



FABÍOLA DA CRUZ MEIRELLES

**TÉCNICAS DE INFUSÃO DE MARCADORES PARA A
DETERMINAÇÃO DO *CLEARANCE* RUMINAL DE ÁCIDOS
GRAXOS VOLÁTEIS**

**LAVRAS - MG
2009**

FABÍOLA DA CRUZ MEIRELLES

**TÉCNICAS DE INFUSÃO DE MARCADORES PARA A DETERMINAÇÃO DO
CLEARANCE RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior
Orientador

Prof^a. Dra. Suely de Fátima Costa
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pela própria autora.**

Meirelles, Fabíola da Cruz.

Técnicas de infusão de marcadores para a determinação
do *clearance* ruminal de ácidos graxos voláteis / Fabíola da
Cruz Meirelles. - 2009.

58 p.

Orientador(a): João Chrysostomo de Resende Júnior.

Coorientador(a): Suely de Fátima Costa.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade
Federal de Lavras, 2009.

Bibliografia.

1. Acidose Ruminal. 2. Cr-EDTA. 3. Fisiologia
Ruminal. I. Resende Júnior, João Chrysostomo. II. Costa,
Suely de Fátima. III. Título.

FABÍOLA DA CRUZ MEIRELLES

**TÉCNICAS DE INFUSÃO DE MARCADORES PARA A DETERMINAÇÃO DO
CLEARANCE RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

**MARKERS INFUSION TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF RUMINAL
CLEARANCE OF VOLATILE FATTY ACIDS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de setembro de 2009.

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo UFLA

Dr. Márcio Machado Ladeira UFLA

Dra. Suely de Fátima Costa UFLA

Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior
Orientador

Prof^a. Dra. Suely de Fátima Costa UFLA
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2009**

Aos meus pais, Paulo Meirelles e Wanda Regina da Cruz Meirelles, que me proporcionaram a realização desta pós-graduação e que são a minha base familiar e meus grandes amores.

Á minha amada irmã, Flávia Regina da Cruz Meirelles, que se fez presente me apoiando, mesmo que à distância.

Ás minhas amigas Gabriela e Leandra, que estiveram ao meu lado durante os momentos mais difíceis, me incentivando a lutar sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a proteção, força, amor e luz.

Aos meus pais, pela dedicação, ensinamentos, amor e por tudo o que o que fizeram para que eu chegasse até o fim nesta conquista.

À minha irmã Flávia Regina da Cruz Meirelles por estar sempre ao meu lado, com seu carinho e apoio em todos os momentos.

Ao professor João Chrysostomo de Resende Júnior, deixo meus agradecimentos nos ensinamentos, que contribuíram na realização da dissertação.

Agradeço ao professor Mário César Guerrero que me auxiliou na realização das análises laboratoriais e ao professor Joel Augusto Muniz pelas orientações em estatística.

Aos colegas Matheus, Ronaldo e João Luiz, meus agradecimentos por me ajudarem durante o período experimental.

Às amigas Gabriela Saunders, Leandra Leal, Edvânia Pontes e Tatiane Padilha pela amizade, que ficarão nas boas lembranças cheias de companheirismo e incentivo. Agradeço por me mostrarem sempre o lado positivo, quando o caminho parecia confuso.

Às minhas amigas do coração, Ana Carolina Corrêa Enéias, Liana Villela de Gouvêa, Cínara Martins e Josione Amaral Abrel que, mesmo distantes, sempre me apoiaram.

Ao Dr. Hélio e a Dra Maria Lúcia, pelos cuidados médicos e pela atenção no período tão difícil da minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia e Veterinária, que me auxiliaram durante toda a condução do experimento.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Esquema da absorção ruminal de AGV na forma protonada (AGVH) por difusão e na forma dissociada (AGV⁻) através de troca iônica (O) com bicarbonato (HCO₃⁻), AC= anidrase carbônica..... 20

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

- Figure 1.** Volume of rumen fluid. Volume of rumen fluid estimated from the moisture content (MC) of the ruminal digesta or calculated from the exponential curve of chrome dispersion in ruminal fluid (IC) when the markers were added into evacuated digesta. Diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). P = 0.02 for effect of calculation method; P = 0.96 for effect of diet; P = 0.03 for interaction of diet and calculation method..... 50
- Figure 2.** Rumen fluid pH during sampling. Diets contained 100% forage (♦) or 50% forage plus 50% concentrate (■). P = 0.01 for diet effect; P = 0.06 for collection time effect..... 50
- Figure 3.** Total VFA. Acetate (Ac), propionate (Pr), and butyrate (Bu) concentrations in the rumen fluid when the marker solution was infused into the intact digesta diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). P = 0.03 for the diet effect..... 51
- Figure 4.** Total VFA concentration in the rumen fluid during sampling when the marker solution was infused into the intact digesta. Diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). P = 0.03 for diet effect, P = 0.12 for time effect, P = 0.39 for interaction of diet and time..... 53

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Table 1. Chemical composition of experimental diets.	49
Table 2. Clearance of volatile fatty acids (VFA), volume of rumen fluid, and determination coefficient of the exponential regressions describing the decay of ruminal valerate (R2 Val) and chrome (R2 Cr) concentrations over time.....	52

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Morfologia do estômago dos ruminantes	13
2.2	Ácidos graxos voláteis no ruminorretículo e pH ruminal	14
2.3	Formação de AGV no ruminorretículo.....	15
2.4	<i>Clearance</i> de AGV no ruminorretículo	18
2.5	Mensuração das taxas fracionais de <i>clearance</i> de AGV do ruminorretículo.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Delineamento e unidades experimentais	28
3.2	Dietas.....	28
3.3	Solução marcadora, métodos de infusão e coleta de amostras de fluido ruminal.....	28
3.3.1	Infusão dos marcadores à digesta intacta	29
3.3.2	Infusão dos marcadores à digesta evacuada	29
3.3.3	Coleta de amostras de fluido ruminal	30
3.4	Determinação do consumo de matéria seca	30
3.5	Determinação do volume da digesta.....	31
3.6	Mensuração das taxas fracionais de <i>clearance</i> de AGV	31
3.7	Mensurações morfológicas	33
3.7.1	Macroscopia	34
3.7.2	Microscopia	34
3.8	Análise estatística.....	35
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	43

RESUMO

A remoção (*clearance*) de ácidos graxos voláteis (AGV) do rúmen ocorre por absorção na parede do órgão ou por passagem com a fase fluida ruminal para o omaso. Conduziu-se este trabalho com o objetivo de validar uma técnica incipiente de infusão de marcadores de fase fluida à digesta intacta, por meio da comparação com outra técnica de mistura de marcadores à digesta ruminal evacuada, a qual apresenta eficiência comprovada. Quatro vacas foram alocadas a quatro tratamentos dispostos em parcelas subdivididas (*split plots*), alinhados em um arranjo fatorial 2x2: método de infusão de marcadores e dieta, com dois períodos simultâneos de 18 dias. As quatro combinações foram: dieta de forragem e infusão de marcadores à digesta intacta ou evacuada, dieta de forragem e concentrado e infusão de marcadores à digesta intacta ou evacuada. Quatro litros de solução de marcadores foram adicionados à digesta ruminal contendo 56,8 gramas de Cr-EDTA associados a 360 gramas de ácido valérico. Amostras seriadas de fluido ruminal foram coletadas para determinação do pH, da concentração de AGV e do teor de cromo. A taxa fracional do *clearance* total de AGV foi estimada pela queda exponencial da concentração de valerato ao longo do tempo. O *clearance* de AGV por passagem com a fase fluida foi estimado através da queda da concentração de cromo ao longo do tempo e a taxa fracional de *clearance* por absorção foi estimada por diferença. Uma biopsia foi realizada ao final de cada período para análises morfológicas. O volume de fluido ruminal foi mensurado através da concentração de cromo no tempo zero, estimada pelo intercepto da regressão não-linear descrevendo a queda na concentração ruminal de cromo ao longo do tempo e também pelo teor de matéria seca e pelo peso da digesta ruminal obtidos na evacuação ruminal. As taxas fracionais de *clearance* total de AGV e de absorção não diferiram ($P>0,30$) entre as técnicas, demonstrando que a técnica de infusão à digesta intacta é comparável à técnica de infusão à digesta evacuada. A taxa fracional de passagem da fase fluida, entretanto, foi menor ($P=0,06$) quando se adicionou marcadores à digesta evacuada, provavelmente refletindo a desestabilização do ambiente ruminal por ocasião da evacuação e homogeneização dos marcadores e também o maior volume de fluido observado nos animais com digesta evacuadas. Conclui-se que a técnica de infusão de marcadores à digesta intacta sem homogeneização artificial é eficiente para determinação do *clearance* ruminal de AGV e tem a vantagem de preservar a estratificação do ambiente ruminal, permitindo mensurações em condições mais próximas das fisiológicas.

Palavras-chave: Acidose ruminal. Cr-EDTA. Fisiologia ruminal.

ABSTRACT

The removal (clearance) of volatile fatty acids (VFA) from the rumen occurs by absorption through the wall of the body or passage through the rumen fluid phase to the omasum. This work was conducted in order to validate a method of incipient infusion of the liquid phase markers to digest intact by comparing with the mixing other markers of rumen digesta evacuated, which has proven. Four cows were allocated to four treatments in a split plots, aligned in a 2x2 factorial arrangement means the method of infusion of markers and diet, with two simultaneous periods of 18 days. The four combinations were: forage diet and infusion of markers to digest intact or evacuated, the diet of forage and concentrate and infusion of marker to digest intact or evacuated. Four liters of solution were added to the markers ruminal containing 56.8 grams of Cr-EDTA associated with 360 grams of valeric acid. Serial samples of rumen fluid were collected for determination of pH, concentration of VFA and chromium. The fractional clearance rate of total VFA was estimated by the exponential decay of the concentration of valerate over time. The clearance of VFA by passage to the fluid phase was estimated by a decrease in concentration of chromium over time and fractional clearance rate of absorption was estimated by difference. A biopsy was performed at the end of each period for the morphological analysis. The volume of rumen fluid was measured by the concentration of chromium at time zero, estimated by the intercept of the non-linear regression describing the drop in ruminal concentration of chromium over time and also the dry matter content and weight of rumen digesta obtained in ruminal evacuation. The fractional rates of VFA total clearance and absorption did not differ ($P>0.30$) between the techniques, showing that the infusion technique to digest intact is comparable to the infusion technique to digest evacuated. The fractional rate of passage of the fluid phase, however, was lower ($P=0.06$) when added to the digesta markers evacuated, probably reflecting the destabilization of rumen during the evacuation and homogenization of the markers and also the largest volume of fluid observed in animals with digesta evacuated. We conclude that the technique of infusion of markers to digest intact without artificial mixing is efficient for determining the clearance of ruminal VFA and has the advantage of preserving the stratification of the rumen, allowing measurements under conditions closer to physiological.

Keywords: Rumen acidosis. Cr-EDTA. Rumen physiology.

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A digestão de carboidratos, como a celulose e a hemicelulose, não pode ser feita por enzimas oriundas de mamíferos, exigindo um processo que envolve a colonização do trato gastrointestinal por microrganismos simbióticos. Os ácidos graxos voláteis (AGV), produzidos no trato gastrointestinal como subprodutos do metabolismo microbiano, podem prover até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes (BERGMAN, 1990).

A remoção (*clearance*) dos AGV produzidos no ruminorretículo ocorre por dois processos: absorção pela parede do órgão e passagem com a fase fluida ruminal pelo óstio retículo-omasal (PETER et al., 1990; RESENDE JÚNIOR et al., 2006b). Se a taxa de produção de AGV excede a taxa de *clearance*, haverá acúmulo dentro do ruminorretículo, podendo desencadear um distúrbio metabólico conhecido como acidose ruminal (BARKER et al., 1995), o qual tem efeitos negativos sobre o desempenho e a saúde dos ruminantes.

Entender a complexidade do *clearance* ruminal dos AGV é importante para melhor compreender a fisiologia ruminal. Para determinar a taxa de absorção de AGV diversas técnicas têm sido utilizadas, como coleta de sangue da veia porta e suas tributárias visando mensurar o aparecimento de AGV no sangue (HUNTINGTON; REYNOLDS; TYRRELL, 1983), infusão intra-ruminal de AGV marcados com isótopos radioativos (ROWE et al., 1979) ou isótopos estáveis (KRISTENSEN, 2001), evacuação ruminal e introdução de uma solução de AGV no rúmen lavado (DIJKSTRA et al., 1993), evacuação ruminal e adição de AGV marcado com isótopos estáveis (RESENDE JÚNIOR et al., 2006b) ou infusão contínua de AGV não marcado em rúmen não evacuado (PETER et al., 1990).

Outra técnica para mensurar o *clearance* ruminal de AGV é baseada no desaparecimento, ao longo do tempo, da concentração de valerato infundida em dose única no rúmen, sem evacuação (ALLEN et al., 2000) ou com evacuação da digesta (RESENDE JÚNIOR et al., 2006b). Em ambas as variações da técnica a solução de marcadores é misturada por meio das mãos ou objetos que promovam a homogeneização física. O princípio da técnica se baseia no fato do valerato ser 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 e que parece não ser significativamente metabolizado pelos microrganismos ruminais (ALLEN et al., 2000; RESENDE JUNIOR et al., 2006b). Na determinação do *clearance* de AGV por essa técnica o Co-EDTA (UDEN; COLUCCI; VAN SOEST, 1980) ou o Cr-EDTA (BINERTS et al., 1968) são utilizados como marcadores de

passagem da fase fluida do ruminorretículo para o omaso. As vantagens da 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, integrados ao sistema produtivo (RESENDE JUNIOR, 2003).

Daniel et al. (2007), propuseram uma adaptação da técnica do valerato-Cr que tem como princípio a homogeneização natural de marcadores de fase fluida pela motilidade ruminal, ocorrida após infusão de solução de marcadores em dose única, sem interferências significativas sobre o ambiente ruminal. No entanto, é necessário comparar essa técnica com outra de eficiência comprovada conhecida na literatura.

Desta forma, objetivou-se com esse trabalho validar a técnica de mistura de marcadores à digesta ruminal intacta, comparando à técnica de mistura de marcadores à digesta ruminal evacuada, que apresenta eficiência comprovada na homogeneização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Morfologia do estômago dos ruminantes

O estômago dos ruminantes é composto por quatro compartimentos morfológicamente distintos. Os três primeiros, rúmen, retículo e omaso, compreendem a parte aglandular, enquanto a parte glandular, onde é produzida a secreção gástrica, é representada pelo abomaso. Os dois primeiros compartimentos, o rúmen e o retículo, frequentemente são considerados uma só câmara, denominada ruminorretículo, devido à ausência de barreira anatômica consistente entre eles. Esse órgão é responsável por cerca de 80 % da capacidade de armazenamento do estômago, além de ocupar a maior parte na cavidade abdominal, especialmente no antímero esquerdo (NICKEL et al., 1979). O rúmen é marcado externamente por sulcos que correspondem internamente aos pilares. Estes dividem o órgão em sacos cranial, dorsal, cego caudo-dorsal, cego caudo-ventral e ventral. Entre o rúmen e o retículo estão a prega ruminoreticular, internamente, e o sulco ruminoreticular, externamente. A extremidade cranial do saco ventral é denominada recesso do rúmen (NICKEL et al., 1981).

A parede da porção aglandular é constituída por quatro túnicas que são denominadas, a partir do lúmen do órgão em direção à cavidade abdominal, mucosa, muscular e serosa (DELLMANN; BROWN, 1982). A mucosa é composta por epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado, que está apoiado na lâmina própria. O epitélio que reveste os compartimentos aglandulares é formado por quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada, sendo a última voltada para o lúmen do órgão. A camada basal ou germinativa do epitélio é onde ocorre a proliferação celular para crescimento e renovação epitelial, expressa por alta atividade mitótica (PEREIRA, 1997). A lâmina própria é de natureza conjuntiva e altamente vascularizada. As papilas ruminais são projeções da túnica mucosa, que aumentam a superfície de contato deste órgão (BANKS, 1992), conferindo maior capacidade de absorção de AGV (DIRKSEN et al., 1985). Os AGV atuam direta (SAKATA; TAMATE, 1978) e indiretamente (SAKATA et al., 1980; SHEN et al., 2004) no tamanho das papilas ruminais. Desta forma, as dimensões das papilas podem sofrer variações com o tipo da dieta em função da maior necessidade de absorção de AGV (SUTTON; MCGILLIARD; JACOBSON, 1963).

2.2 Ácidos graxos voláteis no ruminorretículo e pH ruminal

O pH ruminal é fisiologicamente mantido em torno da neutralidade. A posição anatômica do rúmen propicia que tampões salivares tenham fluxo constante para o órgão. Um ambiente ruminal neutro foi importante evolutivamente para propiciar diversidade microbiana, dando ao ruminante a capacidade de fermentar praticamente todo tipo de substrato ingerido. Um ambiente muito ácido ou muito básico seria mais seletivo, provavelmente resultando em redução microbiana no fluido ruminal (PEREIRA et al., 1999).

A mensuração do pH é um método auxiliar no diagnóstico da acidose ruminal em rebanhos leiteiros (GARRET et al., 1999). A justificativa para essa prática é a sabida correlação negativa entre a concentração de AGV no fluido ruminal e o pH (PEREIRA; ARMENTANO, 2000). Baixo pH, *per se*, é um fator na patogênese da acidose ruminal. O baixo pH provoca distúrbio no transporte de eletrólitos podendo causar degeneração hidrópica da parede ruminal (GAEBEL et al., 1989), além de aumentar estímulos aos receptores vagais subepiteliais, capazes de inibir a motilidade do ruminorretículo (COTTRELL; GREGORY, 1991).

Em ruminantes com alto consumo de dietas de fermentabilidade rápida, o pH ruminal é mais ácido do que o fisiologicamente observado em animais com baixo aporte energético. Reduzir a produção diária de AGV não é um caminho prudente para evitar a queda no pH, pois causaria queda no fluxo de nutrientes para o animal. Em ruminantes com alto desempenho o padrão da fermentação ruminal é diferente daquele observado em ruminantes com baixa ingestão de energia. Dietas de alta fermentabilidade tendem a reduzir tanto o pH ruminal quanto a relação entre ácido acético e propiônico. Em vacas leiteiras de alta produção, a variação normal do pH ruminal ao longo de 24 horas é de 5,5 a 7, enquanto a relação entre moles de acetato e moles de propionato fica em torno de 2,5:1 (PEREIRA; ARMENTANO, 2000).

Os AGV, principalmente o acetato, propionato e butirato, mas também em menor quantidade, valerato, caproato, isobutirato, metilbutirato e traços de outros ácidos de cadeia mais longa, são produzidos no ruminorretículo como produtos resultantes da atividade microbiana sobre a matéria orgânica ingerida (FRANCE; SIDDONS, 1993). Durante o processo de fermentação, a energia é conservada na forma de ATP e utilizada para a manutenção e crescimento da população microbiana do rúmen. Para os microrganismos ruminais, os AGV são substâncias 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 na forma de calor e metano. Além disso, os AGV produzidos no trato gastrointestinal podem representar até 80% da energia metabolizável disponível para o ruminante (BERGMAN, 1990).

A concentração de AGV no fluido ruminal é bastante variável, podendo oscilar circadianamente de 70 a 150 mM em vacas de alta produção leiteira (PEREIRA; ARMENTANO, 2000), dependendo da composição da dieta e do tempo após a alimentação. Em dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis este valor pode atingir 200 mM, porém em dietas à base de forragens fica abaixo de 100 mM (BERGMAN, 1990). O pico de concentração ocorre geralmente entre 10 e 14 horas após a primeira alimentação do dia em vacas leiteiras alimentadas com dieta completa de alto conteúdo energético e fornecidas uma (PEREIRA; ARMENTANO, 2000) ou duas vezes ao dia (SALVADOR et al., 2008). A proporção molar dos ácidos acéticos, propiônicos e butíricos no fluido ruminal varia de 75: 15: 10 a 40: 40: 20, dependendo da dieta (BERGMAN, 1990). Além de afetar o perfil e a concentração de AGV, a composição da dieta também pode afetar o pH ruminal (WEIGAND; YOUNG; MCGILLIARD, 1975).

2.3 Formação de AGV no ruminorretículo

Os carboidratos dietéticos, isto é, celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares solúveis são os principais substratos da fermentação ruminal. Eles são degradados para seus constituintes de hexoses e pentoses antes de serem fermentados para AGV, via piruvato. As pentoses são convertidas a hexoses e trioses, via fosfato, pelas reações de 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 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 o 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 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 a molécula de piruvato reage com quatro H, há

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; SIDDON, 1993).

Além dos carboidratos dietéticos, as proteínas e parcialmente os lipídios podem gerar AGV no rúmen. A contribuição de lipídio é muito pequena, porque somente a porção carboidrato, isto é, glicerol, e galactose gerados a partir da hidrólise dos lipídios, são fermentados, 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 bactérias no rúmen (COTTA; HESPELL, 1986).

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 forragens 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 concentrado, ricas em amido, proporcionam o desenvolvimento de bactérias produtoras de propionato em detrimento do acetato, embora acetato seja sempre o mais abundante dos AGV.

Russel (1998) desenvolveu um trabalho relacionado ao padrão de fermentação determinado pelo substrato e população microbiana no rúmen. Ele 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 forragens em quantidade suficiente para suprir as necessidades recomendadas pela NRC (2001).

Os animais foram alimentados a cada duas horas para permitir a situação de *steady state* e submetidos ao período de adaptação a dieta por 3 semanas antes do período de coleta das amostras. Um litro de conteúdo ruminal foi coletado do saco ventral e cranial do rúmen e teve seu pH determinado imediatamente. As partículas de alimentos e os protozoários foram removidos por centrifugação baixa e as bactérias foram isoladas por centrifugação alta. Aproximadamente 90% do fluido ruminal livre de células foi removido. 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 e milho moído. O meio de

incubação, acondicionado em tubos, recebeu as bactérias, oriundas de vacas submetidas a cada uma das duas dietas, e foi mantido por 48 horas 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 da relação acetato: propionato foi causada por um aumento no propionato e não houve efeito da dieta na concentração ruminal de acetato. O milho moído foi fermentado mais extensivamente do que o feno e a concentração dos AGV totais foram aproximadamente seis a 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 de 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 6,5 (RUSSEL, 1998).

Quando o milho moído foi incubado com bactérias oriundas de vacas alimentadas com forragem, a diminuição da 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 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 o 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 drasticamente 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 que 5,5, mas o efeito do inóculo não foi significativo, sendo esse resultado confirmatório da competitividade entre produção de propionato e metano. Não houve acúmulo de H₂ até o pH baixar de 5,5, e feno como substrato não produziu, em momento algum, aumento maior que 0,02 mmol de H₂/mmol de AGV. Quando o pH do meio de cultura que tinha milho moído como substrato foi menor 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 em pH não muito baixo o H₂ não esteja disponível para a produção de metano, uma vez que em pH não muito baixo, uma vez que H₂ não foi detectado até que o pH baixasse para 5,5. A diminuição na relação acetato: propionato quando o substrato foi feno, a qual foi dependente de pH, causou uma diminuição no acetato. A relação acetato: propionato no 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 e propionato. Em pH menor que 5,3, a taxa de acetato: propionato aumentou de sete para 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 mais alto (RUSSELL, 1998).

2.4 Clearance de AGV no ruminorretículo

A concentração total de AGV no rúmen é relacionada com a taxa de fermentação, mas reflete também outros fatores, como a remoção por absorção pela parede, passagem com a fase fluida ruminal para o omaso e utilização dos AGV pelos microrganismos ruminais (WHEATON et al, 1970). Em bovinos com alta ingestão de matéria seca, cerca de 50% do desaparecimento total de AGV ocorre por passagem com a digesta no óstio retículo-omasal e os outros 50% ocorre por absorção pela parede do rúmen (RESENDE JUNIOR, 2003). A concentração praticamente nula de AGV no conteúdo duodenal (RUPP et al., 1994) indica que o omaso e o abomaso são órgãos importantes na absorção de AGV, o que é coerente com a alta relação entre a superfície de epitélio e o volume de digesta no omaso (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006).

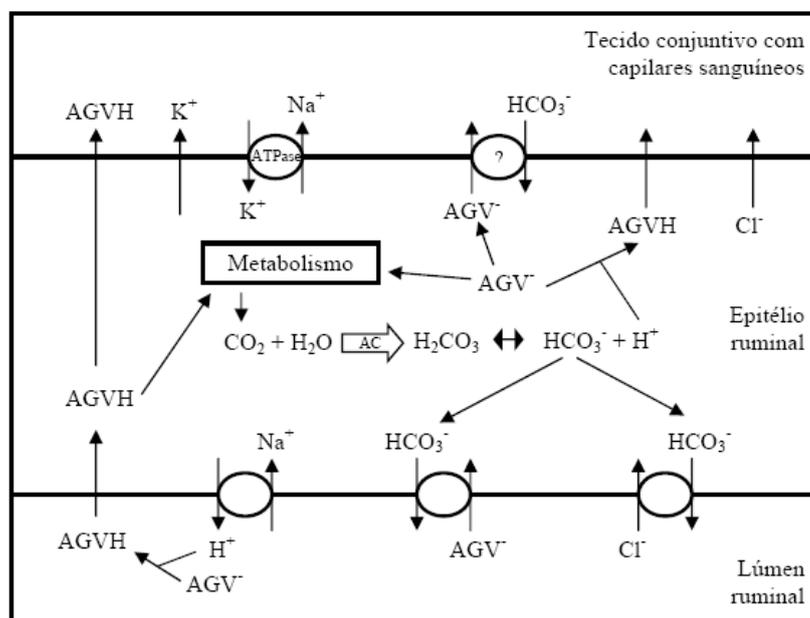
Como citado anteriormente, a superfície interna do rúmen é caracterizada macroscopicamente pela presença de papilas. A manipulação nutricional da morfologia

papilar poderia afetar a capacidade de absorção de AGV por unidade de epitélio ruminal (DIRKSEN et al., 1984). Dietas ricas em energia induzem aumento tanto no tamanho quanto na atividade metabólica do tecido ruminal (GOODLAD, 1981). Maior superfície absorptiva se traduz em maior velocidade de absorção de AGV pela parede ruminal (MELO, 2007) o que pode permitir a ingestão de dietas energeticamente densas sem os problemas decorrentes da concentração excessiva de AGV na digesta.

Os AGV são absorvidos pela parede do rúmen na forma ionizada, ou dissociada, e na forma protonada, ou não dissociada (GÄBEL et al., 2002; KRAMER et al., 1996). Como o pK dos AGV é $\leq 4,8$ (FUKUSHIMA, 1995) e o pH ruminal geralmente está entre 5,5 e 7,0, de 83 a 99% dos AGV estão na forma iônica, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach. Com baixos valores de pH os AGV são rapidamente absorvidos, sendo a diferença na velocidade de absorção proporcional ao tamanho da cadeia de carbono (DIJKSTRA et al., 1993).

Uma fonte de prótons H^+ para o lúmen ruminal (FIGURA 1) ocorre pelo mecanismo de troca iônica envolvendo sódio (Na^+). O Na^+ da digesta ruminal é absorvido pela célula epitelial e o H^+ é liberado para o rúmen (GÄBEL et al., 2002). Através da bomba $Na^+ - potássio (K^+)$, com gasto energético proporcionado pela ATPase, ocorre saída de Na^+ para o conjuntivo e entrada de K^+ para dentro da célula epitelial. O K^+ que entrou volta passivamente da célula para o conjuntivo (SHEHESTED et al., 1999b). Os H^+ liberados para o rúmen através da troca iônica com o Na^+ vão protonar os AGV ionizados (GÄBEL et al., 2002; SEHESTED et al., 1999). Estes H^+ são oriundos da dissociação do ácido carbônico (HCO). A produção de H_2CO_3 é catalisada pela anidrase carbônica intracelular, a partir do gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) (GÄBEL et al., 2002). O CO_2 da célula epitelial vem do sangue, do conteúdo ruminal (CARTER; GROVUM, 1990) e do metabolismo de AGV intracelular (GÄBEL et al., 2002).

Figura 1 - Esquema da absorção ruminal de AGV na forma protonada (AGVH) por difusão e na forma dissociada (AGV⁻) através de troca iônica (O) com bicarbonato (HCO₃⁻), AC= anidrase carbônica.



Fonte: Melo (2007).

Os AGV do lúmen ruminal atravessam a membrana da célula epitelial na forma protonada por difusão e na forma ionizada por um mecanismo de troca iônica envolvendo bicarbonato (HCO₃⁻) (GÄBEL et al., 2002; KRAMER et al., 1996; SHEHESTED et al., 1999b). O HCO₃⁻ é derivado a partir da dissociação do H₂CO₃. O HCO₃⁻ é liberado para o lúmen ruminal e o AGV na forma ionizada é absorvido (GÄBEL et al., 2002; KRAMER et al., 1996). Essa troca de AGV iônico por HCO₃⁻ explica o desaparecimento de AGV e o aparecimento de HCO₃⁻ no lúmen ruminal. Outro mecanismo para liberação de HCO₃⁻ para o lúmen ruminal é por meio da troca iônica com o cloro (Cl⁻) (FIGURA 1). O Cl⁻ é absorvido pela célula epitelial e passa passivamente para o conjuntivo (SEHESTED et al., 1999).

Na célula epitelial os AGV são metabolizados, formando β-hidroxibutirato, acetoacetato, lactato e CO₂ ou atravessam-na em direção ao tecido conjuntivo vascularizado. A passagem de AGV ionizados da célula epitelial para o conjuntivo é pouco conhecida (GÄBEL et al., 2002; SHEHESTED et al., 1999b). Parece que ela ocorre através da troca iônica envolvendo o HCO₃⁻ oriundo do sangue (SEHESTED et al., 1999).

A transferência trans-epitelial de AGV na forma protonada, do fluido para o sangue, contribui diretamente para manter mais elevado o pH intra-ruminal, já que prótons são absorvidos junto com aos AGV. Distintamente, a absorção de AGV na forma iônica poderia

induzir uma queda no pH do fluido ruminal, pois prótons ficam no rúmen e os AGV não protonados, que são bases fracas são absorvidos. No entanto, juntamente com a absorção de AGV na forma iônica ocorre liberação de bicarbonato para o lúmen ruminal, evitando uma possível queda no pH (GÄBEL et al., 2002; KRAMER et al., 1996).

Normalmente o acúmulo de AGV no rúmen não é suficiente para induzir queda drástica de pH no fluido (OWENS et al., 1998). Entretanto, quando a taxa de produção de AGV excede a taxa de remoção, devido à rápida produção, absorção ineficiente, redução na diluição ou queda na taxa de passagem de fluidos do rúmen, pode ocorrer acúmulo de todos os AGV e, conseqüentemente, queda no pH a valores abaixo de cinco, caracterizando um quadro de acidose ruminal. Alta acidez ruminal e hipertonicidade do conteúdo ruminal ocorrem na acidose, e podem promover alterações ultra-estruturais no epitélio ruminal e descamação epitelial associada a ruminite (COSTA, 2003; GÁLFI et al., 1986).

A infusão de AGV em rúmen evacuado e lavado de ovinos induziu aumento na concentração de acetato, propionato e butirato no sangue, mostrando que ocorre absorção de AGV pelo ruminotético (BRACFORT et al., 1944). Destes que são absorvidos no ruminotético, grande parte é metabolizada pelo epitélio ruminal durante a absorção e o transporte até o sangue. A ordem decrescente de metabolização de AGV é acetato, propionato e butirato (BRACFORT et al., 1944; SUTTON; MCGILLIARD; JACOBSON, 1963). Cerca de 90% do butirato é metabolizado pelo epitélio ruminal (BERGMAN, 1990). O epitélio ruminal é considerado um órgão metabólico entre a digesta ruminal e a circulação sanguínea (DIRKSEN et al., 1985).

Objetivando verificar o transporte e metabolismo ruminal de AGV pelo epitélio ruminal de bovinos, Sehested et al. (1999) 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, dieta, os quais foram abatidos em matadouros. Aproximadamente 15 minutos após o abate, uma peça uniforme de tecido foi coletada do saco ventral a cerca de 10 cm do pilar longitudinal esquerdo em direção ventral.

No laboratório, após lavagem prévia, a mucosa foi separada das outras camadas da parede e lâminas do tecido epitelial foram montadas em câmara de *Ussing* com abertura de 2 cm² e submetidas a corrente elétrica. AGV marcados com ¹⁴C 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 pequena secreção líquida, mas significativa de acetato e

propionato. A absorção líquida de butirato foi alta e significativa nas condições de misturas 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-metilbutirato) o fluxo líquido de butirato. O fluxo mucosa-serosa de AGV aumentou, em geral, embora não proporcionalmente com o aumento da cadeia de carbono e da solubilidade lipídica do AGV. A redução do pH aumentou, significativamente, tanto o fluxo mucosa-serosa quanto o mucosa-serosa 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 6,0 do que em pH 7,3, mas o aumento na taxa de fluxo ficou ainda mais longe de ser proporcional ao aumento da solubilidade lipídica.

Para estudar o metabolismo, uma solução contendo AGV marcados com ^{14}C foi infundida de um lado da câmara de *Ussing*, e outra solução sem AGV foi infundida do outro lado. As soluções foram tamponadas a pH 7,3. As taxas de fluxo baseadas em mensurações 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. O metabolismo de acetato não pode ser estimado devido a grande produção endógena desse AGV.

Os dados desse experimento demonstraram que a rota mucosa-serosa é diferente da rota seromucosal e que butirato é tratado diferentemente pelo epitélio do que o acetato e propionato. 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 intensivo de AGV, há indicação de que a principal rota para os AGV é transcelular, fato já confirmado por outros pesquisadores Stevens e Hume, 1998, citado por Sehested, 1999. Estes pesquisadores

constatarem 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 lâminas de epitélio, *in vitro*, não influenciou o transporte transepitelial de AGV.

2.5 Mensuração das taxas fracionais de *clearance* de AGV do ruminorretículo

Diversas pesquisas têm sido feitas visando 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 de AGV ocorria antes do abomaso, uma vez que Phillipson e Mcanally (1942) mostraram que a concentração de AGV na digesta ruminal era alta, mas na digesta abomasal, era muito baixa. Várias técnicas já foram utilizadas para mensurar as taxas fracionais de *clearance* de AGV e, todas elas, possuem vantagens e desvantagens.

Para o estudo e controle da acidose ruminal e também para estimativa da absorção de energia metabolizável oriunda dos AGV ruminais, 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 da veia porta e ou suas tributárias visando mensurar o aparecimento sanguíneo de AGV (HUNTINGTON; REYNOLDS; TYRRELL, 1983), a infusão intrarruminal 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), a infusão contínua de AGV não marcado em rúmen não evacuado (PETERS et al., 1990) ou a infusão ruminal, em *pulse-dose*, de ácido valérico associado a um marcador de fase fluida (ALLEN et al., 2000) misturados à digesta *in loco* (VOELKER; ALLEN, 2003) ou à digesta evacuada (RESENDE JÚNIOR et al., 2006).

Marcadores de fluidos eficientes como Cr-EDTA (BINNERTS et al., 1968) e Co-EDTA (UDÉ et al., 1980) são os mais utilizados atualmente, bem como sua determinação por espectrofotometria de absorção atômica, já que é um procedimento rápido, confiável, e de elevada sensibilidade (BINNERTS et al., 1968). Há alta correlação (0,93) entre taxas de passagem de fluidos determinadas por Cr e Co complexados com EDTA (MAJAK et al., 1986).

O valerato é um AGV natural do rúmen (GRAY et al., 1952), que está presente em baixas concentrações na digesta e que parece não ser significativamente metabolizado pelos microrganismos ruminais (ALLEN et al., 2000; RESENDE JÚNIOR et al., 2006b). O princípio da técnica desenvolvida por Allen et al. (2000) é que o ácido valérico infundido no conteúdo ruminal em dose única, desaparece do rúmen por absorção pela parede do órgão e por passagem com a fase fluida para o omaso. Então a queda na concentração ruminal de valerato, ao longo do tempo representa o desaparecimento do valerato por absorção e passagem. Ao ácido valérico é associado o Co-EDTA ou o Cr-EDTA que são compostos que se dispersam facilmente no líquido ruminal, mas tem absorção desprezível, desaparecendo do rúmen unicamente por passagem com a fase fluida para o omaso.

A queda na concentração ruminal de Co-EDTA ou de Cr-EDTA, ao longo do tempo, representa a taxa de passagem do fluido ruminal para o omaso, conseqüentemente é assumida como representativa da taxa de passagem dos AGV, por estarem estes dispersos na fase fluida. Então se quantifica, por cromatografia gás-líquida, a concentração de valerato em amostras de fluido ruminal, coletadas ao longo do tempo, e plota-se numa regressão exponencial cuja inclinação representa a taxa fracional de *clearance* total de valerato. Da mesma forma, quantifica-se a concentração de Co ou Cr nas amostras de fluido e a taxa fracional de passagem é deduzida da taxa fracional de *clearance*, obtendo-se assim a taxa fracional de absorção (ALLEN et al., 2000). As vantagens desta 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, integrados ao sistema produtivo (RESENDE JUNIOR, 2003).

A técnica do valerato cobalto foi empregada por Volker e Allen (2003) os quais avaliaram os efeitos da substituição de grão de milho por polpa de beterraba peletizada sobre parâmetros da fermentação ruminal, usando oito vacas holandesas multíparas com cânulas no rúmen e no duodeno. As dietas experimentais com 40% de forragem (silagem de milho e silagem de alfafa) e 60% de concentrado continham 0%; 6,1%; 12,1% ou 24,3% de polpa de beterraba substituindo milho de alta umidade com base na matéria seca. A concentração de AGV foi similar entre as dietas, mas o tamanho do *pool* ruminal de AGV aumentou quadraticamente com aumento no teor de polpa de beterraba na dieta, com valor para 12% de polpa. A taxa fracional de absorção de valerato foi similar para todos os tratamentos (\approx 40%/h). A taxa fracional de passagem de fluido reduziu pela substituição de milho por polpa, provavelmente por aumento na consistência de fluido ruminal. Com isso, a contribuição no

clearance de AGV por passagem, que variou de 29 a 31% do *clearance* total, reduziu com os maiores níveis de polpa de beterraba na dieta.

A correlação entre a taxa de absorção de ácido valérico e a concentração ruminal de AGV foi negativa (-0,69, $P < 0,05$), mostrando que as vacas com maior capacidade absorptiva conseguiram manter um ambiente ruminal menos ácido. Quanto maiores foram as taxas de absorção e passagem de valerato, mais alto foi o pH ruminal, o que confirma a hipótese anterior. Além disso, a maior utilização de combustíveis metabólicos para produção de leite pode ter criado um maior gradiente de concentração de AGV entre fluido ruminal e sangue, demonstrado por um aumento na taxa de absorção de valerato com maior produção de leite ($r = 0,49$; $P < 0,01$).

Outro estudo desenvolvido utilizando-se a técnica valerato cobalto foi o de Resende Júnior et al. (2006) onde foram utilizadas seis vacas Holandesas fistuladas no rúmen recebendo azevém fresco e suplementadas com 2,8 Kg diários de concentrado comercial peletizado. Trinta gramas de Co-EDTA e trezentos gramas de valerato diluídos em dois litros e meio de solução foram introduzidos no rúmen simultaneamente com AGV marcados com ^{13}C . A taxa fracional de desaparecimento de Co foi assumida como sendo representativa do *clearance* ruminal de AGV por passagem por fase fluida. Acetato, butirato e propionato previamente marcados com ^{13}C , juntamente com a solução de valerato cobalto, foram misturados ao conteúdo ruminal evacuado das seis vacas Holandesas. 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 R^2 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 $30\% \text{ h}^{-1}$ e a de absorção variou de 14 a $19\% \text{ h}^{-1}$ conforme o tipo de AGV.

Os efeitos do volume e do pH da digesta ruminal sobre a absorção de ácido valérico em vacas leiteiras foram avaliados por Melo (2007), a qual também utilizou a técnica de valerato cromo. Nove vacas canuladas, submetidas a três planos alimentares (vacas produzindo em média 25,9 Kg/d de leite alimentadas com dieta completa rica em

concentrado; vacas produzindo 12,3 Kg/d de leite alimentadas com silagem de milho, pasto e concentrado; e vacas alimentadas com pasto) foram utilizadas. Biopsias da mucosa ruminal foram realizadas uma semana antes do início do experimento. Em cada ensaio a digesta era evacuada e os marcadores homogeneizados (ácido valérico + Cr-EDTA). No tratamento pH baixo, a digesta foi acidificada com ácido sulfúrico, e no tratamento volume baixo, apenas parte da digesta foi retornada ao ruminorretículo. Antes do retorno da digesta ao órgão, o óstio retículo-omasal foi obstruído com uma esponja. Não foi possível detectar diferenças significativas para o efeito do volume de digesta. A taxa fracional de absorção de valerato foi mais alta em pH baixo (35,0%/h) do que em pH alto (23,9%/h). A correlação entre a superfície absorptiva e a absorção média de valerato foi positiva e alta ($r = 0,90$). Apesar desta alta correlação, os animais usados neste trabalho apresentaram uma grande disparidade de morfologia da mucosa ruminal. Em experimentos com animais sob condições fisiológicas semelhantes esta correlação pode ser menor.

Como citado anteriormente, existem várias maneiras de infundir marcadores da dinâmica ruminal, porém, o método de infusão pode interferir significativamente nos resultados. Quando se utiliza um volume grande de solução de marcadores (ALLEN et al., 2000), para facilitar a homogeneização, aumenta-se o volume de fluido ruminal, o que pode influenciar a taxa de *clearance* dos AGV (DIJKSTRA et al., 1993; RESENDE JUNIOR et al., 2006).

Uma outra questão seria a baixa precisão das regressões que descrevem a queda na concentração dos marcadores ao longo do tempo, refletindo a homogeneização deficiente quando marcadores são adicionados sem evacuação da digesta (SUTTON et al., 2003). Por outro lado, a evacuação da digesta, apesar de permitir boa homogeneização (RESENDE JÚNIOR et al., 2006) pode desestabilizar o ambiente ruminal, através da desestruturação do *mat*, perda da estratificação, aumento na tensão de oxigênio e redução da temperatura da digesta, bem como da alteração da motilidade e fluxo sanguíneo do órgão.

Diante disso, Daniel et al. (2007) propuseram uma forma alternativa para infusão e coleta dos marcadores. Cinco vacas não lactantes, não gestantes, adaptadas cirurgicamente com cânulas no saco dorsal do rúmen, alimentadas com concentrado e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) fresco picado ou apenas pasto de *Brachiaria decumbens*, receberam três litros e meio de uma solução marcadora contendo 790 mg.L^{-1} de Cr, na forma de Cr-EDTA. A solução supracitada, foi infundida no ruminorretículo utilizando-se um funil acoplado a um tubo de PVC rígido de $\frac{3}{4}$ " com múltiplos orifícios no terço distal. Antes da

infusão, a solução foi aquecida a 37°C, o pH ajustado para o pH ruminal inicial com a solução de NaOH a 50% e o volume dividido em quatro partes iguais (875 mL). Uma dessas partes foi infundida no saco cranial e as outras infundidas em três pontos do saco ventral do rúmen. Esse escalonamento foi obtido pela estimativa do volume do saco cranial e ventral, a partir da área superficial de epitélio contínuo (área epitelial menos área de papilas) determinada por Daniel, Resende Júnior e Cruz (2006). Pelos cálculos matemáticos estimou-se que o volume do saco ventral é três vezes maior que o volume do saco cranial, por isso, foram infundidos um quarto da solução (875 mL) no saco cranial e os outros três quartos (2625 mL) no saco ventral.

No tempo zero (imediatamente após infusão do marcador) e a cada 20 minutos até o tempo de 320 minutos, amostras de fluido ruminal foram coletadas do saco ventral, para a determinação da concentração de cromo, objetivando estimar a taxa fracional de passagem e o volume de fluido ruminal. A concentração de Cr foi determinada no sobrenadante das amostras de fluido ruminal após centrifugação a 3000 g por 15 minutos. O princípio da técnica de Daniel et al. (2007) é que a solução marcadora se homogeniza à fase fluida devido a motilidade ruminal e a partir de algum tempo os resultados podem ser utilizados para plotagem de uma regressão não linear descrevendo a queda na concentração do marcador ao longo do tempo. O momento pós-infusão ideal para iniciar a coleta de amostras foi determinado pela adequação da curva exponencial descrevendo a queda na concentração de Cr, retirando-se gradativamente os pontos iniciais e observando-se o coeficiente de determinação (r^2).

O melhor ajuste ($r^2= 0,88$; $P<0,001$) foi obtida excluindo-se os cinco primeiros tempos de coleta (1,67 h após a infusão) e dobrando-se os intervalos até as 5,33 h após a infusão. Os coeficientes de determinação das regressões não lineares que representaram a queda da concentração dos marcadores ao longo do tempo, não diferiram ($P= 0,17$) de curvas padrões ($r^2= 1$), quando comparado hipoteticamente. Uma melhor adequação das regressões pode ser obtida utilizando-se a primeira coleta 1,5 h após a infusão do marcador, a segunda coleta 15 minutos após a primeira e a terceira 30 minutos após a segunda e assim sucessivamente dobrando os intervalos de coleta. Os autores então propuseram os seguintes tempos de coleta de amostras: 90, 105, 120, 150, 210 e 330 minutos após a infusão. Entretanto, é necessário validar essa técnica comparando-a com outra de eficiência comprovada, publicada na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de bovinocultura de leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram dois períodos experimentais ocorridos de julho a setembro de 2007.

3.1 Delineamento e unidades experimentais

Foram utilizadas três vacas da raça Jersey e uma da raça Nelore, não lactantes, não gestantes e adaptadas cirurgicamente com cânulas no saco dorsal do rúmen. Os animais permaneceram alojados em um *Tie Stall* com cama de areia e receberam, individualmente, água e alimentos frescos *ad libitum*.

As unidades experimentais foram alocadas em uma sequência de quatro tratamentos, em um delineamento em blocos casualizados, onde cada animal constituiu um bloco. Os tratamentos foram dispostos em parcelas subdivididas (*split plot*), alinhados em um arranjo fatorial 2x2: método de infusão de marcadores e dieta, com dois períodos simultâneos de 18 dias. As quatro combinações dos dois fatores foram: dieta de forragem e infusão de marcadores à digesta intacta (DFII); dieta de forragem e infusão de marcadores à digesta evacuada (DFIE); dieta de forragem e concentrado e infusão de marcadores à digesta intacta (DCII); e dieta de forragem e concentrado e infusão de marcadores à digesta evacuada (DCIE).

3.2 Dietas

As dietas foram constituídas de silagem de milho ou silagem de milho e concentrado comercial farelado, este último na proporção de 50% da matéria seca da dieta. Diariamente, a silagem de milho era ensacada e pesada e a quantidade colocada era ajustada para propiciar cerca de 10% de sobras no dia posterior. Após a pesagem e limpeza das instalações, as vacas eram alimentadas por volta das 8 horas com as rações inerentes a cada tratamento. Antes do fornecimento, as sobras do dia anterior eram removidas e pesadas individualmente, visando à estimativa de consumo diário. Durante o período de infusão e coleta de amostras de fluido ruminal, a dieta disponível era retirada e ao término deste período, retornada ao cocho.

3.3 Solução marcadora, métodos de infusão e coleta de amostras de fluido ruminal

A solução de Cr-EDTA foi preparada conforme metodologia proposta por Binnerts et al. (1968). Diluiu-se 56,8 gramas de tricloreto de cromo hexahidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 800

mililitros (mL) de água destilada utilizando-se um béquer. Em outro béquer de cinco litros, 80 gramas de ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTANa₂) foram diluídos em 1,2 litros de água destilada, com auxílio de um misturador até obtenção de uma mistura completamente transparente. As soluções foram misturadas e aquecidas até atingir a fervura, ebulindo por uma hora em fogo brando. Após atingir a temperatura ambiente, o excesso de EDTA da solução púrpura foi complexado com 16 mL de uma solução de cloreto de cálcio a 10%. Obteve-se uma solução marcadora “stock” de um litro para cada vaca. À solução marcadora foi adicionado 85 g.L⁻¹ de ácido valérico em um volume de 300 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,5 (pHmetro Digimed DM20, Datamed Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Belo Horizonte) por meio de uma solução de NaOH a 50% e seu volume total completado com água destilada até quatro litros de solução. Cada litro da solução marcadora foi envasado em garrafas plásticas e conservado sob refrigeração.

As comparações entre os métodos de infusão foram feitas no 16° e 18° dias de cada período. No 16° dia, foi realizada a infusão dos marcadores à digesta intacta e, no 18° dia, os marcadores foram infundidos à digesta evacuada. As infusões se iniciaram às 14 horas, seis horas após o arraçoamento dos animais. A oferta de água e alimentos foi interrompida durante a coleta de dados.

3.3.1 Infusão dos marcadores à digesta intacta

Antes da infusão dos marcadores, uma amostra de fluido ruminal, de cada vaca, foi coletada, para a determinação do pH. Quatro litros da solução marcadora, foram infundidos no ruminorretículo como auxílio de um funil acoplado a um tubo de PVC rígido de ¾ de polegada, com múltiplos orifícios no terço distal. Antes da infusão a solução foi aquecida até atingir a temperatura de 37°C. O volume foi dividido em quatro partes iguais (um litro/parte), para que uma das partes fosse infundida no saco cranial e as outras três partes fossem infundidas em diferentes pontos do saco ventral do rúmen (DANIEL et al., 2007).

3.3.2 Infusão dos marcadores à digesta evacuada

No 18° dia de cada período foi efetuada a infusão de marcadores à digesta evacuada. Às 14 horas a alimentação e água das vacas foram suspensas. Antes das evacuações, amostras de fluido ruminal foram coletadas para determinação do pH.

Após a abertura da cânula, a digesta foi evacuada manualmente e transferida para baldes de 50 litros para adição e homogeneização dos marcadores, como proposto por

Resende Júnior et al. (2006). A cada dez porções de conteúdo ruminal evacuado, uma era separada para determinação do teor de matéria seca em uma amostra composta por vaca e por período. Durante a evacuação, os marcadores foram adicionados intermitentemente à digesta para facilitar e garantir uma boa homogeneização. Terminada a adição dos marcadores, a digesta foi pesada e seu peso registrado. O peso foi corrigido descontando-se o peso dos baldes e das soluções marcadoras adicionadas. Após a pesagem, o conteúdo ruminal evacuado foi intensamente misturado manualmente e retornado ao ruminorretículo.

3.3.3 Coleta de amostras de fluido ruminal

Amostras seriadas, de cerca de 100 mL de fluido ruminal, foram coletadas do saco ventral, para a determinação do pH e das concentrações de AGV e Cr. Para as coletas foi utilizado um tubo de PVC rígido de $\frac{3}{4}$ de polegada, com múltiplos orifícios no terço distal, acoplado a um dispositivo de sucção. Nos tratamentos onde a infusão foi feita à digesta intacta, as amostras foram coletadas nos tempos 90, 105, 120, 150, 210 e 330 minutos após a infusão (DANIEL et al., 2007). Nos tratamentos onde a digesta foi evacuada, as amostras foram coletadas nos seguintes tempos: antes da infusão, zero (imediatamente após o retorno da digesta ao rúmen), 15, 30, 60, 120 e 240 minutos (RESENDE JÚNIOR et al., 2006b). A partir das amostras, duas alíquotas de 10 mL de fluido foram separadas e acondicionadas em frascos plásticos. Uma alíquota para análise de Cr, por meio de espectrofotometria de absorção atômica e a outra para análise de AGV, por meio de cromatografia gás-líquida. As alíquotas destinadas à análise de AGV foram preservadas em 200 μ L de ácido sulfúrico a 50%. Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas a -20°C .

3.4 Determinação do consumo de matéria seca

A partir do 8° dia de cada período, o consumo diário de alimento por vaca, foi mensurado através da pesagem do oferecido e da sobra. A alimentação era oferecida às 8 horas e nessa ocasião eram coletadas amostras das sobras e do alimento oferecido, as quais eram congeladas a -20°C para posterior determinação da matéria seca. Ao final do período de coleta de dados, as amostras foram descongeladas, agrupadas por semana, pré-secas a 58°C , moídas e secas em estufa ventilada a 105°C .

3.5 Determinação do volume da digesta

Nos tratamentos onde os marcadores foram infundidos na digesta evacuada o volume de fluido ruminal foi estimado multiplicando-se o peso da digesta evacuada pelo teor de umidade da mesma (1 - teor de matéria seca).

De outro modo, o volume de fluido ruminal foi estimado pela diluição do Cr no tempo zero da coleta, estimado pelo intercepto da curva que descreve a queda na concentração de Cr ao longo do tempo. O volume foi calculado por regra de três simples. Em quatro litros de solução marcadora havia 692,65 ppm de Cr e pelo intercepto obteve-se a quantidade de cromo (ppm) no tempo zero. Pôde-se então, calcular quantos litros de fluido estavam presentes no rúmen naquele momento.

Nos tratamentos onde os marcadores foram infundidos na digesta intacta o volume de fluido ruminal foi estimado apenas pela diluição do Cr no tempo zero.

3.6 Mensuração das taxas fracionais de *clearance* de AGV

As concentrações de valerato das amostras, previamente congeladas e preservadas em ácido sulfúrico a 50%, foram determinadas por cromatografia gás-líquida. Após serem descongeladas, as amostras de fluido ruminal coletadas foram centrifugadas (Centrifuga Refrigerada Modelo 3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Alemanha) a 8855 g por 15 minutos. Em 250 μ L do sobrenadante foram adicionados 150 μ L de padrão interno, ácido capróico (3000 ppm) (N Caproic Acid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) e 100 μ L de água destilada. Os padrões nas concentrações de 100, 75, 50, 33, 20, 10, 5 e 3,3 ppm foram preparados para a calibragem do aparelho a partir de uma “amostra A”, constituída de 150 μ L de padrão interno, 250 μ L de padrão composto (ácidos acético, propiônico, butírico e valérico e 100 μ L de água destilada.

As amostras foram analisadas por cromatografia gás-líquida (CP-3800 Gas Chromatograph Varian, Varian Chromatography Systems, Califórnia, EUA), com coluna capilar de fase composta por polietilenoglicol modificado com ácido nitroterefitático, com 0,25 mm de diâmetro interno, 02 μ m de espessura de filme e 25 m de comprimento (CP-Wax 58 (FFAP) CB, Varian Analytical Instruments, Califórnia EUA). Após a centrifugação o fluido ruminal ainda apresentava resíduos suspensos capazes de obstruir a coluna cromatográfica. Para minimizar este problema, foi colocada lã de vidro silanizado no interior do liner tipo split/splitless com adelgaçamento único e 3,4 mm de diâmetro (GC Inlet Liner Varian, Varian Analytical Instruments, Califórnia, EUA). A lã foi inserida entre a ponta da

agulha para injeção da amostra e entrada da coluna, num espaço de ± 1 cm, funcionando como um filtro.

O forno foi aquecido a 65°C nos primeiros 30 segundos, nos próximos 3 minutos aumentou-se a temperatura para 20°C por minuto chegando a 125°C , e em seguida a temperatura foi elevada a 170°C , subindo 50°C por minuto. O tempo total da análise foi de 4,9 minutos.

Assim, foi determinada a concentração de cada AGV em cada tempo de coleta e a taxa fracional de desaparecimento do valerato, assumida como representativa do *clearance* total de AGV (RESENDE JUNIOR et al., 2006), foi calculada pela regressão exponencial que descreveu a queda da concentração ruminal de valerato ao longo do tempo.

As concentrações de cromo das amostras, previamente congeladas, foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (Spectr AA-100 Varian, Varian Austrália PTy LTD, Vitória, Austrália). As amostras foram descongeladas e centrifugadas conforme descrito anteriormente, para determinação de AGV. O sobrenadante foi transferido para um frasco plástico de 10 mL e diluído na proporção de uma parte de amostra para vinte e uma de água destilada. Essa diluição objetivou a obtenção de uma solução de concentração aproximada de 2,5 ppm (faixa mediana entre as soluções padrões). Esse cálculo foi feito conforme descrito a seguir.

Cada solução marcadora era composta por 14,2 gramas de tricloreto de cromo tetra hidratado ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Determinando o peso molecular, obtém-se:

$$\begin{array}{l}
 12 \text{ H} = 12 \\
 6 \text{ O} = 96 \\
 3 \text{ Cl} = 106,5 \\
 \text{Cr} = 51,9961
 \end{array}
 \quad \Rightarrow \quad
 266,49 \text{ Massa molar total}$$

O percentual de cromo na molécula foi obtido por regra de três simples:

$$\begin{array}{l}
 100\% \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 266,49 \\
 \text{X} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 51,9961 \\
 \text{X} = 19\%
 \end{array}$$

Aplicando-se o percentual de cromo no peso do produto utilizado na solução marcadora chegou-se ao resultado de que a solução continha 2,77 gramas de cromo puro. Calculou-se então a concentração (ppm) aproximada de cromo caso o conteúdo de fluido fosse aproximadamente 50 litros:

$$501 \frac{2,7706 * 10^{-3}}{1.000.000} X$$

$$X = 55,412 \text{ ppm}$$

Dividindo-se então esse valor para 2,5 ppm que é a faixa média entre 1 e 4 ppm chega-se à conclusão de que a diluição necessária é de 22:1.

Para o preparo das soluções padrões foi feita uma solução “*stock*” dissolvendo 1000 mg de tricloreto de cromo hexahidratado extra puro (1000 ppm do sal) em um balão volumétrico de 1000 mL (195,1 ppm Cr). Em seguida diluiu-se 10,25 mL da solução “*stock*” em água destilada usando um balão volumétrico de 200 mL (10 ppm Cr). As soluções padrões foram preparadas então com um, dois, três e quatro ppm de Cr diluindo-se 10, 20, 30 e 40 mL da solução de Cr 10 ppm, usando água destilada em balões de 100 mL. Um frasco contendo somente água destilada foi preparado para servir de solução branca. Os padrões foram utilizados para obtenção da curva de calibração no espectrofotômetro.

A taxa fracional de passagem da fase fluida, assumida como idêntica ao *clearance* ruminal de AGV por passagem para o omaso foi calculada pela regressão exponencial que descreveu a queda da concentração ruminal de cromo ao longo do tempo.

A taxa fracional de absorção de AGV pela parede do rúmen foi calculada pela diferença entre a taxa fracional de *clearance* total e a taxa fracional de passagem de fluido, conforme descrito por Resende Junior et al. (2006).

3.7 Mensurações morfológicas

No 18º dia de cada período, após as séries de coleta de fluido, o conteúdo ruminal foi evacuado completamente e acondicionado em baldes de 50 litros, para retornar posteriormente ao rúmen. Introduzindo-se a mão direita através da cânula, tracionou-se o pilar cranial do rúmen até sua exteriorização e uma biopsia da mucosa do recesso do rúmen, localizado no saco ventral do rúmen, foi realizada utilizando-se uma tesoura cirúrgica. Um fragmento de aproximadamente 3cm² foi coletado e subdividido em duas alíquotas. Uma das alíquotas foi imediatamente acondicionada em frascos contendo solução de tampão fosfato ajustada para pH de 7,4 (PBS = 0,79 g de NaCl; 0,223 de Na₂HPO₄; 0,0524 g de NaH₂PO₄; H₂O qsq 100 mL) e foi resfriada para posterior análise macroscópica. A outra alíquota foi fixada, por 24 horas, em líquido de Bouin (LILLIE; FULLMER, 1968) com a seguinte composição: 75 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico (6,5 g de ácido pícrico diluído em 500 mL de água destilada, 25 mL de formaldeído a 40% e 5 mL de ácido acético

glacial). Após o período de fixação, as amostras foram mantidas em álcool a 70°GL, sendo o mesmo trocado periodicamente para a retirada do excesso dos fixados, evitando com esse procedimento o endurecimento dos fragmentos. As amostras fixadas permaneceram na solução alcoólica até o processamento histológico.

3.7.1 Macroscopia

As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas foram o número de papilas por cm² de parede, área das papilas e área da superfície total de absorção da parede. O número de papilas em todo o fragmento foi mensurado por quatro avaliadores e o valor médio foi determinado para cada animal. A área da superfície absorptiva foi mensurada em imagens digitalizadas das papilas e da superfície parietal dos fragmentos de biopsia (Programa de análise de imagens UTHSCSA *Image Tool*, software livre) conforme descrito por Resende Junior et al. (2006a). Em cada fragmento de biopsia foi mensurada a área da face parietal e a área de doze papilas seccionadas aleatoriamente na base. As doze papilas foram transferidas para uma placa de petri (70 mm de diâmetro por 13 mm de altura), contendo dois mililitros de PBS, tomando-se o cuidado de enfileirá-las, nivelando-as pelo ápice. A placa foi colocada em um *Scanner* (Hewlett Packard – Scanjet 4 C). Foi assumido que a área média da superfície parietal correspondente à base da papila foi 0,002 cm² (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ 2006). A superfície total de absorção foi calculada pela soma da área de epitélio papilar e área de superfície parietal subtraída da área de base papilar.

3.7.2 Microscopia

Os blocos de parafina foram cortados, com um micrótomo manual rotativo. (Olympus CUT 4055 Rotary Microtome, Microtec Laborgeräte GmbH, Alemanha), em secções de 5 µm de espessura. Dois cortes de cada bloco por lâmina histológica foram fixados para análise microscópica.

Para a determinação do IM foi utilizada a coloração de Shorr. As lâminas foram imersas em xilol por 30 minutos para serem desparafinadas. Em seguida foram imersas em uma série decrescente de etanol (duas imersões no absoluto, 90°, 80° e 70° GL), para rehidratação, deixando-se dois minutos em cada solução. Foram então imersas em frascos contendo Hematoxilina de Harris, por 3 minutos e, em seguida, diferenciadas, em ácido clorídrico a 1% para remoção do excesso de corante. Esse monitoramento foi realizado com o

auxílio de um microscópio óptico (Jenamed-Carl Zeiss Jena, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP).

Após a diferenciação, as lâminas foram colocadas em cuba com água corrente por 20 minutos, e imersas em frasco contendo corante de Shorr, por um minuto. Em seguida, as mesmas foram colocadas em cuba contendo água corrente e lavadas rapidamente. Outra série de etanol com concentrações crescentes (70°, 80°, 90°, e dois banhos com absoluto) foi utilizada para desidratar novamente o material, deixando-se as lâminas por dois minutos em cada álcool. As lâminas foram então banhadas duas vezes em xilol, por dois minutos, e montadas utilizando uma camada de bálsamo do Canadá e superpondo-se uma lamínula de vidro em cada lâmina.

Com o auxílio do microscópio óptico, em aumento de 400 vezes, foram contados os núcleos de todas as células da camada basal do epitélio de revestimento, em todas as regiões em que estava bem delimitada, e todas as células com núcleo apresentando figuras mitóticas. Esse procedimento foi executado por três avaliadores nos dois cortes de cada vaca e respectivo período, e o valor médio entre os avaliadores e entre cortes foi calculado. O IM foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados.

3.8 Análise estatística

As variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância, com comparação das médias pelo teste F, adotando-se o nível 5% de probabilidade (Statistical Analyses System Institute - SAS, 1999), utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS, recomendado em experimentos com parcelas subdivididas (OTSUK et al., 2004), conforme o detalhamento a seguir.

O número de papilas por cm², a área média das papilas, a superfície absorptiva, a área por cm² do fragmento, o índice mitótico, variáveis da morfologia, a ingestão de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, FDN, CNF, e as variáveis do consumo, foram analisadas de acordo com o seguinte modelo (Equação 1):

$$Y_{ij} = \mu + V_i + D_j + e_{ij} \quad (1)$$

Em que:

μ : média geral;

V_i : efeito aleatório de vaca ($i = 1$ a 4);

D_j : efeito fixo de dieta ($j = 1$ a 2);

e_{ij} : resíduo.

As variáveis, matéria seca da digesta, massa da digesta, quilogramas da matéria seca da digesta e quilogramas de fluido ruminal, do fator digesta evacuada foram analisadas de acordo com o seguinte modelo (Equação 2):

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + D_j + VD_{ij} + C_k + DC_{jk} + e_{ijk} \quad (2)$$

Em que:

μ : média geral;

V_i : efeito de vaca ($i = 1$ a 4);

D_j : efeito de dieta ($j = 1$ a 2);

VD_{ij} : efeito da interação entre vaca e dieta (termo de erro usado para testar o efeito de dieta);

C_k : efeito de coleta ($k = 1$ a 2);

DC_{jk} : efeito da interação entre dieta e coleta;

e_{ijk} : erro residual.

O quadrado médio para interação entre vaca e dieta foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de dieta no modelo supracitado.

Os dados de pH ao longo do período de quatro horas de infusão e as taxas facionais, de *clearance* total, por absorção pela parede do rúmen e por passagem pelo óstio reticulo-omasal e também o volume de fluido ruminal, estimado através da curva de regressão exponencial do cromo ao longo do tempo, foram analisados de acordo com o modelo abaixo (Equação 3):

$$Y_{ijkl} = \mu + V_i + D_j + VD_{ij} + I_k + DI_{jk} + VT(I)_{il(k)} + T_l + DT_{jl} + IT_{kl} + DIT_{jkl} + e_{ijkl} \quad (3)$$

Em que:

μ : média geral;

V_i : efeito de vaca ($i = 1$ a 4);

D_j : efeito de dieta ($j = 1$ a 2);

VD_{ij} : efeito da interação entre vaca e dieta;

I_k : efeito de infusão ($k = 1$ a 2);

DI_{jk} : efeito da interação entre dieta e infusão;

$VT(I)_{il(k)}$: efeito da interação entre vaca e tempo dentro de infusão;

T_l : efeito de tempo ($l = 1$ a 6);

DTjl: efeito da interação entre dieta e tempo;

ITkl: efeito da interação entre infusão e tempo;

DITjkl: efeito da interação entre dieta, infusão e tempo;

eijkl: erro residual.

Para esta análise, foram acrescentados ao modelo os efeitos de tempo de amostragem (0 a 4 horas, totalizando seis tempos por método de infusão, por vaca) e a interação entre o tempo e o tratamento. O quadrado médio para interação entre vaca e dieta foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de dieta, enquanto o quadrado médio para interação entre vaca e tempo dentro de infusão foi utilizado como medida de erro para testar os efeitos de infusão e a interação entre dieta e infusão.

O volume de fluido ruminal estimado a partir dos dados de matéria seca da digesta obtidos na infusão à digesta evacuada contra o volume de fluido ruminal obtido através do intercepto da regressão exponencial do cromo ao longo do tempo foi analisado de acordo com o seguinte modelo (Equação 4):

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + D_j + VD_{ij} + M_k + DM_{jk} + e_{ijk} \quad (4)$$

Em que:

μ : média geral;

V_i : efeito de vaca ($i = 1$ a 4);

D_j : efeito de dieta ($j = 1$ a 2);

VD_{ij} : efeito da interação entre vaca e dieta;

M_k : efeito de método ($k = 1$ a 2);

DM_{jk} : efeito da interação entre dieta e método;

e_{ijk} : erro residual.

O quadrado médio para a interação entre vaca e dieta, foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de dieta.

O volume de fluido ruminal estimado através do intercepto da curva de regressão exponencial, que descreveu a queda na concentração do Cr ao longo do tempo, foi confrontado no tempo zero e no tempo 90 minutos, após homogeneização natural através das contrações ruminais, na infusão à digesta intacta de acordo com o modelo abaixo (Equação 5):

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + D_j + VD_{ij} + I_k + DI_{jk} + e_{ijk} \quad (5)$$

Em que:

μ : média geral;

V_i : efeito de vaca ($i = 1$ a 4);

D_j : efeito de dieta ($j = 1$ a 2);

VD_{ij} : efeito da interação entre vaca e dieta (termo de erro usado para testar o efeito de dieta);

I_k : efeito de intercepto ($k = 1$ a 2);

DI_{jk} : efeito da interação entre dieta e intercepto;

e_{ijk} : erro residual.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A técnica de infusão de marcadores à digesta intacta mostrou-se eficaz para a determinação do *clearance* ruminal de AGV. A homogeneização da solução marcadora à digesta intacta promovida pela motilidade natural do rúmen foi mais eficiente do que a aquela feita manualmente na digesta evacuada.

A adição de solução marcadora em baixo volume e sem evacuação ruminal tem interferência mínima nas condições fisiológicas do rúmen, preservando especialmente a motilidade, indicando que essa técnica é superior às demais para se trabalhar com a determinação de *clearance* de AGV em animais integrados aos sistemas produtivos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S.; ARMENTANO, L. E.; PEREIRA, M. N.; YING, Y.; XU, J. Method to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 25., 2000, Chicago. **Anais eletrônicos...** Chicago, 2000. p. 26.
Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/292419870_Method_to_measure_fractional_rate_of_volatile_fatty_acid_absorption_from_the_rumen>. Acesso em: 25 dez. 2008.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, Apr. 1990.
- BINNERTS, W. T.; VAN T KLOOSTER, A. T.; FRENS, A. M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **The Veterinary Record**, v. 82, p. 470, 1968.
- CARTER, R. R.; GROVUN, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2811-2832, Sept. 1990.
- CRICHLLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminal lact acidosis: Relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 9, p. 1908-1911, Sept. 1985.
- DANIEL, J. L. P. **Avaliação morfológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos**. 2007. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Participação do ruminoretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 688-694, dez. 2006.
- DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; MELO, L. Q.; SOUZA, R. L. M.; GUERREIRO, M. C. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores da fase fluida ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1850-1856, nov./dez. 2007.
- DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.
- 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.; HAGEMEISTER, H.; MAYER, E. Morphologie der pansenschleimhaut und fettsäureresorption beim rind - bedeutende faktoren für gesundheit und leistung. **Zentralblatt für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 31, n. 1-10, p. 414-430, July 1984.
- GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R.; MULLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 15-30, June 2002.
- GOODLAD, R. A. Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, New York, v. 66, n. 4, p. 487-499, Oct. 1981.
- GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F.; RODDA, H. J.; WELLER, R. A. The nature and origin of the volatile fatty acids in the rumen of the sheep. **Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 1, p. 57-68, May 1952.
- HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 2755-2766, Oct. 1986.
- 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.
- 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.
- MELO, L. Q. **Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- 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.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington: National Academy, 2001. 381 p.
- 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.
- 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, Oct. 1990.

- RESENDE JÚNIOR, J. C.; PEREIRA, M. N.; BÔER, H.; TAMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 3096-3106, Aug. 2006.
- RESENDE JÚNIOR, J. C.; ALONSO, L. S.; PEREIRA, M. N.; ROCA, M. G. M.; DUBOC, M. V.; OLIVEIRA, E. C.; MELO, L. Q. Effect of feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheeps. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 526-536, Aug. 2006a.
- RESENDE JÚNIOR, J. C.; PEREIRA, M. N.; BOHER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 3096-3106, Aug. 2006b.
- SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerate by propionate and acetate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 1, p. 49-52, Jan. 1979.
- SAS. **SAS Institute/STAT users guide**. v. 6.12. New York: Cary, 1999.
- STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production consevation of nutrients. **Physiology Reviews**, Washington, v. 78, n. 2, p. 393-427, Apr. 1998.
- SUTTON, J. D.; DAHANOA, S. V.; MORANT, J.; FRANCE, D. J.; NAPPER, D. J.; SCHULLER, E. Rates of production of acetate, propionate and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3620-3633, Nov. 2003.
- SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa I. Absorptive Ability. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 426-436, May 1963.
- VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Pelleted beet pulp Substituted for high-moisture corn: 3. Effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3562-3570, Nov. 2003.
- WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, A. D. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 9, p. 1294-1300, Sept. 1975.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 - Determination of volatile fatty acids clearance in intact ruminal digesta

Determinação do clearance de ácidos graxos voláteis na digesta ruminal intacta

Determinación del aclaramiento de ácidos grasos volátiles en digesta ruminal intacta

Artigo publicado na Revista CES de Medicina Veterinaria y Zootecnia, v. 14, n. 1, p. 8-17, 2019.

João Chrysostomo de Resende Júnior ^{1*}, MV, PhD; João Luiz Pratti Daniel ², MV, PhD; André Rodrigues da Cunha Barreto-Vianna ¹, MV, PhD; Juliano Vogas Peixoto ¹, MV, PhD; Gregório Correia Guimarães ¹, MV, PhD; Suely de Fátima Costa ¹, MV, PhD; Ronaldo Francisco de Lima ³, MV, PhD; Fabiola da Cruz Meirelles ¹, MV, PhDs

Abstract

Cannulated cows were allocated to a cross-over design to evaluate the technique for determination of volatile fatty acid (VFA) clearance by infusion of marker solution into intact ruminal digesta, and verify the technique sensibility to the variation in the diet. Animals received diet of forage or forage plus concentrate and infusion of valeric acid and Cr-EDTA solution into intact or evacuated ruminal digesta. The total fractional rate of VFA clearance (FRVFAC) was estimated by the exponential decay of valerate over time. The passage FRVFAC to the omasum was assumed as the decay in ruminal Cr concentration and the absorption FRVFAC was estimated by the difference. The total FRVFAC and absorption did not differ between techniques. The passage FRVFAC, however, was lower when the marker solution was added into the evacuated digesta, probably reflecting the destabilization of the rumen environment during the evacuation and the largest volume of fluid observed in animals with evacuated digesta. In conclusion, the infusion of marker solution into intact digesta with homogenization performed by ruminal motility could be usable for the VFA ruminal clearance determination since it seems to cause lesser disturbance in the ruminal environment.

Keywords: *acidosis, Cr-EDTA, rumen physiology, stomach.*

Resumo

Bovinos canulados foram alocados em um delineamento cruzado para avaliar a técnica de determinação do clearance de ácidos graxos voláteis (VFA) por infusão de solução marcadora na digesta ruminal intacta, e verificado a sensibilidade da técnica à variação na dieta. Os

animais receberam dieta de forragem ou forragem juntamente com concentrado e infusão de ácido valérico e solução de Cr-EDTA na digesta ruminal intacta ou evacuada. A taxa fraccional total de depuração de AGV (FRVFAC) foi estimada pelo decaimento exponencial do valerato ao longo do tempo. A passagem FRVFAC para o omaso foi assumida como o decaimento na concentração ruminal de Cr e a absorção FRVFAC foi estimada pela diferença. A FRVFAC total e a absorção não diferiram entre as técnicas. A passagem FRVFAC, entretanto, foi menor quando a solução marcadora foi adicionada na digesta evacuada, provavelmente refletindo a desestabilização do ambiente ruminal durante a evacuação e o maior volume de líquido observado em animais com digesta evacuada. Em conclusão, a infusão da solução marcadora na digesta intacta com homogeneização realizada pela motilidade ruminal poderia ser utilizada para a determinação da depuração ruminal de VFA, uma vez que parece causar menor distúrbio no ambiente ruminal.

Palavras-chave: *acidose, Cr-EDTA, fisiologia ruminal, estômago.*

Resumen

Los bovinos canulados fueron asignados en un delineamiento cruzado para evaluar la técnica de determinación del clearance de ácidos grasos volátiles (VFA) por infusión de solución marcadora en la digesta ruminal intacta, y verificado la sensibilidad de la técnica a la variación en la dieta. Los animales recibieron dieta de forraje o forraje junto con concentrado e infusión de ácido valérico y solución de Cr-EDTA en la digesta ruminal intacta o evacuada. La tasa fraccional total de depuración de AGV (FRVFAC) fue estimada por el decaimiento exponencial del valerato a lo largo del tiempo. El pasaje FRVFAC para el omaso fue asumido como el decaimiento en la concentración ruminal de Cr y la absorción FRVFAC fue estimada por la diferencia. La FRVFAC total y la absorción no difirieron entre las técnicas. El paso FRVFAC, sin embargo, fue menor cuando la solución marcadora fue agregada en la digestión evacuada, probablemente reflejando la desestabilización del ambiente ruminal durante la evacuación y el mayor volumen de líquido observado en animales con digestión evacuada. En conclusión, la infusión de la solución marcadora en la digesta intacta con homogeneización realizada por la motilidade ruminal podría ser utilizada para la determinación de la depuración ruminal de la VFA, ya que parece causar menor disturbio en el ambiente ruminal.

Palabras clave: *acidosis, Cr-EDTA, fisiología ruminal, estómago.*

Introduction

Several techniques have been used to determine volatile fatty acids (VFA) absorption *in vivo*, such as the collection of portal blood (1); intraruminal infusion of radioactive (2) or stable VFA isotopes (3, 4); rumen evacuation and infusion of VFA into the washed ventral sac (5); continuous infusion of nonlabeled VFA into the intact ruminal digesta (6); and pulse-dose of valeric acid plus a marker of fluid passage (7) which may be mixed with the evacuated digesta (8) or mixed *in locus* (9). Although the last method has become common (infusion of markers in pulse-dose), there is a claim that this technique could alter the measurement of VFA clearance. If a large volume of marker solution is used to make homogenization easier (7), the higher volume of rumen fluid may decrease the clearance rate of VFA (5, 8). Another problem is the poor fitness of regressions describing the decay of markers concentrations over time, which ultimately reflect an incomplete homogenization *in locus* (2). On the other hand, if the ruminal digesta is evacuated, the markers can be satisfactorily mixed with the rumen content (8), but it is supposed to destabilize the ruminal environment, throughout disruption of the mat and loss of digesta stratification, increase of oxygen concentration, decrease of temperature, and decrease of blood flow and rumen motility. Due to these concerns Daniel, de Resende Júnior (10) have proposed an alternative approach for infusion and collection of markers. The new technique is based on the natural mixing of markers with ruminal digesta because of rumen motility. A complete homogenization may be reached sometime after the pulse-dosing. At this time ruminal fluid sampling series can be started. Nonetheless, it is necessary to validate this technique. Thus, the objective of this study was to compare the approach proposed by Daniel, de Resende Júnior (10) with a technique which infusing markers into the evacuated digesta for measurements of ruminal clearance of VFA (8). Another aim was to verify the sensibility of the techniques to the variation of VFA absorption and passage rates induced by nutritional plans.

Material and methods

Experimental design

This study was approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Lavras under protocol no. 001/2008. Three Jersey and one Nellore nonlactating and nonpregnant cows were surgically adapted with rumen cannula (10.2 cm diameter) and randomly allocated in a cross-over design, with 18-d periods. Animals were

housed in a tie-stall barn with sand beds. Feeds, mineral-vitamin mix, and fresh water were available ad libitum. The four treatments comprised a combination of two factors arranged in split-plot:

- a. 100% forage diet (maize silage) and marker infusion to intact digesta.
- b. 100% forage diet and marker infusion to evacuated digesta.
- c. 50% forage plus 50% concentrate diet and marker infusion to intact digesta.
- d. 50% forage plus 50% concentrate diet and marker infusion to evacuated digesta.

Diets were whole-plots whereas techniques to measure VFA clearance were subplots. Diets were composed of maize silage and a commercial concentrate based on ground corn and soybean meal. Cows were fed once daily at 8:00 h and feed intake was determined by the difference between the amounts of feed offered and refused.

Measurements of VFA absorption

Measurements of VFA absorption were performed on days 16 and 18 of each period, 6 h after feeding (14:00 h). During the collection, water and feed were suspended to avoid interfering with rumen volume.

Marker solutions contained 340 g of valeric acid (8) and Cr-EDTA (14.2 g of Cr) (11), with pH adjusted to 6.5 in a total volume of 4 L. Solutions were stored in plastic bottles and kept refrigerated until usage. For measuring VFA clearance with intact digesta, marker solution was infused into the reticulorumen using a funnel attached to a rigid PVC tube (3/4 inch), with several holes in the distal third. Immediately before infusion, the solution was heated to 37 °C and the total volume was divided into four equal parts. One liter was infused into the cranial sac and other three liters were infused in different places of the rumen ventral sac (10).

For the standard technique, the ruminal digesta was manually evacuated and transferred to buckets (capacity of 50 L) for the addition and mixing of the marker solution, as proposed by (8). A representative sample of rumen content was collected for dry matter (DM) determination. During the evacuation, the solution of markers was intermittently added into the digesta to facilitate and ensure good homogenization. The digesta was weighted, intensely homogenized, and returned to the reticulorumen. Samples of approximately 100 mL of rumen fluid were collected from the ventral sac using the rigid PVC tube (7.2 cm in diameter) with several holes in the distal third coupled to a tube and a plastic bottle for suction. Immediately

after collection, pH was determined and aliquots were frozen at -20 °C for determination of VFA and Cr concentrations.

For the intact digesta, samples of rumen fluid were collected at 90, 105, 120, 150, 210, and 330 min after infusion. Sampling sequence started 90 minutes after infusion in order to wait the ruminal motility to perform the homogenization of the markers with the digesta, as proposed by Daniel, de Resende Júnior (10). For the evacuated digesta, the samples were collected at the following times: zero (immediately after the return of digesta to the rumen), 15, 30, 60, 120 and 240 min (8).

After thawing, rumen fluid was centrifuged (8.855 g for 15 min) to obtain the supernatant, which was analyzed for chromium by atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectr AA-100, Varian Australia Pty Ltd, Victoria, Australia) and VFA by gas-liquid chromatography (CP-3800 Gas Chromatograph Varian, Varian Chromatography Systems, California, USA). For VFA analysis, 250 µL of the supernatant were added with 150 µL of caproic acid as an internal standard (N Caproic Acid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and 100 µL of distilled water. As external standard, a composed solution of acetic, propionic, butyric and valeric acid was used. The capillary column of composite phase had 25 m of length, 0.25 mm internal diameter and 2 mm thick film (CP-Wax 58 - FFAP- CB, Varian Analytical Instruments, California, USA). A temperature cycle was used in the column oven. It was 65 °C in the first 30 seconds; in the next three minutes it was increasing at 20 °C per minute up to 125 °C, and then the temperature was rising 50 °C per minute to reach 170 °C. The total time of analysis was 4.9 minutes.

Feed samples were also collected during sampling periods and oven-dried at 60°C for 72 h. Dried samples were ground through a 1-mm screen (Wiley mill) and sub-samples were analyzed for the following: DM in an air-forced oven at 105 °C for 24 h; crude protein (CP), ether extract (EE) and ash, and neutral detergent fiber (NDF). The nonfiber carbohydrates fraction was computed as: $NFC = 100 - CP - NDF - EE - ash$.

For the measurements with the evacuated digesta, the rumen fluid volume was estimated by multiplying the weight of evacuated digesta by moisture content. Another estimation of the rumen fluid volume was done by the dilution of Cr at time zero of collection, computed as the intercept of the curve describing the decay of Cr concentration over time. For the infusions with intact digesta, the rumen fluid volume was estimated only by the dilution of Cr 90 min after pulse-dosing which was considered as time zero.

A simple exponential equation describing the change in the valerate concentration over time was used to calculate the fractional clearance rate: $R_t = R_0 \times e^{-k \times t}$ (8). The disappearance of valerate by passage with the rumen fluid was assumed equivalent to the ruminal fluid passage rate, determined by the exponential decay of Cr concentration over time. The fractional rate of valerate absorption was calculated by difference.

Statistical analysis was performed by the Mixed procedure of SAS (12) using the following model: $Y_{ijkl} = \mu + P_i + C_j + D_k + C(D)_{j(k)} + I_l + DI_{kl} + e_{ijkl}$; where μ : overall mean, P_i : random effect of period ($i = 1$ or 2), C_j : random effect of cow ($i = 1$ to 4), D_k : fixed effect of diet ($k =$ forage or forage plus concentrate), $C(D)_{j(k)}$: error term to test whole-plot effects, I_l : fixed effect of infusion technique ($l =$ intact or evacuated), DI_{kl} : interaction of diet and infusion technique, e_{ijkl} : residual error. Feed intake and digesta weight were analyzed with period, cow, and diet effects in the model.

Results

The concentrate supplementation decreased the content of NDF and increased the content of NFC (Table 1). Due to the lower NDF content (13), the diet comprising forage plus concentrate increased food intake (+43%, $P = 0.02$).

Table 1. Chemical composition of experimental diets.

Nutrient (% dry matter)	100% Maize silage	50% Maize silage + 50% concentrate†
Dry matter, % as fed	39.3	47.1
Crude protein	9.2	11.1
Ether extract	3.9	2.7
Ash	3.8	4.0
Neutral detergent fiber	47.0	36.8
Nonfiber carbohydrates	36.1	45.4

† Commercial concentrate based on ground corn and soybean meal.

The volume of rumen fluid was greater when cows fed only forage than for those fed forage plus concentrate when the calculation was based on the moisture content of rumen digesta (Figure 1). However, there was interaction between diet and calculation method, so when the calculation was done by the exponential curve of chrome dispersion in the rumen fluid the amount of rumen liquid was greater in the concentrate containing diet than in the forage diet.

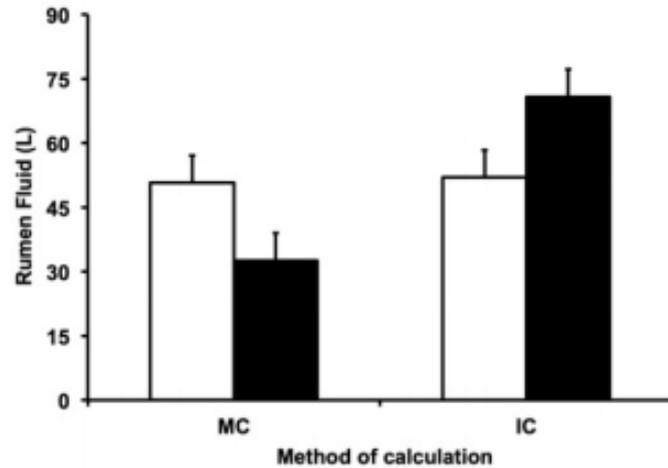


Figure 1. Volume of rumen fluid. Volume of rumen fluid estimated from the moisture content (MC) of the ruminal digesta or calculated from the exponential curve of chrome dispersion in ruminal fluid (IC) when the markers were added into evacuated digesta. Diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). $P = 0.02$ for effect of calculation method; $P = 0.96$ for effect of diet; $P = 0.03$ for interaction of diet and calculation method.

When evaluating the ruminal pH, we verified that the pH was higher in forage diet than in the concentrate containing diet (Figure 2). We also found that supplementation with concentrate resulted in higher concentration of total VFA, acetate, propionate and butyrate (Figure 3).

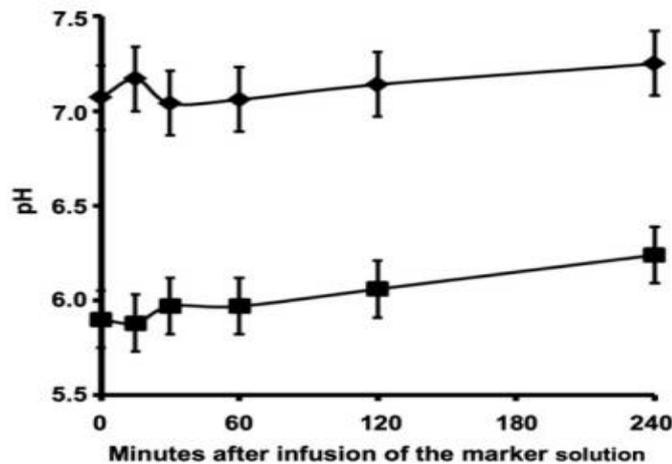


Figure 2. Rumen fluid pH during sampling. Diets contained 100% forage (◆) or 50% forage plus 50% concentrate (■). $P = 0.01$ for diet effect; $P = 0.06$ for collection time effect.

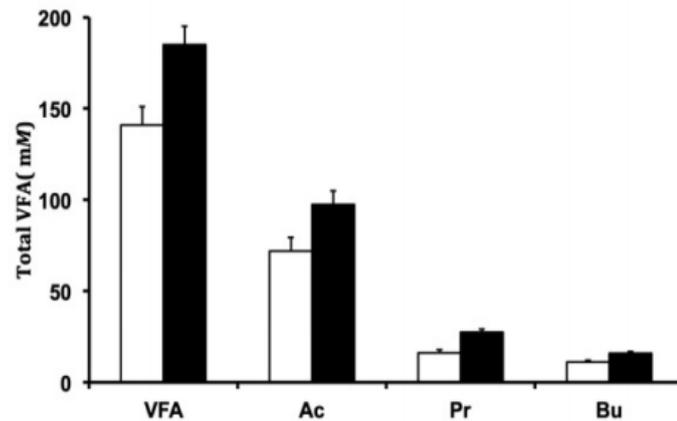


Figure 3. Total VFA. Acetate (Ac), propionate (Pr), and butyrate (Bu) concentrations in the rumen fluid when the marker solution was infused into the intact digesta diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). $P = 0.03$ for the diet effect.

The fractional clearance rate of total rumen VFA (Table 2) was similar between the two methods of markers infusion. In the current study, the R^2 of the regressions which described the decline in valerate and Cr concentration over time did not differ across methods of infusion and were satisfactory high (Table 2). The R^2 of the regressions describing the decline in Cr concentration over time (Table 2) was high for both techniques and numerically ($P = 0.22$) higher in the technique of infusion of markers into intact digesta.

Table 2. Clearance of volatile fatty acids (VFA), volume of rumen fluid, and determination coefficient of the exponential regressions describing the decay of ruminal valerate (R² Val) and chrome (R² Cr) concentrations over time

Item	<i>Infusion method (M)</i>			<i>Diet (D)</i>		<i>Interaction (M × D)</i>					<i>p-value</i>			
	I	E	SEM [†]	F	C	SEM	F×I	F×E	C×I	C×E	SEM	M	D	M×D
Fractional rate of VFA clearance (% h ⁻¹)	37.8	30.5	4.6	28.3	40.0	4.6	29.2	27.4	46.5	33.5	6.4	0.30	0.17	0.41
Fractional rate of VFA passage (% h ⁻¹)	11.8	9.4	1.4	11.4	9.8	1.8	12.5	10.4	11.2	8.4	2.0	0.06	0.58	0.79
Fractional rate of VFA absorption (% h ⁻¹)	26.0	21.1	5.1	16.9	30.2	5.1	16.7	17.1	35.3	25.0	7.2	0.52	0.16	0.48
Volume of rumen fluid ‡ (L)	52	61	6	47	66	7	41	52	62	71	7.3	<0.01	0.08	0.51
R ² Val	0.93	0.93	0.02	0.92	0.94	0.02	0.91	0.93	0.94	0.94	0.03	0.84	0.46	0.65
R ² Cr	0.92	0.89	0.02	0.90	0.91	0.02	0.90	0.89	0.93	0.88	0.02	0.22	0.61	0.44

[†] Standard error of the mean.

[‡] Volume of rumen fluid calculated from the intercept of the exponential regression describing the decay of chrome concentration over time.

The fractional rates of absorption of VFA (Table 2) were similar between the two infusion methods and the fractional rate of total clearance ($P = 0.17$) and of absorption ($P = 0.16$) tended to be higher for the concentrate containing diet (Table 2).

Over the sampling period, there was a pH increase (Figure 2) and VFA concentration decrease (Figure 4) in both diets, but with different magnitudes.

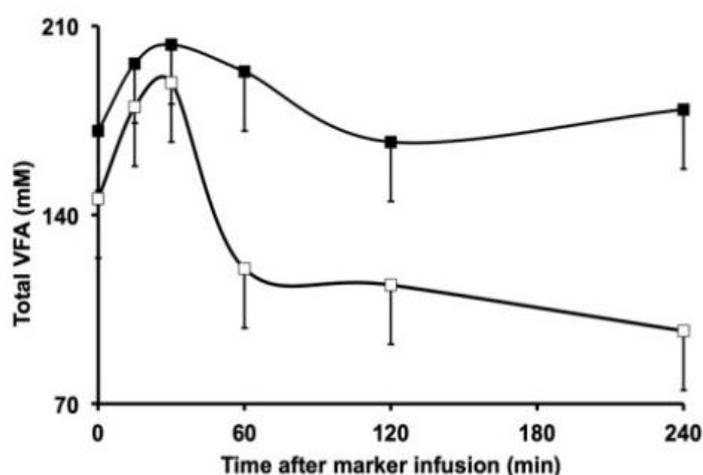


Figure 4. Total VFA concentration in the rumen fluid during sampling when the marker solution was infused into the intact digesta. Diets contained 100% forage (□) or 50% forage plus 50% concentrate (■). $P = 0.03$ for diet effect, $P = 0.12$ for time effect, $P = 0.39$ for interaction of diet and time.

Discussion

As expected, the increased in food intake showed that concentrate supplementation was effective to drive higher energy intake compared with the forage based diet.

The estimation of fluid volume from the moisture of rumen content includes the water contained inside the feed particles, it is expected that this method should provide a higher amount of fluid for the forage than for concentrate based diet, due to the concentrate retains less water inside of its particles. When the calculation was done from the dispersion curve of chromium, the water inside the particles is not considered. Actually, it was expected that the amount of fluid out of the food particles should be greater in the concentrate plus forage than the forage diet, mainly due to the higher production of VFA by rumen microorganisms which could lead to higher osmotic pressure of rumen content. Higher osmotic pressure was associated to increasing in rumen liquid content (14).

The ruminal pH was higher in forage diet than in the concentrate containing diet. This difference in pH was expected since the pH is inversely related to the concentrations of VFA present in the rumen (8).

The peak of VFA production occurs several hours after feed intake (15). The sampling series began 6 and 7.5 h after feeding and this moment was closer to the VFA production peak. Since feed was withdrawn during sampling period, VFA formation was lower than the

clearance, which led to decreased concentrations of VFA across sampling. Thus, the pH was expected to rise during the 240 min of sampling.

The approach developed by Daniel, de Resende Júnior (10) seems to be reliable for estimating the clearance of VFA because its estimates are consistent with those obtained by the technique of adding markers into the evacuated digesta (8).

One of the advantages of the infusing of markers into evacuated digesta is the homogenization, because the rumen content can be easily manipulated out the rumen, allowing an excellent mixture of the markers. This was demonstrated by Júnior, Pereira (8), who achieved high values of R² of the non-linear regressions that described the decay of markers over time. In the current study, the R² of the regressions which described the decline in valerate and Cr concentration over time did not differ across methods of infusion and were satisfactory high. The homogenization of digesta by rumen motility is too efficient as that performed by hand in the evacuated digesta.

The fractional passage rate of ruminal fluid to the omasum tended to be higher when the marker was infused into intact digesta, probably because of the rumen environment was not destabilized, especially by not disrupting the mat, so that the rumen motility may be maintained without interruption. Thus, the infusion of markers into intact digesta seems to be more efficient than infusion into evacuated digesta, because the rumen physiology is better preserved. In this experiment, the lower fractional passage rate when the marker was infused into evacuated digesta was associated with higher rumen fluid volume, confirming what was reported by Júnior, Pereira (8) who found a negative correlation between the volume of rumen fluid and the fractional rate of passage.

The R² of the regressions was high for both techniques and numerically higher in the technique of infusion of markers into intact digesta, providing more evidences that markers can be better homogenized by natural rumen motility than by hand in the evacuated digesta, indicating once again that the method proposed by Daniel, de Resende Júnior (10) seems to be superior to the method of adding markers to the evacuated digesta. Other authors used infusion of markers without rumen evacuation. However, they used larger volume of solution (7), which also interferes with the clearance of VFA, or they reported problems related to the homogenization (2). This demonstrates that the technique proposed by Daniel, de Resende Júnior (10) also appears to be superior to other techniques reported for infusion of tracers in pulse dose, without rumen evacuation.

The fractional rates of absorption of VFA were similar between the two infusion methods, demonstrating again that it is secure estimating fractional rates of clearance using the technique of infusion of markers into intact digesta, as proposed by Daniel, de Resende Júnior (10).

The fractional rate of total clearance and of absorption ($P = 0.16$) tended to be higher for the concentrate containing diet. This phenomenon has biological coherence whereas the areas of the rumen papillae were largest and the epithelium had higher mitotic index in animals fed forage plus concentrate (data not showed).

The presence of a higher amount of rapidly fermentable nutrients and higher VFA concentration stimulated the cell proliferation leading to the rumen adaptation to the larger amount of VFA as evidenced by the clearance and absorption rate when animals were fed the more energetic diet. Melo, Costa (16) found a direct association between ruminal epithelium surface and the fractional rate of VFA clearance and absorption, confirming what was reported by (17).

The infusion of markers into intact digesta proved to be effective for determining the clearance of ruminal VFA. The homogenization of the marker solution into the intact digesta promoted by rumen motility seems to be more efficient than the one done manually into the evacuated digesta. This result has direct applicability in improving the productive efficiency of livestock, since it is fast, low cost and requires no experience beyond that required by the commonly used techniques.

References

1. Huntington G, Reynolds P, Tyrrell H. Net Absorption and Ruminal Concentrations of Metabolites in nonpregnant Dry Holstein Cows before and after Intraruminal Acetic Acid Infusion. *Journal of dairy science*. 1983;66(9):1901-8.
2. Sutton JD, Dhanoa MS, Morant SV, France J, Napper DJ, Schuller E. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J Dairy Sci*. 2003;86(11):3620-33.
3. Noziere P, Martin C, Remond D, Kristensen NB, 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. *Br J Nutr*. 2000;83(5):521-31.
4. Kristensen NB. Rumen microbial sequestration of [2-13C] acetate in cattle. *Journal of animal science*. 2001;79(9):2491-8.

5. Dijkstra J, Boer H, Van Bruchem J, Bruining M, Tamminga S. 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*. 1993;69(2):385-96.
6. Peters JP, Shen RY, Robinson JA, Chester ST. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. *J Anim Sci*. 1990;68(10):3337-49.
7. Allen M, Armentano L, Pereira M, Ying Y, Xu J, editors. Method to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. *Proc 25th Conf Rumen Function*, Chicago, IL; 2000.
8. Júnior JR, Pereira M, Boer H, Tamminga S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. *Journal of dairy science*. 2006;89(8):3096-106.
9. Voelker JA, Allen MS. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. Effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2003;86(11):3562-70.
10. Daniel JLP, de Resende Júnior JC, de Melo LQ, de Souza RLM, Guerrero MC. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores da fase fluida ruminal. *Ciênc Agrotec*. 2007;31:1850-6.
11. Binnerts W, Van't Klooster AT, Frens A. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. *Veterinary Record*. 1968;82.
12. Institute S. SAS/STAT user's guide: version 6: Sas Inst; 1990.
13. Mertens D, FAHEY JR G, Collins M, Mertens D. Forage quality, evaluation and utilization. *Forage quality, evaluation and utilization*. 1994.
14. Lopez S, Hovell FD, MacLeod NA. Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. *Br J Nutr*. 1994;71(2):153-68.
15. Pereira MN, Armentano LE. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. *J Dairy Sci*. 2000;83(12):2876-87.
16. Melo LQ, Costa SF, Lopes F, Guerreiro MC, Armentano LE, Pereira MN. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. *J Anim Sci*. 2013;91(4):1775-83.

17. Dirksen G, Liebich H, Brosi G, Hagemeister H, Mayer E. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureresorption beim Rind—Bedeutende Faktoren für Gesundheit und Leistung. *Transboundary and Emerging Diseases*. 1984;31(1-10):414-30.