-se um tubo

perfurado acoplado a um dispositivo para sucção. Outra amostra foi coletada pelo mesmo procedimento imediatamente após o retorno da digesta ao rúmen (tempo zero). Outras amostras foram coletadas aos 15 e 30 minutos e 1, 2, 4 e $13,3 \pm 0,4$ horas após o tempo zero. Uma amostra adicional de 10 ml de fluido ruminal foi coletada 10 horas após o tempo zero para análise de cobalto.

O pH de cada amostra de fluido ruminal foi determinado imediatamente após a coleta (pH – meter CG 837, Schott Geräte). O pH médio foi calculado pela média aritmética dos valores das 6 amostras obtidas nas primeiras 4 horas ou das 7 amostras obtidas ao longo de todo o período amostral.

As amostras foram divididas em três alíquotas. Uma alíquota de 70 ml para determinação do teor de ^{13}C e outra de 10 ml para determinação da concentração de cobalto foram imediatamente congeladas a -18°C até as análises. Outra alíquota de cinco mililitros foi acrescida de 250 μl de ácido ortofosfórico a 85% (MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha) e foi também congelada para posterior determinação da concentração de AGV.

Para a determinação do teor de ^{13}C no conteúdo ruminal, os AGV tiveram que ser isolados por destilação. A unidade de destilação Kjeldahl foi purificada por destilação de água desmineralizada durante 10 minutos. Um balão volumétrico de 100 ml foi colocado no devido local para o recebimento do material destilado. Cerca de 70 ml de fluido ruminal foi centrifugado a 855 g^1 por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi colocado dentro de um becker ajustando-se o peso para cerca de 40 g de fluido, retirando-se o excesso com uma pipeta plástica. O conteúdo do becker foi, então pesado e transferido para um frasco de destilação de Kjeldahl de 750 ml, por meio de um funil. O becker foi lavado com 35 ml de água desmineralizada, a qual foi também introduzida dentro do frasco de destilação juntamente com 40 g de Na_2SO_4

¹ Força centrífuga relativa [$\text{g} = 11,18 \times \text{raio do rotor da centrífuga} \times (\text{rpm}/1000)^2$]

(MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha). Alguns¹ fragmentos de silício foram colocados dentro do frasco para controle de ebulição. Então, 25 ml de H₂SO₄ a 96% (MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha) foram adicionados ao frasco de Kjeldahl, o qual foi atracado rapidamente à unidade de destilação e teve seu conteúdo misturado por agitação manual. A mistura foi destilada até o frasco de Kjeldahl estar quase cheio de espuma e fumaça branca ser vista no dispositivo condutor situado no topo do frasco. O frasco de Kjeldahl foi então removido da unidade de destilação e um outro frasco, contendo água desmineralizada com fragmentos de silício para controle de ebulição, foi atracado à unidade de destilação para conduzir os resíduos de AGV remanescentes no circuito para dentro do balão volumétrico. O balão volumétrico foi removido da unidade de destilação quando estava quase cheio e a destilação com água limpa desmineralizada continuou por mais 10 minutos para limpar a unidade de destilação, tornando-a pronta para um novo procedimento. Quatro gotas de ácido fosfórico (MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha), medidas por uma pipeta de pasteur, foram adicionadas ao balão volumétrico e o volume do frasco foi completado com água desmineralizada. A solução foi homogeneizada por meio de 10 inversões manuais do frasco, transferida para outro frasco e estocada a -18°C até análises posteriores do isótopo estável ¹³C por espectrometria de massa (IRMS-Isotope ratio mass spectrometer).

A concentração de AGV no fluido ruminal foi determinada no sobrenadante de amostras após centrifugação a 8855 g por 10 minutos. As amostras de cada tempo de amostragem foram preparadas em duplicata mediante mistura de 0,5 ml do sobrenadante, 0,3 ml do padrão interno (ácido 4-metilvalérico-(CH₃)₂CHCH₂CH₂COOH –MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha- nº 806088)

¹ A quantidade de fragmentos colocada foi aquela que se podia pegar pela junção das extremidades dos dedos polegar, indicador e médio. Não se preocupou com a precisão, uma vez que a finalidade era apenas manter a ebulição sob controle.

e 0,2 ml de água desmineralizada. O padrão externo para construção da curva de calibração foi colocado em duplicata no início da série de análises e após cada grupo de 9 pares de amostras. A concentração do padrão externo utilizado foi a seguinte (mM): 41,85 de ácido acético, 27,10 de ácido propiônico, 2,89 de ácido isobutírico, 11,42 de ácido butírico, 2,57 de ácido 3-metilbutírico e 2,52 de ácido valérico. As amostras foram analisadas por cromatografia gás líquida (GLC) (Cromatógrafo Fisons HRGC Mega 2 GC com FID, TCD - GenTech Scientific, Inc. Arcade, NY, USA). Foi usada uma coluna cromatográfica de vidro, 2 mm de diâmetro interno e 1,83 m de comprimento, preenchida com chromosorb 101- malha 80/100 (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA), tendo como gás carreador N₂ saturado com ácido fórmico a 99% (MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha). A temperatura do forno da coluna foi 190°C, a do injetor foi 186°C, a do detector de ionização de chama (FID) foi 225°C e o fluxo de gás carreador na coluna foi 35 ml por minuto. A concentração média de cada AGV foi calculada pela média aritmética dos valores das seis amostras obtidas nas primeiras quatro horas ou das sete amostras obtidas ao longo de todo o período amostral.

Em cada amostra de fluido ruminal, foi determinada a porcentagem de carbono oriunda de cada AGV no total de AGV analisados (acetato, propionato, butirato, isobutirato, metil-butirato e valerato), com base na proporção molar de cada ácido e seu respectivo número de carbonos (equação 1):

$$\begin{array}{l} \% \text{ de C oriunda de} \\ \text{cada AGV no pool} \\ \text{de carbono total} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Concentração do} \\ \text{AGV na amostra} \\ \text{(mM)} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Número de C na} \\ \text{molécula do} \\ \text{respectivo AGV} \end{array}$$

Em seguida, a porcentagem de carbono de valerato foi subtraída do total, resultando na porcentagem de carbonos não-valéricos na amostra (equação 2):

$$\begin{array}{l} \% \text{ de C não} \\ \text{valéricos da} \\ \text{amostra} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Somatório das \% de C} \\ \text{oriundos de cada AGV} \\ \text{(resultante da equação 1)} \end{array} - \begin{array}{l} \% \text{ de C oriundos de} \\ \text{valerato (resultante da} \\ \text{equação 1)} \end{array}$$

Esse procedimento foi executado porque uma grande quantidade de valerato (300 g) foi infundida com a mistura marcadora. Em seguida, a porcentagem de carbono não-valérico foi multiplicada pela porcentagem de carbono total da amostra, determinada pelo espectrômetro de massa, resultando na porcentagem de carbono total não-valérico (equação 3):

$$\begin{array}{l} \% \text{ de C não valéricos} \\ \text{no pool} \\ \text{de C total} \\ \text{determinado pelo} \\ \text{IRMS} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Concentração de C} \\ \text{da amostra} \\ \text{determinada pelo} \\ \text{IRMS} \end{array} \times \begin{array}{l} \% \text{ de C não valéricos} \\ \text{da amostra} \\ \text{(resultante da} \\ \text{equação 2)} \end{array}$$

Posteriormente, a porcentagem de carbono total não valérico foi subtraída da porcentagem de ^{13}C , resultando na concentração percentual de ^{12}C não valéricos (equação 4):

$$\begin{array}{l} \text{Concentração (\% de} \\ \text{^{12}C não valéricos da} \\ \text{amostra} \end{array} = \begin{array}{l} \% \text{ de C não valéricos} \\ \text{no pool} \\ \text{de C total} \\ \text{determinado pelo} \\ \text{IRMS (resultante da} \\ \text{equação 3)} \end{array} - \begin{array}{l} \text{Porcentagem de } ^{13}\text{C} \\ \text{na amostra} \\ \text{determinada pelo} \\ \text{IRMS} \end{array}$$

A concentração percentual de ^{12}C não valéricos foi utilizada como *Markee* para cálculo da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. A relação entre a porcentagem de ^{13}C e a porcentagem de ^{12}C não-valérico foi calculada para cada amostra ruminal obtida ao longo do tempo (equação 5):

$$\text{Relação } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = \frac{\text{Porcentagem de } ^{13}\text{C} \text{ determinada pelo IRMS}}{\text{Porcentagem de } ^{12}\text{C} \text{ (resultante da equação 4)}}$$

Dos valores obtidos da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nos tempos 0, 15 e 30 minutos, 1, 2, 4 e 13,3 \pm 0,4 horas foram subtraídos o valor da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na amostra obtida antes da evacuação ruminal (equação 6):

$$\text{Relação } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ corrigida para o enriquecimento basal} = \text{Relação } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ dos tempos 0, 15 e 30 minutos, 1, 2, 4 e 13,3 horas (resultante da equação 5)} - \text{Relação } ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ da amostra de fluido coletada antes da adição da solução marcadora (resultante da equação 5)}$$

A relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ corrigida para o enriquecimento basal da amostra foi utilizada nas regressões não-lineares descrevendo a queda na relação Marcador/*Markee* ao longo do tempo. Essa metodologia de cálculo que excluiu valerato foi definida como Método A.

Outro tipo de cálculo da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foi realizado utilizando como *Markee* apenas a porcentagem de ^{12}C na amostra originário do ácido do mesmo tipo do marcado com ^{13}C e infundido naquele período (Método B). Ex: Quando se infundiu acetato marcado no rúmen, a relação Marcador/*Markee* foi obtida pela relação entre a porcentagem de ^{13}C na amostra de fluido ruminal e a porcentagem de ^{12}C oriunda de acetato.

Nesse método de cálculo, utilizou-se a mesma equação 1 do método A para se chegar à contribuição percentual de cada AGV no pool de carbono total. A partir desse resultado, calculou-se a porcentagem de carbono de cada amostra

oriunda do ácido do mesmo tipo daquele que tinha sido marcado com ^{13}C (acetato, propionato ou butirato) (equação 7):

$$\begin{array}{l} \% \text{ de C da amostra} \\ \text{oriundo do} \\ \text{AGV do mesmo tipo} \\ \text{do mercado} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Concentração de C} \\ \text{da amostra} \\ \text{determinada pelo} \\ \text{IRMS} \end{array} \times \begin{array}{l} \% \text{ de C oriunda} \\ \text{do AGV do mesmo} \\ \text{tipo daquele} \\ \text{marcado com } ^{13}\text{C} \\ \text{resultante da} \\ \text{equação 1} \end{array}$$

Em seguida, calculou-se a porcentagem de ^{12}C oriunda do ácido do mesmo tipo daquele que foi marcado com ^{13}C (equação 8):

$$\begin{array}{l} \% \text{ de } ^{12}\text{C} \text{ oriunda do} \\ \text{ácido do mesmo tipo} \\ \text{do mercado} \end{array} = \begin{array}{l} \% \text{ de C da amostra} \\ \text{oriunda do AGV do} \\ \text{mesmo tipo do mercado} \\ \text{(resultante} \\ \text{da equação 7)} \end{array} - \begin{array}{l} \% \text{ de } ^{13}\text{C} \text{ da amostra} \\ \text{fornecida pelo IRMS} \end{array}$$

A partir daí, foram realizados os mesmos cálculos utilizados no método A, descritos pelas equações cinco e seis.

Esse método não considera que pode haver interconversão de AGV no ambiente ruminal, algo pouco provável (Gray et al., 1952; Bergman et al., 1965; Armentano & Young, 1983; Kristensen, 2001), implicando que a concentração analisada de ^{13}C não necessariamente representa carbono marcado que foi introduzido no rúmen como determinado ácido e continua nesse tipo de composto. A coerência matemática dos dois métodos de cálculo foi avaliada.

A concentração de Co foi determinada no sobrenadante das amostras de fluido ruminal após centrifugação a 1924 g por 15 minutos. As amostras foram então diluídas com água para se obter uma concentração de cobalto na amostra entre zero e quatro ppm. Desse modo, as amostras coletadas nos tempos zero, 15, 30, 60 e 120 minutos após a introdução do Co-EDTA sofreram uma diluição

1:20. As amostras coletadas no tempo 240 minutos sofreram uma diluição 1:10 e as amostras coletadas no tempo 600 minutos 1:5.

As análises de cobalto foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA.300 - Varian, Middelburg, Holanda). As soluções padrões foram preparadas a partir de uma solução inicial contendo 1000 ppm de cobalto, feita dissolvendo-se 1000 mg de Cloreto de Cobalto (II) hexahidratado extra puro ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - MERCK KGaA - Darmstadt, Alemanha) em 1000 ml de água. Essa solução foi diluída em água para obter padrões com concentração de 10 ppm de cobalto e essa última também foi diluída para obter concentrações finais de quatro, três, dois e um ppm de cobalto. Um frasco com água desmineralizada foi usado como branco.

Um teste de acurácia da análise foi realizado antes de se analisar as amostras. Dez miligramas de Co-EDTA foram diluídos em água em quantidade suficiente para um volume de 100 ml, obtendo-se uma solução de 100 ppm de Co-EDTA. Essa solução continha 15,92 ppm de cobalto puro. Diluíram-se 10 ml dessa solução em 30 ml de fluido ruminal, obtendo-se um volume final de 40 ml. Isto resultou em uma solução com 25 ppm de Co-EDTA e aproximadamente 4 ppm (3,98) de cobalto puro. Soluções contendo três, dois, um e zero ppm de cobalto foram preparadas diluindo a solução anterior com fluido ruminal. Com essas soluções de concentrações conhecidas, foi medida a acurácia da análise. A partir daí, todas as amostras foram analisadas, e a cada série de 10 amostras, nova curva de calibração era elaborada pela leitura dos padrões. A concentração de cobalto de cada amostra da série era estimada usando-se a média entre as curvas de calibração anterior e posterior à respectiva série.

A taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal, assumida como sendo idêntica ao *Clearance* ruminal de AGV por passagem para o omaso, foi calculada pela equação exponencial descrevendo a queda na concentração

ruminal de Co ao longo do tempo. As estimativas dessas taxas foram calculadas pelo procedimento NLIN do pacote estatístico SAS de acordo com a seguinte equação: $Q_t = Q_0 * e^{-K_d * t}$, onde:

Q_t = Concentração de Co em qualquer tempo.

Q_0 = Concentração de Co no tempo zero.

k_d = Taxa fracional de queda na concentração ruminal de Co

t = Tempo

O volume de fluido ruminal foi calculado pela concentração de cobalto no tempo zero, que foi estimada pelo intercepto da regressão não-linear descrevendo a queda na concentração ruminal de cobalto ao longo do tempo. A concentração de cobalto no tempo zero foi então dividida pela massa de Co infundida na forma de Co-EDTA, estimando-se, assim, o volume de líquido pela diluição do cobalto. Outra estimativa do volume de fluido ruminal foi obtida com base na porcentagem de matéria seca¹ e no peso da digesta ruminal determinados na evacuação ruminal.

Metodologias idênticas à de cálculo da taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal foram utilizadas para calcular as taxas fracionais de queda na relação $^{13}C/^{12}C$ calculadas pelos Métodos A e B e para descrever a queda na concentração ruminal de valerato, assumidas como sendo representativas do *Clearance* ruminal de AGV. As taxas fracionais de absorção de AGV pela parede do rúmen foram calculadas pela diferença entre as taxas fracionais de *Clearance* e a taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal. Os cálculos das taxas fracionais de *clearance* e passagem foram realizadas utilizando dados referentes apenas às 6 amostras coletadas nas primeiras 4 horas e também com esses dados acrescidos da amostra obtida às $13,3 \pm 0,4$ horas.

¹ Quantidade de líquido na digesta (kg) = peso total da digesta – peso dos sólidos na digesta; Assumiu-se 1 quilo de líquido como sendo igual a 1 litro de líquido de digesta.

4.2 Experimento dois

Nesse experimento os AGV enriquecidos (acetato, propionato e butirato) presentes nas soluções marcadoras do Experimento um foram substituídos por 5-¹³C-ácido n-valérico (pentanóico) e inseridos simultaneamente em todas as 6 vacas em um delineamento em blocos casualizados. O objetivo foi estimar o *clearance* ruminal pela técnica de valerato marcado com ¹³C e pela técnica utilizando o ácido não marcado. A quantidade de 5-¹³C-ácido valérico colocada na solução marcadora foi 325 mg, visando a alcançar aproximadamente o mesmo percentual de ¹³C ruminal previsto no experimento um. A coleta de dados ocorreu no dia 14^º de um período experimental de 14 dias. Os animais, a dieta experimental, o manejo alimentar e as instalações utilizadas no experimento 2 foram as mesmas do experimento 1. Os procedimentos de evacuação ruminal, coleta, manuseio, preservação das amostras e cálculos matemáticos das taxas fracionais foram os mesmos do Experimento um. A taxa fracional de queda na relação ¹³C/¹²C foi calculada apenas pelo Método A.

Nesse experimento foram também coletadas amostras de 500 ml de fluido ruminal, antes da evacuação ruminal e quatro horas após a adição dos marcadores, objetivando avaliar a incorporação de ¹³C oriundo de valerato na massa microbiana ruminal. Essas amostras de fluido foram resfriadas (2°C) e processadas no laboratório na manhã seguinte à noite de coleta. Os 500 ml de fluido foram centrifugados a 500 g por 20 minutos a quatro graus centígrados. O sobrenadante foi coletado e filtrado em um filtro de papel pregueado (S & S Faltenfilter 520b^{1/2} – fast filter - Ø 185 mm, FAUST Laborbedarf AG, Schaffhausen, Suíça). O filtro com o filtrado foi em seguida lavado com 50 ml

de solução fisiológica (NaCl a 0,1%), a qual foi adicionada ao sobrenadante filtrado e o material sólido retido foi descartado. O fluido foi então centrifugado a 10.000 g por 40 minutos a quatro graus centígrados e o sobrenadante foi descartado. O material sólido foi diluído em aproximadamente 50 ml de solução fisiológica (NaCl a 0,1%) e a solução foi centrifugada a 20.000 g por 35 minutos a quatro graus centígrados, descartando-se ao final o sobrenadante. O último passo foi repetido por mais duas vezes. O material (*pellet*) foi então transferido para um recipiente de alumínio com uma pequena quantidade de água desmineralizada e imediatamente secado e congelado sob condições de alto vácuo. Posteriormente, o *pellet* foi resuspenso e submetido a análises para determinação do teor de ^{13}C através do espectrômetro de massa (IRMS).

4.3 Análises estatísticas

As taxas fracionais de *clearance*, as taxas fracionais de absorção pela parede do rúmen, as taxas fracionais de passagem para o omaso, a concentração média de AGV, o pH médio e o volume de líquido ruminal do Experimento um foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkw} = \mu + Q_i + V(Q_i)_j + P_k + A_w + e_{ijkw}, \text{ onde,}$$

μ = Média geral;

Q_i = Efeito de quadrado (i = um ou dois);

$V(Q_i)_j$ = Efeito de vaca dentro de quadrado (j = um a seis);

P_k = Efeito do período (k = um, dois e três);

A_w = Efeito do ácido marcado (w = acetato, propionato ou butirato);

e_{ijkw} = erro experimental independente e identicamente distribuído em suposta distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

Os tratamentos que, nesse caso, eram os ácidos marcados, foram aplicados apenas nas últimas horas do período experimental. Conseqüentemente, não é de se esperar efeito de tratamento nas variáveis peso dos animais, consumo de matéria seca e produção de leite e sólidos. Sendo assim os dados foram analisados pelo mesmo modelo substituindo-se o efeito de tratamento pelo efeito de grupo dos animais que iriam receber os tratamentos (G_w , onde, w = um, dois ou três).

O mesmo modelo foi utilizado para a comparação entre as técnicas para a estimativa de fluido ruminal inicial do experimento um, substituindo-se o efeito de ácido pelo efeito de técnica de estimativa de fluido (F_w , onde, w = diluição de cobalto no tempo zero ou peso do conteúdo ruminal multiplicado pela seu teor de matéria seca).

No experimento dois, as taxas fracionais de *clearance*, absorção pela parede do rúmen e passagem para o omaso, estimadas pela técnica do ^{13}C e Hval-Co, foram analisadas pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + V_j + e_{ij}, \text{ onde,}$$

μ = Média geral;

T_i = Efeito de tratamento (i = Técnica do ^{13}C ou Hval-Co);

V_j = Efeito de bloco (j = vaca um a seis);

e_{ij} = erro experimental independente e identicamente distribuído em suposta distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

O mesmo modelo foi utilizado para a comparação entre enriquecimento de ^{13}C na massa microbiana, substituindo-se o efeito de técnica pelo efeito da adição de ^{13}C -Valerato (i = Antes ou quatro horas após a adição de $5\text{-}^{13}\text{C}$ -Valerato).

A análise entre técnicas para estimativa do volume de fluido ruminal inicial no experimento duas também seguiu o mesmo modelo, substituindo-se o

efeito de técnica de determinação do *clearance* pela técnica de determinação do volume de fluido (i = Diluição de cobalto no tempo zero ou peso do conteúdo ruminal multiplicado pelo seu teor de MS).

Regressões lineares foram usadas para comparar as taxas fracionais de *clearance* de acetato, propionato e butirato marcados pelo ^{13}C e valerato não-marcado, no experimento um. Os valores utilizados nas regressões foram ajustados para os efeitos previstos no modelo matemático utilizado nas análises estatísticas (SAS-GLM) do experimento um.

As taxas fracionais de *clearance* de valerato marcado e não-marcado no experimento dois também foram comparadas por regressões lineares.

As taxas fracionais de *clearance* e passagem, estimadas pela técnica do Hval-Co nos dois experimentos, e as taxas fracionais de absorção, estimadas por diferença, foram comparadas ao pH médio entre tempos de coleta e ao volume de líquido ruminal inicial através de regressões lineares. Os dados utilizados nessas regressões foram aqueles referentes aos seis pontos de coleta das primeiras quatro horas e as taxas fracionais de *clearance* e passagem do experimento um foram corrigidas para os efeitos previstos no modelo matemático.

A relação entre o volume de líquido ruminal inicial e o pH médio entre os tempos de coleta em ambos experimentos também foi estabelecida por regressão linear, utilizando-se os dados dos seis pontos de coleta das primeiras quatro horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de forragem nas dietas consumidas foi em torno de 86% da matéria seca, mostrando a alta qualidade da forrageira utilizada, considerando o

nível de produção de leite dos animais e a relação entre forragens e concentrados na dieta consumida (TABELA 1). A quantidade oferecida de concentrados foi fixada em 2,8 kg por dia, sendo essa quantidade totalmente consumida por todos os animais em todos os tratamentos. O desempenho animal e a dieta consumida foram semelhantes entre os grupos que receberiam os tratamentos no Experimento um e também entre os experimentos. Os dados obtidos nesse trabalho foram oriundos de animais com alta produção leiteira e com alto teor de gordura no leite sugerindo que os dados de *clearance* ruminal de cada AGV não foram afetados pelo desempenho dos animais em cada tratamento.

A similaridade na ingestão de alimentos e na produção de leite entre os grupos de animais que receberam os tratamentos e entre experimentos refletiu-se nos parâmetros ruminais (TABELA 2). A relação acetato : propionato e o pH ruminal são representativos de animais que consomem dietas com alta

TABELA 1 – Peso corporal, ingestão de alimentos e produção de leite de vacas Holandesas alimentadas com azevém fresco e concentrado, nos Experimentos um e dois.

	Exp 1					Exp 2
	GAc	G Pr	GBu	EPM	P*	GVal
Peso corporal (kg)	573	567	565	5	0,51	553
Ingestão MS total (kg d ⁻¹)	18,1	17,8	17,2	0,3	0,13	17,9
Ingestão MS forragem (kg d ⁻¹)	15,6	15,4	14,8	0,3	0,14	15,5
Ingestão MS concentrado (kg d ⁻¹)	2,45	2,45	2,45			2,45
Produção de leite (kg d ⁻¹)	26,5	25,9	24,6	0,8	0,29	28,3
% gordura no leite	4,03	4,12	4,18	0,15	0,76	3,96
% proteína no leite	3,02	2,96	3,10	0,04	0,09	3,02
% lactose no leite	4,36	4,34	4,32	0,03	0,71	4,44

GAc, GPr , GBu , GVal – Grupo de animais que receberam, respectivamente, infusões ruminais de acetato, propionato, butirato e valerato marcados com ¹³C, no último dia de cada período experimental.

EPM – Erro padrão da média.

*P para o efeito de grupo de animais.

TABELA 2 – Concentração ruminal de AGV, relação acetato/propionato (A/P), pH ruminal médio e volume de fase fluida ruminal (VLR) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, nos Experimentos um e dois.

	Exp 1					Exp 2
	¹³ C Ac	¹³ C Pr	¹³ C Bu	EPM	P*	¹³ C Va
<u>Ao longo de todo período amostral¹</u>						
AGV totais (mM)	129,5	125,4	127,8	3,2	0,69	133,4
Acetato (mM)	73,8	72,2	73,0	1,9	0,84	75,0
Propionato (mM)	22,3	21,7	21,4	0,8	0,70	23,5
Isobutirato (mM)	1,0	1,0	0,9	0,0	0,62	1,1
Butirato (mM)	13,0	12,3	12,5	0,4	0,43	13,8
Metil-butirato (mM) ²	1,9	1,7	1,7	0,1	0,31	1,7
Valerato (mM)	17,5	16,7	18,3	0,7	0,35	18,2
A/P	3,76	3,46	3,23	0,10	0,24	3,28
pH	6,17	6,22	6,24	0,07	0,80	6,28
<u>Nas primeiras 4 horas³</u>						
AGV totais (mM)	142,6	137,2	141,7	3,2	0,47	144,7
Acetato (mM)	80,0	77,4	79,8	1,9	0,58	79,9
Propionato (mM)	24,4	23,7	23,6	0,79	0,76	25,6
Isobutirato (mM)	1,0	1,0	1,0	0,0	0,57	1,2
Butirato (mM)	14,6	13,6	14,0	0,4	0,31	15,2
Metil-butirato (mM) ²	2,0	1,8	1,8	0,1	0,22	1,7
Valerato (mM)	20,1	19,7	21,5	0,7	0,29	21,2
A/P	3,34	3,28	3,60	0,10	0,20	3,15
pH	6,03	6,02	6,09	0,05	0,63	6,11
VLR ⁴ (L)	93	94	89	3	0,43	88

¹³C Ac, ¹³C Pr, ¹³C Bu, ¹³C Val – Tipo de ácido marcado com ¹³C e infundido no rúmen. Acetato, propionato, butirato e valerato, respectivamente.

EPM – Erro padrão da média.

P para o efeito de ácido.

¹ Média de 7 pontos de amostragem ao longo de todo o período amostral.

² Soma de 3-Metil e 2 Metil-butirato cujos picos cromatográficos são unidos.

³ Média de 6 pontos de amostragem das primeiras 4 horas.

⁴ VLR calculado pelo extrapolação da curva descrevendo a queda exponencial na concentração ruminal de Co para o tempo 0.

proporção de forragem e com baixa propensão ao desenvolvimento de distúrbios relacionados à acidose ruminal (Pereira & Armentano, 2000), mostrando que esses dados referem-se a animais fisiologicamente saudáveis. Dados de *clearance* ruminal de AGV em dietas mais acidogênicas podem diferir dos dados aqui apresentados (Dijkstra et al., 1993). A concentração ruminal de AGV foi maior e o pH ruminal foi menor quando apenas as seis amostras obtidas nas primeiras quatro horas de amostragem foram consideradas. As médias obtidas com todos os sete pontos de amostragem incluíram a amostra coletada cerca de 13 horas após o tempo zero. Como os animais não tiveram acesso a qualquer alimento nesse período de tempo, era de se esperar que o pH do fluido ruminal aumentasse e a concentração de AGV caísse ao longo do tempo. Apesar dos dados gerados com diferença no número de amostras não serem idênticos, a inclusão ou não do último ponto de amostragem não alterou a significância dos tratamentos sobre as variáveis estudadas.

A concentração ruminal de valerato foi superior à de butirato (TABELA 2), algo fisiologicamente anormal (Bergman, 1990). Isso é reflexo da mistura de 300 g de ácido valérico à digesta ruminal imediatamente antes do tempo zero de amostragem. A adição dessa quantidade de valerato não foi suficiente para induzir valores não-fisiológicos de pH ruminal e de proporção molar entre os outros AGV. A concentração ruminal de AGV antes das evacuações ruminais do Experimento um foi (mM): 86,8 de acetato, 27,4 de propionato, 15,0 de butirato, 1,1 de isobutirato, 1,9 de metil-butirato e 1,7 de valerato. No Experimento dois foi (mM): 85,0 de acetato, 28,0 de propionato, 16,0 de butirato, 1,2 de isobutirato, 1,6 de metil-butirato e 1,5 de valerato. Não houve efeito da adição de valerato na proporção molar entre os outros AGV ao longo dos tempos de coleta ($P > 0,58$ no experimento 1 e $P > 0,15$ no experimento dois), portanto, a conversão de valerato infundido a outros AGV parece não ter sido rota prioritária de desaparecimento desse marcador na técnica Hval-Co. Apesar

de a conversão de carbono de propionato e de acetato a valerato ser possível (Gray, 1952; Kristensen, 2001), não foram encontrados dados publicados sobre a conversão de valerato ruminal a outros AGV. Em nenhuma das 24 infusões realizadas nesse trabalho, foi observado qualquer efeito do excesso intraruminal de valerato sobre a saúde e o desempenho animal, mostrando que a técnica de Hval-Co é biologicamente segura.

A proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da massa microbiana coletada antes da introdução de valerato marcado foi significativamente maior do que quatro horas após a adição dos marcadores (FIGURA 1). A diminuição da proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ entre os dois tempos de coleta pode estar relacionada ao manejo alimentar. No momento da coleta de fluido, antes da evacuação ruminal, já havia se passado no mínimo 13 horas do último fornecimento de concentrado aos animais, o que foi realizado às seis horas da manhã. No momento da coleta de fluido, quatro horas após o tempo zero, já havia se passado mais de 17 horas. O concentrado utilizado era baseado em grãos oriundos de planta C_4 , as quais apresentam maior teor de ^{13}C do que as plantas C_3 (Yeh & Wang, 2001). É provável que ao longo do tempo a relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na massa microbiana viesse caindo devido à mudança do substrato utilizado para crescimento podendo ser uma das possíveis explicações para a diminuição da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ observada no intervalo de quatro horas. Apesar disso, os dados obtidos aqui sugerem que o desaparecimento de valerato por incorporação à massa microbiana não foi significativo.

As estimativa das taxas fracionais de *clearance* total e de absorção pelos Métodos A e B não foram semelhantes (TABELA 3). A taxa fracional de absorção pela parede ruminal de ^{13}C , introduzido no rúmen como butirato, foi a mais baixa dentre os três AGV, apenas quando o cálculo foi realizado pelo Método A. As estimativas realizadas pelo Método B resultaram em valores de erro padrão da média aproximadamente 10 vezes superior ao Método A. As

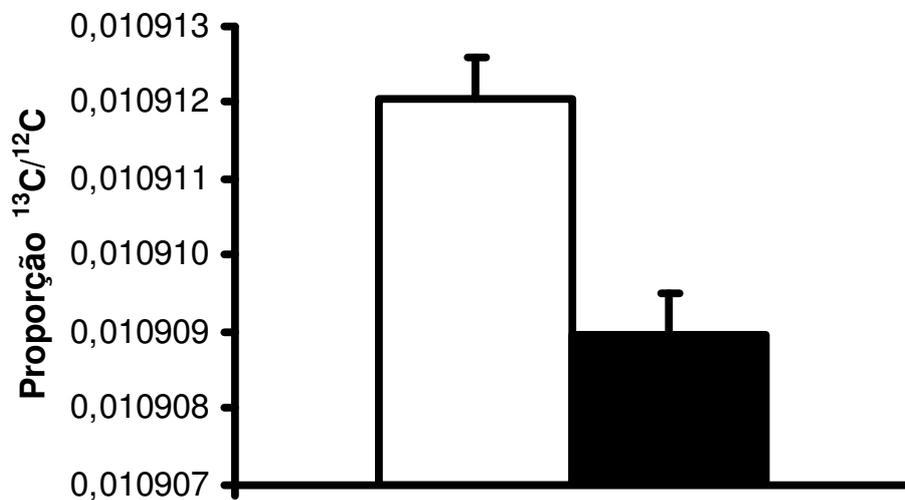


FIGURA 1 - Proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na massa microbiana isolada do fluido ruminal de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, antes (□) e 4 horas após (■) a adição de ^{13}C -Valerato no Experimento dois ($P = 0,01$).

regressões das estimativas de taxa fracional de *clearance* entre o método do carbono marcado e o método Hval-Co foram melhores com os dados calculados pelo Método A do que com os dados calculados pelo Método B (FIGURAS 2 a 5). Foram também observados valores negativos de taxa fracional de *clearance* de propionato (FIGURA 5) apenas quando essas foram estimadas pelo Método B e utilizando todas as sete amostras obtidas ao longo do período amostral. O Método A apresentou estimativas de taxa fracional de *clearance* mais coerentes biologicamente.

As taxas fracionais de *clearance* de carbono marcado introduzido no rúmen como acetato, propionato ou butirato foram em torno de $30\% \text{ h}^{-1}$ e não foram proporcionais ao tamanho da cadeia de carbono de cada ácido (Gabel,

TABELA 3 – Taxas fracionais de *clearance* ruminal de AGV (kc), de desaparecimento por passagem com a fase fluida (kp) e de desaparecimento por absorção pela parede ruminal (ka) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, no Experimento Um.

	Ao longo de todo o período amostral ¹					Primeiras 4 horas ²				
	¹³ C Ac	¹³ C Pr	¹³ C Bu	EPM	P*	¹³ C Ac	¹³ C Pr	¹³ C Bu	EPM	P*
<u>Método A</u>										
kc ³ (% h ⁻¹)	31,8 ^a	33,6 ^a	30,7 ^a	1,10	0,23	31,2 ^a	33,4 ^a	30,4 ^a	1,15	0,21
ka ⁴ (% h ⁻¹)	17,0 ^{ab}	18,6 ^a	14,8 ^b	0,83	0,03	15,4 ^{ab}	19,2 ^a	14,2 ^b	0,96	0,02
<u>Método B</u>										
kc ³ (% h ⁻¹)	32,9 ^a	18,1 ^a	29,7 ^a	10,5	0,60	31,5 ^a	24,7 ^a	46,1 ^a	6,45	0,11
ka ⁴ (% h ⁻¹)	18,2 ^a	3,1 ^a	13,9 ^a	10,6	0,61	15,5 ^a	10,5 ^a	29,7 ^a	6,58	0,16
kp ⁵ (% h ⁻¹)	14,5 ^a	15,0 ^a	15,8 ^a	0,47	0,19	15,7 ^a	14,2 ^a	16,1 ^a	0,77	0,23

¹³C Ac, ¹³C Pr, ¹³C Bu, ¹³C Val – Tipo de ácido marcado com ¹³C e infundido no rúmen. Acetato, propionato, butirato e valerato, respectivamente.

¹ Média de 7 pontos de amostragem ao longo de todo o período amostral.

² Média de 6 pontos de amostragem das primeiras 4 horas.

³ Estimado pela queda exponencial da relação ¹³C/¹²C ao longo do tempo pelos métodos de cálculo A e B.

⁴ Estimado por diferença entre a taxa fracional de *clearance* e a taxa fracional de passagem.

⁵ Estimado pela queda exponencial da concentração de cobalto ao longo do tempo.

EPM – Erro padrão da média.

* P para o efeito de ácido.

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes não são iguais pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

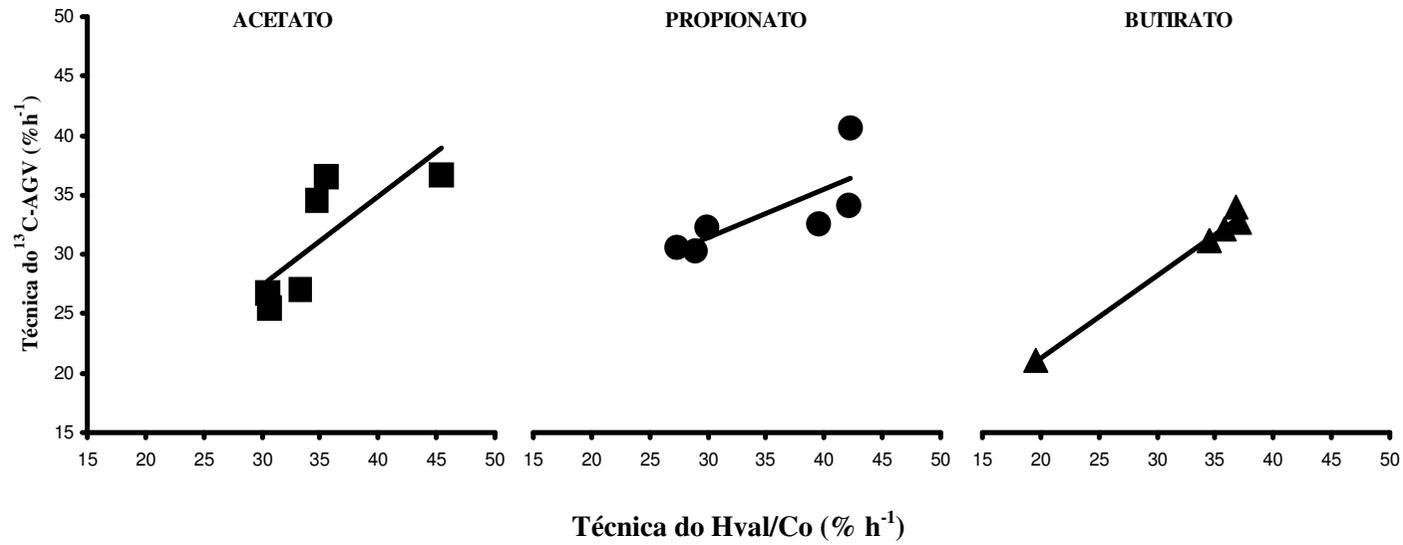


FIGURA 2 – Taxas fracionais de *clearance* (kc) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, recebendo infusão de ¹³C-Acetato (■), ¹³C-Propionato (●) e ¹³C-Butirato (▲). Correlação entre os valores estimados pelo Método A na técnica do ¹³C-AGV e os valores estimados pela técnica Hval-Co. Os dados foram gerados com as 6 amostras de fluido ruminal coletadas nas primeiras 4 horas. ■ $kc^{13}\text{C-Acetato} = 5,19 + 0,7427 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,51$; $P = 0,07$. ● $kc^{13}\text{C-Propionato} = 19,17 + 0,4073 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,56$; $P = 0,08$. ▲ $kc^{13}\text{C-Butirato} = 7,21 + 0,7000 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,99$; $P < 0,001$.

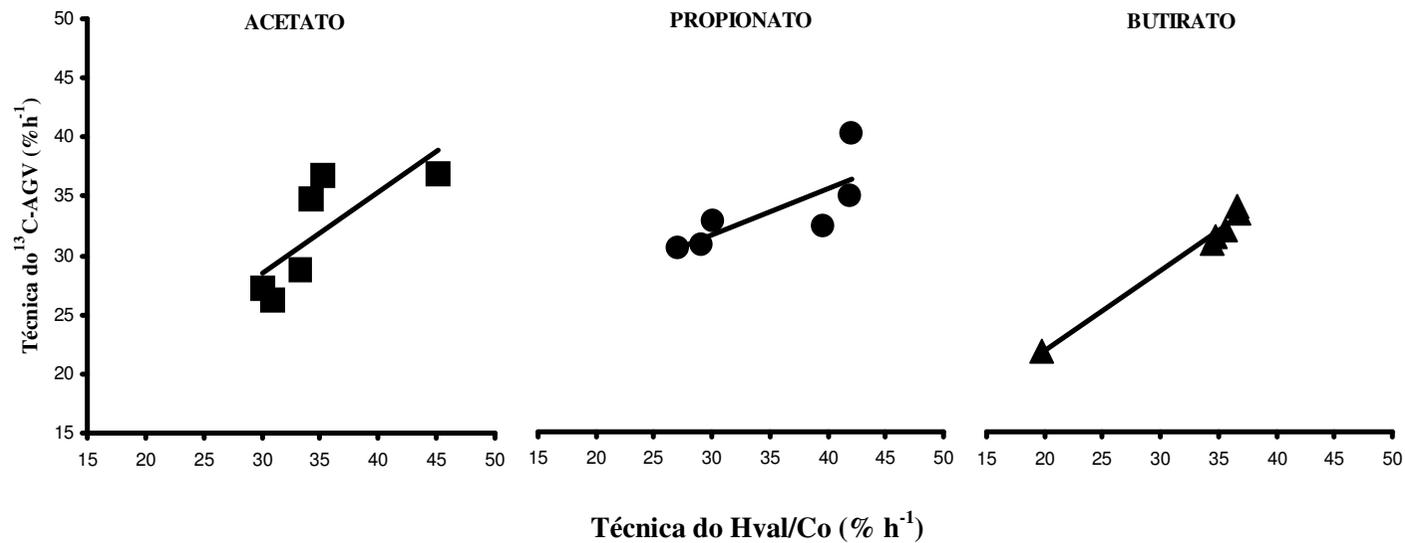


FIGURA 3 – Taxas fracionais de *clearance* (kc) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, recebendo infusão de ¹³C-Acetato (■), ¹³C-Propionato (●) e ¹³C-Butirato (▲). Correlação entre os valores estimados pelo Método A na técnica do ¹³C-AGV e os valores estimados pela técnica Hval-Co. Os dados foram gerados com as 7 amostras de fluido ruminal coletadas ao longo de todo o período amostral. ■ $kc^{13}C\text{-Acetato} = 7,75 + 0,6899 kc\ Hval$; $r^2 = 0,58$; $P = 0,08$. ● $kc^{13}C\text{-Propionato} = 19,77 + 0,3948 kc\ Hval$; $r^2 = 0,56$; $P = 0,08$. ▲ $kc^{13}C\text{-Butirato} = 8,23 + 0,6795 kc\ Hval$; $r^2 = 0,98$; $P < 0,001$.

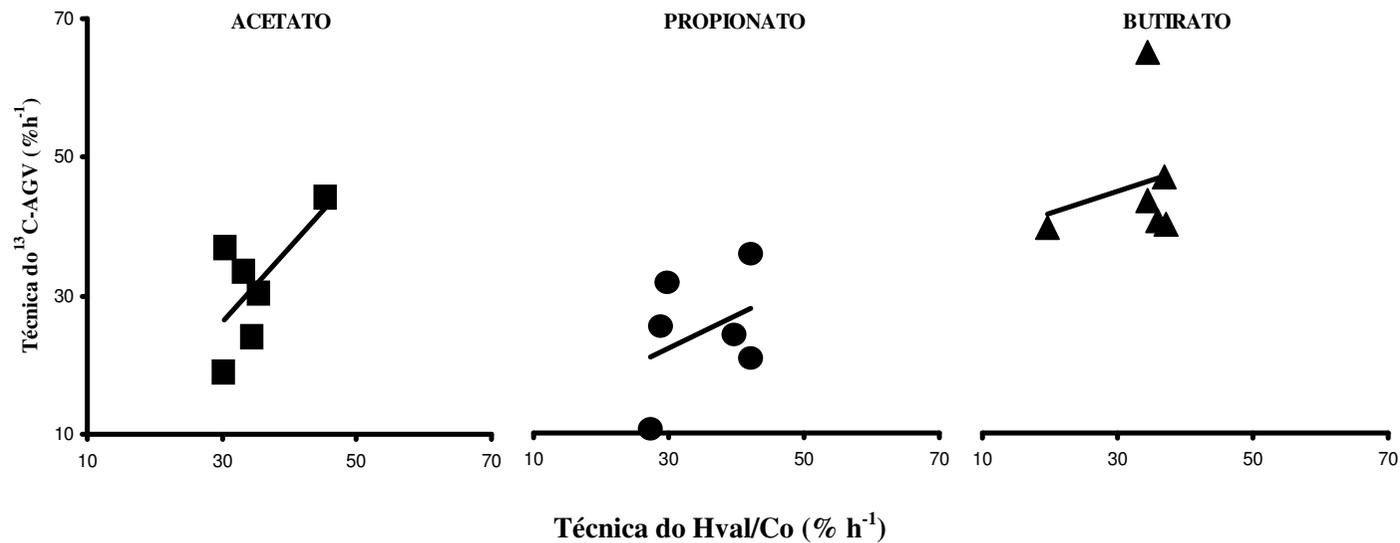


FIGURA 4 – Taxas fracionais de *clearance* (kc) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, recebendo infusão de ¹³C-Acetato (■), ¹³C-Propionato (●) e ¹³C-Butirato (▲). Correlação entre os valores estimados pelo Método B na técnica do ¹³C-AGV e os valores estimados pela técnica Hval-Co. Os dados foram gerados com as 6 amostras de fluido ruminal coletadas nas primeiras 4 horas. ■ $kc^{13}\text{C-Acetato} = -6,92 + 1,0968 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,44$; $P = 0,15$. ● $kc^{13}\text{C-Propionato} = 7,80 + 0,4816 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,15$; $P = 0,458$. ▲ $kc^{13}\text{C-Butirato} = 35,02 + 0,3351 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,53$; $P = 0,66$.

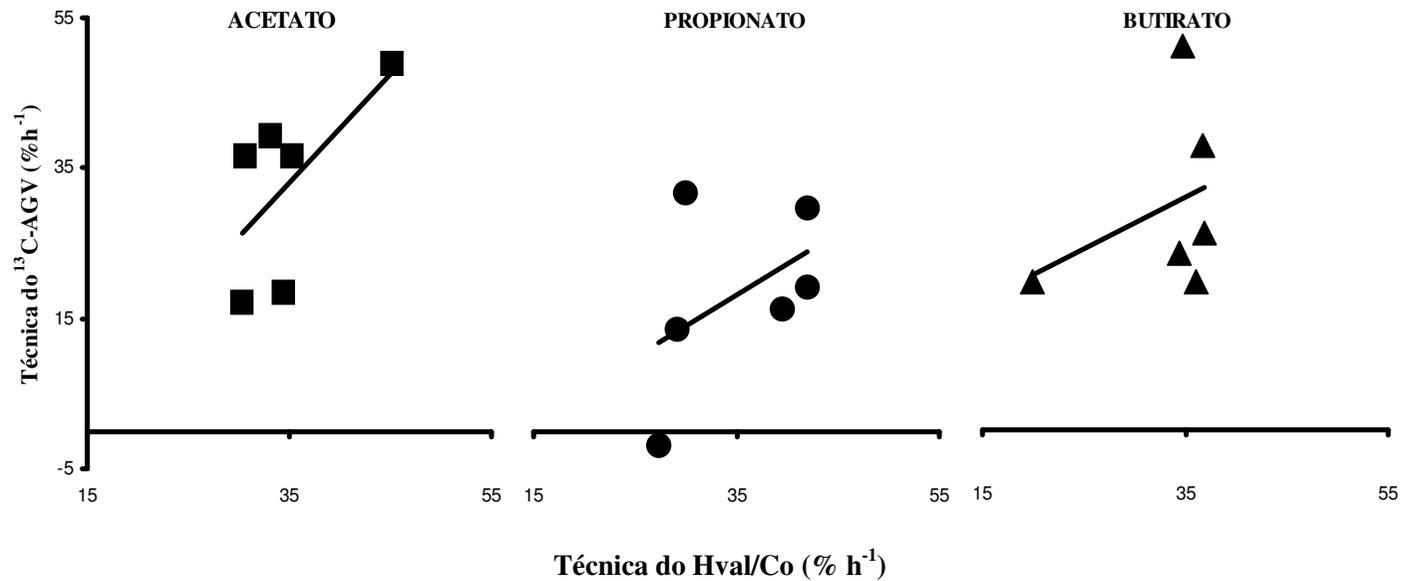


FIGURA 5 – Taxas fracionais de *clearance* (kc) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, recebendo infusão de ¹³C-Acetato (■), ¹³C-Propionato (●) e ¹³C-Butirato (▲). Correlação entre os valores estimados pelo Método B na técnica do ¹³C-AGV e os valores estimados pela técnica Hval-Co. Os dados foram gerados com as 7 amostras de fluido ruminal coletadas ao longo de todo o período amostral. ■ $kc^{13}\text{C-Acetato} = -17,92 + 1,4562 kc \text{ Hval}$; $r^2 = 0,40$; $P = 0,18$. ● $kc^{13}\text{C-Propionato} = -10,14 + 0,8076 kc \text{ Hval}$; $r^2 = 0,21$; $P = 0,36$. ▲ $kc^{13}\text{C-Butirato} = 7,10 + 0,6829 kc \text{ Hval}$; $r^2 = 0,13$; $P = 0,47$.

1995) (TABELA 3). Uma possível explicação para a semelhança na taxa de *clearance* entre ácidos seria a interconversão do carbono 1 entre acetato, propionato e butirato (Armentano & Young, 1983). A queda da relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, mensurada nesse trabalho, representa todo o isótopo estável oriundo de AGV presente no ambiente ruminal, uma vez que a técnica utilizada não separou cada AGV marcado antes da mensuração por espectrometria de massa. A similaridade nas taxas fracionais parece ser mais corretamente interpretada como o desaparecimento de ^{13}C introduzido no rúmen como 1- ^{13}C -AGV, mas não necessariamente absorvido como o AGV infundido. Esse fato pode explicar a maior coerência dos dados obtidos pelo Método A, já que esse expressou o ^{13}C proporcionalmente ao pool ruminal de ^{12}C oriundo de todos os AGV não-valéricos, comparativamente ao Método B que considerou apenas a proporção de ^{12}C oriunda do AGV infundido.

O efeito do pH ruminal sobre as taxas fracionais de absorção (TABELA 3) deve ser considerado. Dijkstra et al. (1993) não observaram correlação positiva entre o tamanho da cadeia de carbono e a velocidade de absorção de cada AGV em valores de pH acima de 5,4. Quando o pH inicial de uma solução de AGV introduzida no rúmen evacuado de vacas leiteiras foi 4,5, a taxa fracional de absorção de acetato foi 35 % h⁻¹, a de propionato foi 67 % h⁻¹ e a de butirato foi 85 % h⁻¹. Em pH 5,4, a taxa de acetato foi idêntica à anterior e as taxas de propionato e butirato foram 54 e 53 % h⁻¹, respectivamente. Em pH 6,3, similar ao pH ruminal obtido nesse experimento (TABELA 2), a taxa de acetato foi 33 % h⁻¹, enquanto a taxa do butirato foi 46% h⁻¹, inferiores, portanto, ao valor do propionato (51 % h⁻¹). Em pH 7,2, a taxa do butirato foi ainda mais reduzida proporcionalmente à de propionato. No presente experimento, o propionato também teve a maior taxa fracional de absorção pela parede ruminal dentre os AGV estudados. Como valores de pH ruminal acima de 5,4 são prevalentes em vacas leiteiras (Garrett et al., 1999), pode ser que propionato

seja o AGV mais rapidamente absorvido *in vivo*. O maior valor numérico das taxas fracionais de absorção de Dijkstra et al. (1993), comparativamente aos dados desse trabalho (entre 14,2 e 19,2 % h⁻¹), pode ser decorrente do fato de esses autores terem utilizado a técnica de esvaziamento ruminal e introdução de uma solução de AGV, o que provavelmente aumentou a relação entre a superfície de parede ruminal apta à absorção e o volume de solução, comparativamente à mistura dos marcadores à digesta ruminal.

A taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal foi em torno de 15% h⁻¹, tanto para o cálculo envolvendo todas as amostras obtidas ao longo do período amostral, quanto para as amostras das primeiras quatro horas (TABELA 3). Como o número de amostras utilizadas também teve pouco efeito sobre as estimativas de taxa fracional de *clearance* e absorção obtidas pelo Método A, parece que a amostragem por apenas 4 horas após infusão é suficiente, resultando em maior facilidade na condução experimental.

O desaparecimento de AGV por passagem correspondeu a cerca de 50% do *clearance* total estimado pelo Método A, na técnica do ¹³C-AGV, e pela técnica Hval-Co (TABELAS 3 e 4), assumindo que a taxa de passagem de fluido é um estimador razoável do desaparecimento de AGV por passagem para o omaso. Esse valor é similar à estimativa de Peters et al. (1990b), baseada na infusão contínua de propionato em novilhos consumindo alimento. A manipulação nutricional da capacidade de absorção da parede ruminal (Dirksen et al., 1984) tem potencial como ferramenta para o controle do pool intraruminal de AGV; no entanto, a manipulação da taxa de passagem de fluido tem potencial de atuação semelhante. Melhor compreensão da absorção de AGV no omaso e abomaso (Bueno et al., 1972, Rupp et al., 1994) pode auxiliar

TABELA 4 – Taxas fracionais de *clearance* ruminal de AGV (kc) de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, estimadas por valerato marcado e não marcado simultaneamente nos mesmos animais. Taxas fracionais de desaparecimento por passagem com a fase fluida (kp) e de desaparecimento por absorção pela parede ruminal (ka). Experimento 2.

	Ao longo de todo o período amostral ¹				Primeiras 4 horas ²			
	¹³ C-Val	Hval-Co	EPM	P*	¹³ C-Val	Hval-Co	EPM	P*
kc ³ (% h ⁻¹)	33,7	34,9	1,3	0,57	33,7	35,0	1,3	0,53
Ka ⁴ (% h ⁻¹)	17,5	18,7	1,3	0,57	18,7	19,9	1,3	0,53
Kp ⁵ (% h ⁻¹)	16,2				15,1			

III

¹ Média de 7 pontos de amostragem ao longo de todo o período amostral.

² Média de 6 pontos de amostragem das primeiras 4 horas.

³ Estimado pela queda exponencial da relação ¹³C/¹²C ou da concentração de valerato, ao longo do tempo.

⁴ Estimado por diferença entre a taxa fracional de *clearance* e a taxa fracional de passagem.

⁵ Estimado pela queda exponencial da concentração de cobalto ao longo do tempo.

EPM – Erro padrão da média .

* P para o efeito de ácido.

na compreensão de distúrbios metabólicos resultantes da produção excessiva de AGV no rúmen (Svendsen, 1969). Métodos que mensuram a capacidade absorptiva por esvaziamento ruminal, seguida por introdução de soluções de AGV (Dijkstra et al., 1993; Perrier et al., 1994; Sutton et al., 1963), também podem não representar a capacidade real de *clearance* de AGV do órgão.

Não foi detectada diferença entre técnicas nas estimativas da taxa fracional de *clearance* e de absorção de valerato obtidas simultaneamente no Experimento dois (TABELA 4), mostrando a precisão da estimativa entre técnicas. Os valores de absorção de valerato obtidos no Experimento dois também foram similares às estimativas para acetato, propionato e butirato obtidas no Experimento um. O efeito, já discutido, do pH ruminal pode ter contribuído para essa similaridade. A taxa fracional de *clearance* de valerato estimada pela técnica Hval-Co nas 18 infusões do Experimento um foi $34,3 \% h^{-1}$, tanto para o cálculo com os 7 pontos de amostragem ao longo de todo o período amostral, como para os dados dos seis pontos de amostragem das primeiras quatro horas. A taxa fracional de absorção foi $19,2 \% h^{-1}$ para os dados entre evacuações e $19,0 \% h^{-1}$ para os dados das primeiras quatro horas. A precisão da técnica de Hval-Co foi alta entre experimentos. Allen et al. (2000) obtiveram estimativas da taxa fracional de absorção de valerato por infusão de valerato não-marcado no rúmen de vacas Holandesas não-gestantes e não-lactantes e previamente alimentadas com dietas de baixa ou alta fermentabilidade variando de 16 a $25 \% h^{-1}$, similar às estimativas desse trabalho.

A absorção de energia metabolizável oriunda de AGV ruminal foi estimada para averiguar a acurácia das taxas fracionais de *clearance* (TABELA 5). O volume de líquido ruminal foi estimado pelo intercepto da equação exponencial descrevendo a queda na concentração ruminal de Co ao longo do tempo e pelo peso de digesta ruminal mensurado na evacuação multiplicado

pelo seu teor de matéria seca (FIGURA 6). O volume de líquido ruminal estimado pelo peso e teor de matéria seca da digesta foi maior, provavelmente por incluir a umidade dentro das partículas alimentares. O pool ruminal de AGV foi calculado multiplicando o volume de líquido ruminal, estimado pelos dois métodos, pela concentração média de acetato (80,3 mM), propionato (24,3 mM) e butirato (13,7 mM) de todas as amostras obtidas no tempo zero. O fluxo diário de cada AGV (moles/dia) foi calculado com as taxas fracionais de *clearance* de cada ácido geradas pelo Método A com os dados das primeiras 4 horas de amostragem (TABELA 3) e com o *kc* de valerato estimado simultaneamente pela técnica Hval-Co em cada um dos grupos de vacas que receberam os ácidos marcados. Esses valores foram 35,0, 35,0 e 33,1 % h⁻¹ para o grupo de vacas que receberam acetato, propionato e butirato marcados, respectivamente, e foram assumidos como representativos do *kc* de cada um desses ácidos.

A absorção diária de energia metabolizável oriunda de acetato, propionato e butirato estimada pela técnica ¹³C-AGV foi 91% do valor estimado pela técnica Hval-Co (TABELA 5). A energia oriunda desses ácidos foi responsável por 52 a 65% da exigência de energia metabolizável de manutenção e produção da vaca média, dependendo do método de cálculo. Bergman (1990), após revisar a literatura no assunto, concluiu que 65 a 75% da exigência de energia metabolizável de ovinos é oriunda de acetato, propionato e butirato ruminais. Esse autor também constatou que o acetato corresponde a cerca de 50% do fluxo calórico oriundo de AGV ruminais, enquanto tanto o propionato quanto o butirato contribuem com cerca de 25% cada um. Nesse trabalho a estimativa da absorção de acetato, propionato e butirato por kg de matéria seca ingerida variou de 4,7 a 5,9 moles kg⁻¹. Assumindo que esses três AGV representam cerca de 95% do total de AGV produzidos no rúmen, a estimativa da produção total de AGV por quilo de matéria seca ingerida variou de 4,9 a

TABELA 5 – Estimativa do fluxo de acetato, propionato e butirato do rúmen de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, calculada a partir do volume de líquido ruminal, da concentração ruminal de AGV no tempo zero e da taxa fracional de *clearance* de acetato, propionato e butirato estimados pelo Métodos A e pela técnica Hval-Co, todos com amostras de fluido ruminal obtidas nas primeiras 4 horas. Experimento 1.

	Intercepto ⁵		Peso e MS ⁵	
	Método A	Hval-Co	Método A	Hval-Co
Acetato (moles/d)	55,3	62,1	63,1	70,8
Propionato (moles/d)	17,9	18,8	20,5	21,4
Butirato (moles/d)	9,2	10,0	10,5	11,4
AGV/Ingestão de MS (moles/kg) ¹	4,7	5,1	5,3	5,9
Acetato (Mcal/d) ²	11,6	13,0	13,2	14,8
Propionato (Mcal/d) ²	6,6	6,9	7,5	7,9
Butirato (Mcal/d) ²	4,8	5,2	5,5	6,0
AGV total (Mcal/d)	23,0	25,1	26,2	28,7
EM de AGV (% da exigência) ³	52,3	57,2	59,7	65,3
CC de Acetato (% do total) ⁴	50,4	51,7	50,4	51,7
CC de Propionato (% do total) ⁴	28,6	27,4	28,6	27,4
CC de Butirato (% do total) ⁴	21,0	20,9	21,0	20,9

¹ Ingestão de matéria seca = 17,7 kg/d

² O fluxo de energia metabolizável foi calculado assumindo os seguintes calores de combustão para acetato, propionato e butirato, respectivamente: 209, 367 e 524 kcal/mol.

³ A exigência de energia metabolizável para manutenção e produção foi calculada considerando uma vaca de 568 kg, produzindo 25,7 kg/d com 4,11 % de gordura, 3,03 % de proteína e 4,34 % de lactose. Exigência = 43,88 Mcal de EM/d (NRC, 2001).

⁴ CC = Contribuição calórica de cada AGV

⁵ O volume de líquido ruminal foi estimado pelo intercepto da equação exponencial descrevendo a queda na concentração ruminal de Co ao longo do tempo (Intercepto) e pelo peso de digesta ruminal mensurado na evacuação ruminal multiplicado pelo seu teor de matéria seca (Peso e MS).

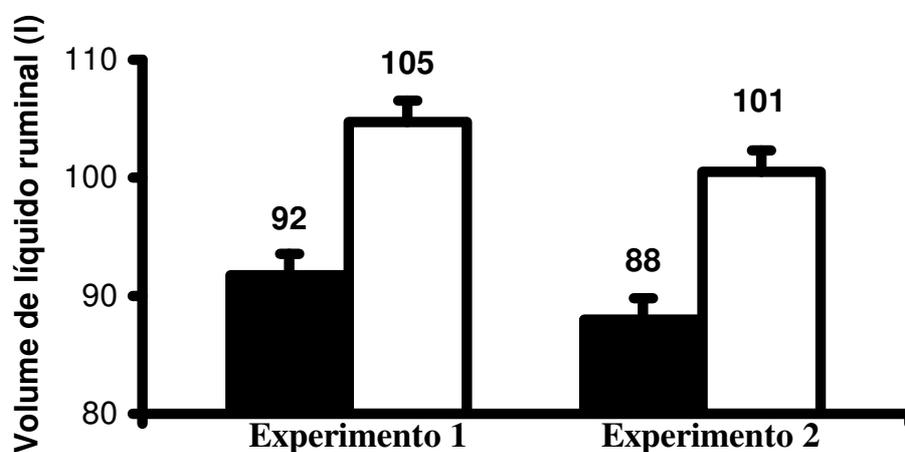


FIGURA 6 - Volume inicial de fluido ruminal de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, calculado pela concentração de cobalto no tempo zero estimada pelo intercepto da regressão não linear descrevendo a queda na concentração ruminal de cobalto ao longo do tempo (■) ou pelo peso da digesta ruminal multiplicado pelo seu teor de matéria seca na evacuação (□). $P < 0,01$ para efeito de técnica em ambos experimentos.

6,2. Bergman (1990), em sua revisão, cita que a produção ruminal diária de AGV é de aproximadamente cinco moles por quilo de MS ingerida. A magnitude das taxas fracionais de *clearance* determinadas nesse trabalho tanto pela técnica do ^{13}C -AGV como pela técnica Hval-Co parecem ser coerentes biologicamente.

Uma opção para corrigir a ligeira superestimativa de fluxo de AGV quando se utiliza a taxa fracional de *clearance* de valerato estimada pela técnica Hval-Co para os ácidos acetato, propionato e butirato (TABELA 5) seria utilizar valores de k para cada AGV estimados a partir do dado de valerato não-marcado. Para obter uma estimativa dessas taxas, foi gerada a regressão das

taxas fracionais de *clearance*, estimadas por cada AGV marcado com ^{13}C , contra os dados obtidos pela técnica Hval-Co em cada vaca e em cada período (Figuras 2 a 5). As regressões para as estimativas obtidas pelo Método A com dados das primeiras 4 horas (FIGURA 2) foram: $\text{kc } ^{13}\text{C-Acetato} = 5,19 + 0,7427 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,51$; $P = 0,07$. $\text{kc } ^{13}\text{C-Propionato} = 19,17 + 0,4073 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,56$; $P = 0,08$. $\text{kc } ^{13}\text{C-Butirato} = 7,21 + 0,7000 \text{ kc Hval}$; $r^2 = 0,99$; $P < 0,001$. A qualidade das regressões foi proporcional à semelhança química entre o AGV utilizado como variável dependente e o valerato. Entretanto, as mesmas regressões entre os dados gerados com $^{13}\text{C-Valerato}$ e os dados da técnica Hval-Co no Experimento dois tiveram $r^2 = 0,20$ e $P = 0,37$, mostrando que a similaridade química entre os ácidos não é a única variável que determina qualidade das regressões (FIGURA 7). A metodologia de ajuste matemático pode ser penalizada pelo fato de os dados de acetato, o AGV responsável por 50% da contribuição calórica absorvida, serem os menos correlacionados com os dados obtidos com valerato não-marcado. Essas regressões requerem validação feitas com um banco de dados independente.

A correlação entre o desaparecimento ruminal de valerato estimada pela técnica Hval-Co e o pH médio ao longo das primeiras quatro horas de coleta de dados foi avaliada utilizando as 18 observações do Experimento 1 e as 6 do Experimento 2 (FIGURA 8). As taxas de *clearance*, absorção e passagem foram positivamente correlacionadas ao pH ruminal. Maior volume de líquido ruminal foi negativamente associado à taxa fracional de desaparecimento de valerato (FIGURA 9). Vacas com maior conteúdo de líquido no rúmen tiveram menor valor de pH (FIGURA 10). Múltiplas relações de causa e efeito podem ser propostas entre essas variáveis. Com aumento no volume de uma solução de AGV introduzida no rúmen evacuado de vacas leiteiras, foi observada queda na taxa fracional de absorção de acetato, propionato e butirato, provavelmente por queda na relação entre a superfície de absorção e a solução infundida (Dijkstra

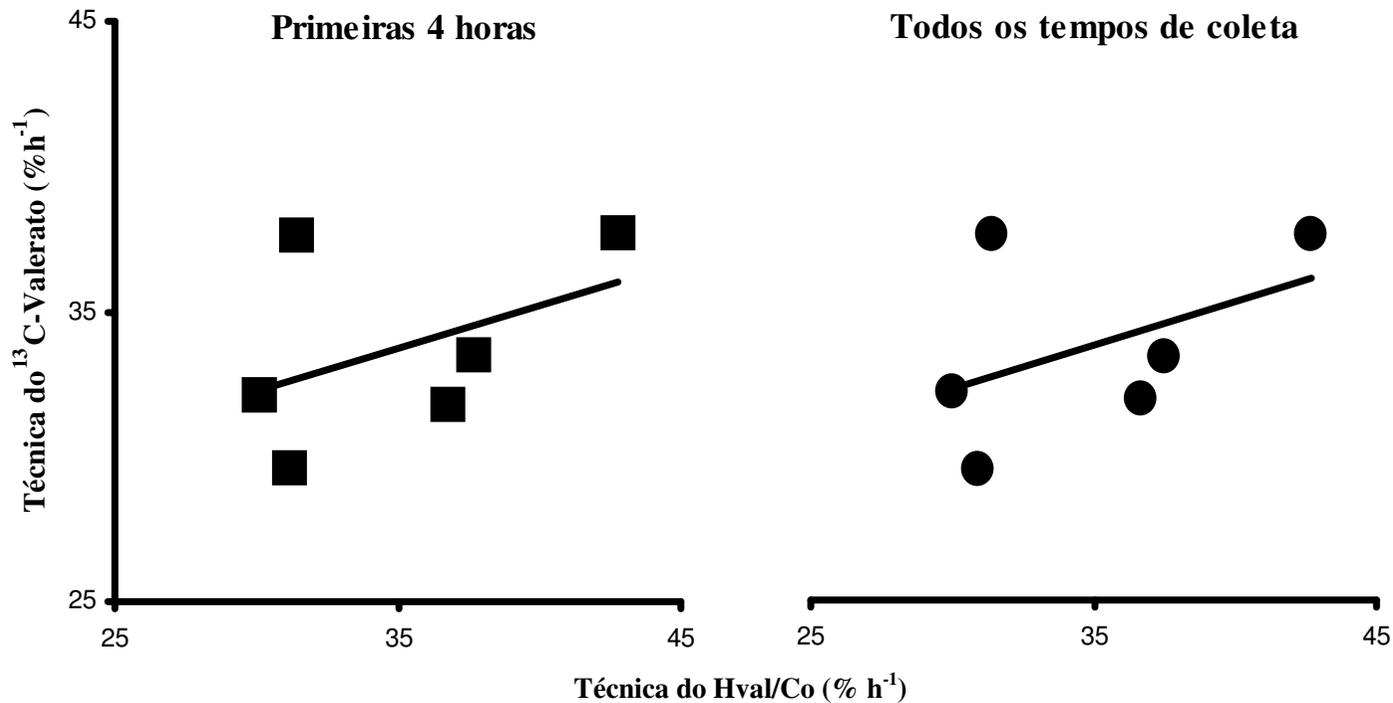


FIGURA 7 – Taxas fracionais de *Clearance* de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado, recebendo infusão de ¹³C-Valerato. Correlação entre os valores estimados pelo Método A e os valores estimados pela técnica Hval-Co. Dados gerados com as 6 amostras de fluido ruminal coletadas nas primeiras 4 horas e com as 7 amostras de fluido ruminal coletadas ao longo de todo o período amostral. ■ $k_c \text{ } ^{13}\text{C valerato} = 23,38 + 0,2984 \text{ Hval}$; $r^2 = 0,20$; $P=0,37$. ● $k_a \text{ } ^{13}\text{C valerato} = 23,33 + 0,2983 \text{ Hval}$; $r^2 = 0,20$; $P=0,37$.

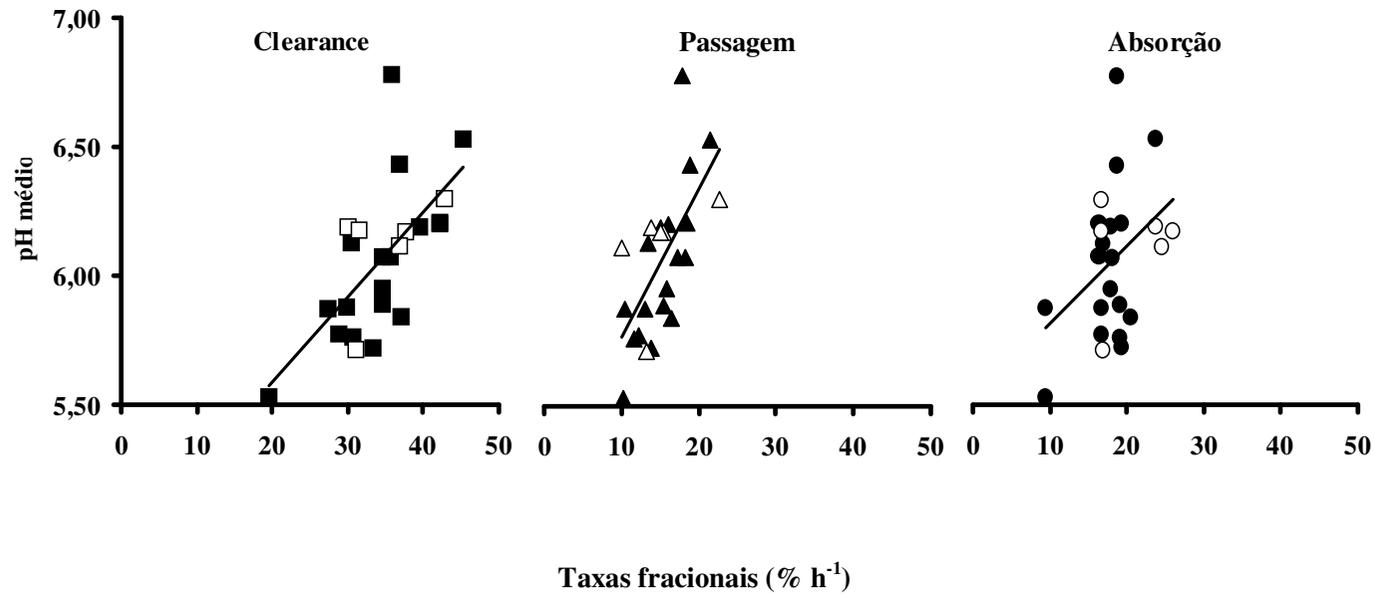


FIGURA 8 – Taxas fracionais de *Clearance*, passagem com a fase fluida e absorção pela parede ruminal de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado. Média de pH entre os tempos de coleta das primeiras 4 horas, nos animais recebendo infusão de valerato não marcado. Correlação entre os valores médios de pH e as taxas fracionais estimadas pela técnica Hval-Co no experimento 1 (■▲●) e experimento 2 (□△○); ■□ pH = $4,93 + 0,0328$ kc Hval; $r^2 = 0,43$; $P < 0,001$. ▲△ pH = $5,18 + 0,0578$ kp Hval; $r^2 = 0,45$. $P < 0,001$. ●○ pH = $5,51 + 0,0302$ ka Hval; $r^2 = 0,17$; $P = 0,05$.

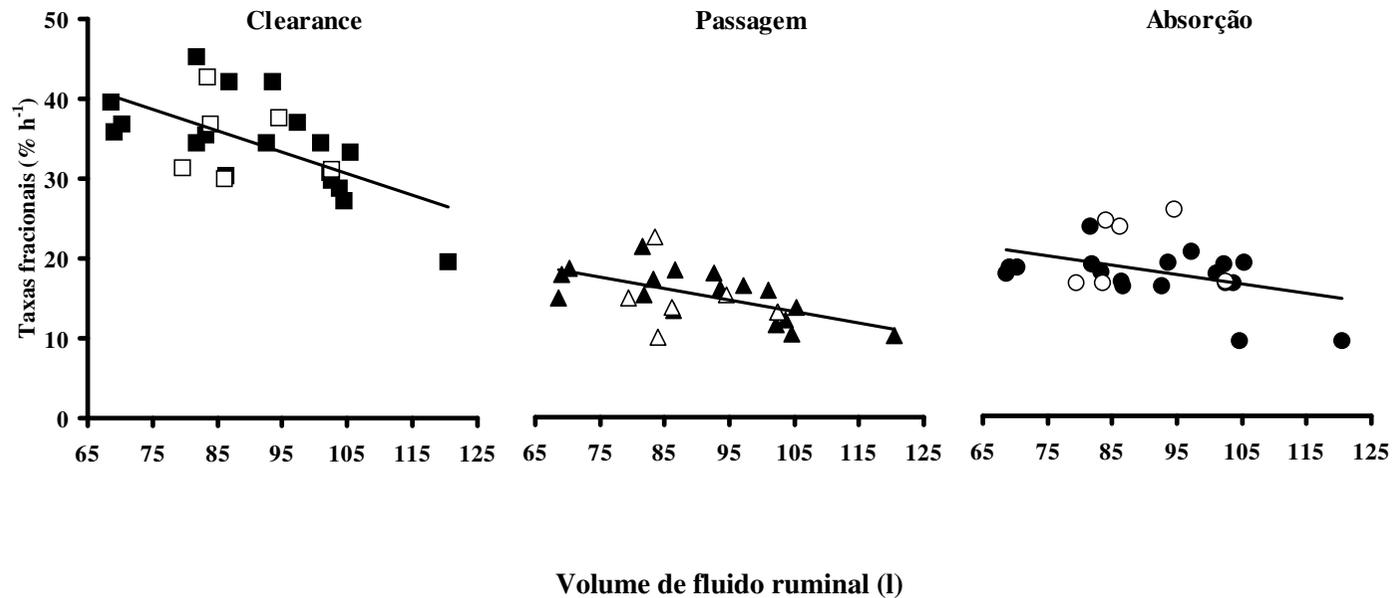


FIGURA 9 – Taxas fracionais de *Clearance*, passagem com a fase fluida, absorção pela parede ruminal e volume de fluido ruminal inicial de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado. Correlação entre os valores das taxas fracionais estimadas pela técnica Hval-Co e o volume de fluido ruminal inicial estimado por diluição de cobalto no tempo zero, no experimento 1 (■▲●) e experimento 2 (□△○). ■□ *Clearance* = $58,89 - 0,2684$ volume de fluido ruminal; $r^2 = 0,37$; $P < 0,01$. ▲△ *Passagem* = $28,25 - 0,1431$ volume de fluido ruminal; $r^2 = 0,31$ $P < 0,01$. ●○ *Absorção* = $29,07 - 0,1184$ volume de fluido ruminal; $r^2 = 0,16$; $P = 0,05$.

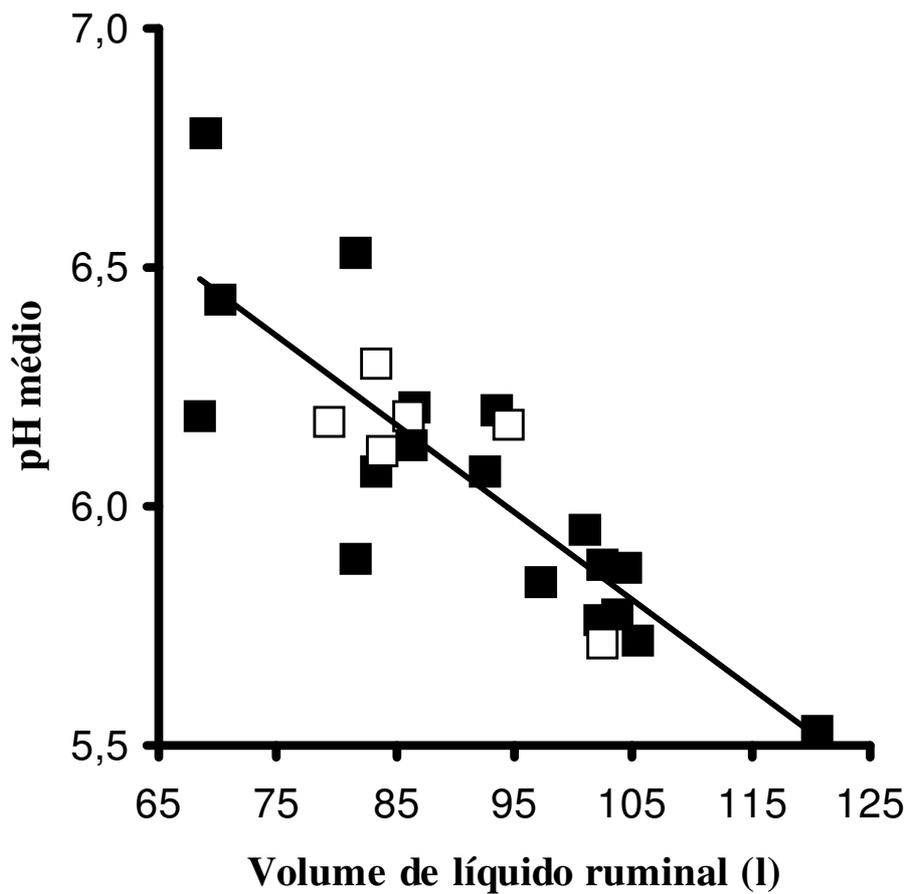


FIGURA 10 – pH médio entre os tempos de coleta das primeiras 4 horas e volume de fluido ruminal inicial, estimado pela diluição de cobalto no tempo zero, de vacas Holandesas lactantes alimentadas com azevém fresco e concentrado. Correlação entre os valores de pH e o volume de fluido ruminal, no experimento 1(■) e experimento 2 (□). $\text{pH} = 7,73 - 0,0184 \text{ volume de fluido ruminal}$; $r^2 = 0,70$; $P < 0,001$.

et al., 1993). Nesse mesmo trabalho, aumento no pH inicial da solução de 4,5 para 7,2 também resultou em queda na taxa de absorção, sendo, provavelmente, resultado do efeito do pH sobre a proporção entre as formas protonadas e ionizadas de cada ácido (Gabel, 1995). O pH ruminal médio ao longo do período de amostragem variou de 5,53 a 6,78 nesse trabalho (FIGURAS 8 e 10), sendo teoricamente incapaz de causar variação na taxa fracional de absorção de AGV (Dijkstra et al., 1993). O fato de a maior taxa fracional de passagem também ter sido associada a menor valor de pH ruminal (FIGURA 8), parece implicar que o alto pH ruminal foi consequência da maior taxa fracional de *clearance* de AGV, e não o contrário. Baseado nesses dados, pode-se supor que vacas em lactação, com maior consumo diário de matéria seca que vacas não-lactantes, e conseqüentemente com maior volume de líquido ruminal, poderiam ter menores taxas fracionais de absorção de AGV e maior propensão a apresentarem baixo pH ruminal. Desconhecem-se mensurações da taxa fracional de *clearance* de AGV em vacas lactantes comparativamente a vacas não-lactantes obtidas nas mesmas unidades experimentais e em planos nutricionais condizentes à demanda nutricional de vacas com alta aptidão leiteira.

6 CONCLUSÃO

As taxas fracionais de *clearance* e absorção ruminal de AGV obtidas pela técnica dos isótopos estáveis foram semelhantes àquelas obtidas pela técnica Hval-Co, indicando que ambas as técnicas apresentam eficiência na determinação do *clearance* ruminal de AGV e em cálculos de absorção de energia metabolizável.

Equações lineares baseadas em estimativas de *clearance* de valerato não-marcado obtidas pela técnica Hval-Co podem ser úteis na predição da taxa fracional de *clearance* de acetato, propionato e butirato. No entanto, as regressões foram melhores para butirato do que para acetato e propionato.

A taxa fracional de passagem de AGV com a fase fluida tem importância quantitativa semelhante à taxa fracional de absorção pela parede ruminal no *clearance* de AGV.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.S., L.E. ARMENTANO, M.N. PEREIRA, Y. YING, AND J. XU. Method to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 25., 2000, Chicago. **Proceedings ...** Chicago, 2000. p.26.

ANALYSIS, I.-A.-E. I. S. I. **Beginners guide for stable isotope analysis.** Information about Stable Isotope analysis of Hydrogen, Carbon, Nitrogen, Oxygen, and Sulfur. Disponível em: <<http://www.iso-analytical.com/page21.html>>. Acesso em: 03 Sept. 2002.

ARMENTANO, L. E. ; YOUNG, J. W. Production and metabolism of volatile fatty acids, glucose and CO₂ in steers and the effects of monensin on volatile fatty acid kinetics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.113, n.6, p.1265-1277, 1983.

ARMENTANO, L. **Effects of monensin on volatile fatty acid kinetics in steers**. 1982. 153 p. Dissertation (PhD. Level)-Iowa State University, Ames.

BARCROFT, J.; MCANALLY, R. A. ; PHILLIPSON, A. T. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. **Journal of Experimental Biology**, London, v.20, p.120-129, 1944.

BARKER, I. K. , VAN DREUMEL, A. A. ; PALMER. The alimentary system. In: JUBB, K. V. F., KENNEDY P. C. **Pathology of domestic animals**. 4th.ed. E PALMER, N. San Diego: Academic, 1995. v.2, p.1.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.70, p.567-590, 1990.

BERGMAN, E. N.; REID, R. S.; MURRAY, M. G.; BROCKWAY, J. M.. WHITELOW, F. G. Interconversions and production of volatile fatty acids in sheep rumen. **Biochemistry Journal**, v.97, p.53-58, 1965.

BUENO, L.; GOODALL, E. D.; KAY, R. N. B. e RUCKEBUSCH, Y. On the function of the sheep's omasum. **Journal of Physiology**, v.227, p.14, 1972.

CHEN, X. et al. Het meten van vluchtige vetzuurproducties m.b.v. stabiele isotopen in de pens van koeien. In: **STUDIEDAG NEDERLANDSTALIOGE VOEDINGSONDERZOEKERS**. 22, 1997, Wageningen, 1997. **Proceedings...** Wageningen, 1997. p.76-77.

COTTA, M. A.; HESPEL, R. B. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W. L. ; DOBSON, A. (Ed). **Control of digestion and metabolism in ruminants**. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1986. p. 122-136.

CRICHLOW, E.C.; CHAPLIN, R.K. Ruminant lact acidosis: Relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.46, p. 1908-1911, Sept.1985.

DADO, R.G.; ALLEN, M.S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, p. 118-33, Jan. 1995.

DIJKSTRA, J. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.69, n.2, p.385-396, 1993.

DIRKSEN, G.; LIEBICH, H.G.; BROSI, G.; HAGEMMEISTER, H.; MAYER, E. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureresorption beim Rind - bedeutende Faktoren für Gesundheit und Leistung. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v.31, p. 414-430, July 1984.

ELLIOT, J. P.. DRACKLEY, J.K.; FAHEY, G.C.; SHANKS, R.D. Utilization of supplemental fat by dairy cows fed diets varying in content of nonstructural carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, p.1512-1525, July 1995

FRANCE, J. ; SIDDON, R. C. Volatile Fatty Acid Production. In: FORBES J. M. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: C.A.B International, 1993. Cap.5, p.107-121.

GABEL G.; ASCHENBACH J. R.; MULLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Anim Health Research Reviews**, Wallingford, v.3, n.1, p. 15-30, June 2002.

GABEL, G.; MÜLLER, F.; PFANNKUCHE, H. ASCHENBACH, J. R. Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium. **Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v.171, n.3, p.215-221, Apr. 2001.

GABEL, G. Transport of short-chain fatty acids in the ruminant forestomach. In: CUMMINGS, J.H. ROMBEAU, L. SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University, 1995. Cap 9, p. 133-147.

GALFI, P.; NEOGRADY, S. ; GABEL, G. Na⁺/H⁺ exchange in primary, secondary and n-butyrate-treated cultures of ruminal epithelial cells: short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.50, n.2, p.211-215, 2002.

GARRETT, E. F.; PEREIRA, M.N.; NORDLUND, K.V., ARMENTANTO, L. E.; GOODGER, W.J.; OETZEL, G.R. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.6, p.1170-1178, 1999.

GRANT, R.J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer pH and raw cornstarch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p. 2762-2768, Oct. 1992.

GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F.; RODDA, H. J. e WELLER, R. A. The nature and origin of the volatile fatty acids in the rumen of the sheep. **Journal of Experimental Biology**, v.29, p.57-68, 1952.

GREATHEAD, H. M. R.; DAWSON, J. M.; SCOLLAN, N. D. BUTTERY, P. J. In vivo measurement of lipogenesis in ruminants using [1-(14)C]acetate. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.86, n.1, p.37-44, July 2001.

GREGORY, P. C. Inhibition of reticulo-ruminal motility by volatile fatty acids and lactic acid in sheep. **Journal of Physiology**, Paris, v.382, p.355-371, 1987.

HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, P. J. ; TYRRELL, H. F. Net absorption and ruminal concentrations of metabolites in nonpregnant dry Holstein cows before and after intraruminal acetic acid infusion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.66, n.9, p.1901-1908, 1983.

KRAMER, T.; MICHELBERGER, T.; GÜRTLER, H.; GÄBEL, G. Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep. **Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v.166, n.4, p.262-269, 1996.

KREHBIEL, C. R. BRITTON, R. A.; HARMON, D. L.; WESSER, T. J.; STOCK, R. A. The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption

and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.10, p.3111-3121, Oct. 1995.

KRISTENSEN, N. B. Rumen microbial sequestration of [2-(13)C]acetate in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.79, n.9, p.2491-2498, Sept. 2001.

KRISTENSEN, N.B.; DANFAER, A. The relationship between gastrointestinal production and portal absorption of short-chain fatty acids in ruminants. In: SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM IN ANIMALS 15., 2001, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen Pers: EAAP, 2001. p. 277-280.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Tradução por Carlos Henrique Britto de Assis Prado. Sao Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. xviii, 531p.

LEEK, B. F.; HARDING, R. H. Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticuloruminal motility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RUMINANT PHYSIOLOGY, DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT, 4., 1975, Sydney. **Proceedings...** Australia, 1975. p 60.

LEHNINGER, L. A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução por Arnaldo Antônio Simões ; Wilson Roberto Navega Lodi. 2.ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839p.

LIANG, Y.; WHITE, W. S.; YAO, L.; SERFASS, R. E. Use of high-precision gas isotope ratio mass spectrometry to determine natural abundance ¹³C in lutein

isolated from C₃ and C₄ plant sources. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.800, n.1, p.51-58, Mar. 1998.

LOPEZ, S.; HOVELL, F. D.,D. D_EB.; MACLEOD, N. A. Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **British Journal of Nutrition**, v.71, n.2, p.153-168, 1994.

MARTIN, C.; KRISTENSEN, N. B. ; HUHTANEN, P. Comparison of non-tracer and tracer methods for determination of volatile fatty acid production rate in the rumen of sheep fed on two levels of intake. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.86, n.3, p.331-340, Sept. 2001.

MAYES, R. W.; LAMB, C. S. ; GOLGROVE, P. M. The use of both [14C] and [13C] tracers to derive models of carbon flux through plasma glucose and blood CO₂ pools in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, p.122-123, 1984. Suppl.

METGES, C. ; KEMPE, K. ; SHMIDT, H. L. Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the delta 13C value of food in dairy cows. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.63, n.2, p.187-196, Mar. 1990.

MULLER, F.; HUBER , K.; PFANNKUCHE , H.; ASCHENBACH, J.R.; BREVES, G.; GABEL, G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. **American Journal Gastrointestinal Liver Physiology**. v.283, n.5, p.1139-1146, Nov. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7th rev. ed. Washington: National Academy of Science, 2001. 408 p.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The anatomy of the domestic animals:** the circulatory system, the skin, and the cutaneous organs of the domestica mamals. Berlim-Hamburg: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3, 610 p.

NOZIERE, P.; MARTIN, C.; RÉMOND, D.; KRISTENSEN, N.B.; BERNARD, R.; DOREAU, M. Effect of composition of ruminally-infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.83, n.5, p.521-531, May 2000.

PEREIRA, M. N. ; ARMENTANTO, L.E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.12, p.2876-2887, Dec. 2000.

PERRIER, R.; FERCHAL, E.; DURIER, C.; DOREAU, M. Effect of undernutrition on the ability of the sheep rumen to absorb volatile fatty acids. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v.34, n.4, p.341-347, 1994.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; ROBINSON, J. A.; CHESSER, S. T. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.68, n.10, p.3337-3349, 1990a.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; CHESTER, S. T. Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.68, p.3905-3913, 1990b.

PETERS, J. P.; LEEDLE, J. A. Z. ; PAULISSEN, J. B. Factors affecting the in vitro production of volatile fatty acids by mixed bacterial populations from the bovine rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.67, p.1593-1602, 1989.

REYNOLDS, P. J. ; HUNTINGTON, G. B. Net portal absorption of volatile fatty acids and L(+)-lactate by lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.1, p.124-133, 1988.

ROWE, J. B.; LOUGHNAN, M. L.; NOLAN, J. V.; LENG, R. A. Secondary fermentation in the rumen of a sheep given a diet based on molasses. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.41, n.2, p.393-397, Mar. 1979.

RUPP, G. P.; KREIKEMEIER, K. K.; PERINO, L. J.; ROSS, G. S. Measurement of volatile fatty acid disappearance and fluid flux across the abomasum of cattle, using an improved omasal cannulation technique. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.55, n.4, p.522-529, 1994.

RUSSELL, J. B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.12, p.3222-3230, Dec. 1998.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal propionate and acetate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.62, p.49-52, Jan. 1979.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, p.1109-1113, Aug. 1978.

SANDER, E.G; WARNER, R.G.; HARRISON, H.N.; LOOSLI, J.K. Stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.42, p.1600, 1959.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Ruminant transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.123, n.4, p.359-368, Aug. 1999a.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium--interaction with sodium, chloride and bicarbonate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v.123, n.4, p.399-408, Aug. 1999b.

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. **Physiology Reviews**, Washington, v.78, n.2, p.393-427, Apr. 1998.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD A. D.; JACOBSON N. L. Functional development of rumen mucosa. I. Absorptive ability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.46, p.426-436, 1963

SVEJCAR, T. J.; JUDKINS, M. B. ; BOUTTON, T. W. Technical Note: Labeling of Forage with ¹³C for Nutrition and Metabolism Studies. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, p.1320-1325, 1993.

SVEJCAR, T.-J.; BOUTTON, T.-W. ; TRENT, J.-D. Assessment of carbon allocation with stable carbon isotope labeling. **Agronomy Journal**, Madison, v.82, n.1, p.18-21, 1990.

SVENDSEN, P. Etiology and pathogenesis of abomasal displacement in cattle. *Nordisk Veterinary medicine*, Copenhagen, v.21, p.1, 1969.Suppl.1.

TYRRELL, H. F.; PELLETIER, G.; CHEVALIER, R.; HILLAIRES-MARCEL, C.; GAGNON, M. Use of carbon 13 as tracer in metabolism studies. **Canadian Journal of Animal Science**, v.3, p.127-129, 1984.

UDEN, P.; COLUCCI, P. E. ; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.31, n.7, p.625-632, 1980.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University, 1994.

VOROBIEVA, L. Physiological peculiarities of propionibacteria - present facts and prospective applications. **Science Progress**, Oxford, v.83, n.3, p.277-301, 2000.

WALDRON, M. R.; SCHRICK, F. N.; QUIGLEY, J. C.; KLOTZ, J. L.; SAXTON, A. M.; HEITMANN, R. N. Volatile fatty acid metabolism by epithelial cells isolated from different areas of the ewe rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, n.1, p.270-278, Jan. 2002.

WHEATON, H. N.; BRADLEY, N. W.; MITCHELL J^R, G. E.; LITTLE, C. O.; BOLING, J. A. Distribution of volatile fatty acids in rumen ingesta of steers fed concentrate and roughage diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.30, p.601-604, 1970.

WILSON, G. F.; MACKENZIE, D.D.S. ; BROOKES, I.M. Importance of body tissues as sources of nutrients for milk synthesis in the cow, using ¹³C as a marker. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.60, n.3, p.605-617, 1988.

WOLFFRAM S.; ZIMMERMANN W.; SCHARRER E. Transport of tricarballylate by intestinal brush-border membrane vesicles from steers. **Experimental Physiology**, v. 78, n.4, p. 473-484, July 1993.

WRONG, O. M. Definitions and history. In: CUMMINGS, J.H. ROMBEAU, L. SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University, 1995. Cap 1, p. 1-14.

YEH, H. W. ; WANG, W. M. Factors affecting the isotopic composition of organic matter. (1) Carbon isotopic composition of terrestrial plant materials. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part B, Life sciences**, Taipei, Taiwan, v.25, n.3, p.137-147, July 2001.