INGESTÃO DE FÓSFORO POR CARNEIROS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O TEOR DESSE ELEMENTO NO PLASMA E NO RÚMEN, NO pH DO LÍQUIDO DO RÚMEN E NA INCORPORAÇÃO DE ^{32}P PELOS MICROORGANISMOS.

DORINHA MIRIAM S. S. VITTI MARCONDES

Orientador: DARCY MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro, 1980

. . .

Aos meus pais, irmãos

e ao meu esposo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, e em especial às seguintes pessoas:

Ao *Prof. Dr. Darcy Martins da Silva*, pelo incentivo e orientação na execução do trabalho;

Ao *Dr. Antonio de Oliveira Lobão*, pelo apoio, orientação e colaboração;

Ao *Prof. Dr. Admar Cervellini*, Diretor do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas facilidades para a realização dessa pesquisa e à *Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)*, pelo apoio financeiro;

À *Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA)*, na pessoa do *Dr. Peter Vose*, pelo apoio técnico-científico e financeiro;

Ao *Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, São Paulo*, pela doação dos animais e feno utilizados nesse experimento.

Ao *Dr. Willen T. Binnerts*, pela valiosa colaboração e sugestões, no desenvolvimento das técnicas utilizadas nesse estudo;

Aos *Profs. Drs. Aristeu Mendes Peixoto, Wilson R. Soares de Mattos e Vidal Pedroso de Farias*, pelas sugestões durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas *José Roberto Moro, Antonio Alvaro Duarte de Oliveira e Benedito do E. Santo de Campos* pela orientação nas análises estatísticas;

.iii.

Ao Dr. Virgílio F. do Nascimento Filho e José Osório Bertoli da Seção de Dosimetria e Proteção Radiológica do CENA, pelas facilidades na contagem da radioatividade das amostras;

Aos colegas Srs. Alidor Gonçalves e José Cleto da Silva Filho, da Seção de Nutrição Animal do CENA, pelo valioso auxílio na condução do experimento;

Ao Prof. Dr. Enéas Salati pelo estímulo e amizade;

À Solange Maria Gennari, Maria Inez B. Peixoto Escobedo e Joaquim Westin Lemos, pelo incentivo e amizade durante todos es ses anos.

Aos estagiários e demais funcionários da Divisão de Ciências Animais do CENA, pela ajuda quando foi necessária

I N D I C E

	Página
1. RESUMO.	1
2. INTRODUÇÃO.	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.	3
3.1. Metabolismo do fósforo nos ruminantes.	3
3.1.1. Distribuição e cinética.	3
3.1.2. Necessidade de fósforo para os rumi antes	12
3.1.3. Necessidade de fósforo para os micro organismos do rúmen.	17
3.2. Utilização de radioisótopos no estudo do me tabolismo dos microorganismos.	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.	24
4.1. Local.	24
4.2. Animais.	24
4.3. Dieta experimental	25
4.4. Equipamentos.	27
4.4.1. Gaiola para estudo de metabolismo. . .	27
4.4.2. Coletor de líquido do rúmen.	27
4.5. Delineamento experimental e análises estatís ticas.	28
4.6. Períodos experimentais	30
4.6.1. Período de adaptação.	30
4.6.2. Período pré-experimental.	30
4.6.3. Período experimental.	30
4.7. Solução radioativa.	31
4.8. Incubações.	31
4.9. Análises	33
4.10. Cálculo para a determinação do fósforo incorporado .	34

5. RESULTADOS.	37
5.1. Ingestão de fósforo.	37
5.2. Ingestão de feno.	39
5.3. Teor de fósforo no plasma.	41
5.4. Teor de fósforo no líquido do rúmen.	44
5.5. pH do líquido do rúmen.	47
5.6. Incorporação " <i>in vitro</i> " de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen.	47
5.7. Correlações.	51
6. DISCUSSÃO.	56
6.1. Ingestão de fósforo.	56
6.2. Ingestão de feno.	57
6.3. Teor de fósforo no plasma.	58
6.4. Teor de fósforo no líquido do rúmen.	60
6.5. pH do líquido do rúmen.	61
6.6. Incorporação " <i>in vitro</i> " de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen.	62
7. CONCLUSÕES.	64
8. SUMMARY.	66
9. LITERATURA CONSULTADA.	68

LISTA DAS TABELAS

Página

Tabela 1. Análise da variância da quantidade de feno ingerida (g/dia) pelos animais nos <u>trata</u> mentos A, B e C	40
Tabela 2. Análise da variância do teor de fósforo no plasma (mg/100 ml) dos animais nos <u>trata</u> mentos A, B e C.	43
Tabela 3. Análise da variância do teor de fósforo no líquido do rúmen (mg/100 ml) dos animais nos tratamentos A, B e C.	46
Tabela 4. Análise da variância dos valores de pH do líquido do rúmen dos animais nos <u>tratamen</u> tos A, B e C.	49
Tabela 5. Análise da variância da incorporação " <i>in vitro</i> " de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen dos animais nos tratamentos A, B, e C.	52
Tabela 6. Correlações entre os resultados do fósforo ingerido, pH do líquido do rúmen, teor de fósforo no líquido do rúmen e no plasma, fósforo incorporado pelos microorganismos e feno ingerido.	55

LISTA DAS FIGURAS

Página

Figura 1. Fotografia de gaiola para estudo de <u>meta</u> <u>bolismo</u>	29
Figura 2. Fotografia de coletor de líquido do <u>rú</u> <u>men</u>	29
Figura 3. Fósforo ingerido (g/dia) durante as <u>sema</u> <u>nas</u> experimentais pelos animais nos <u>tra</u> <u>tamentos</u> A, B e C.	38
Figura 4. Feno ingerido (g/dia) durante as semanas experimentais pelos animais nos <u>tratamen</u> <u>tos</u> A, B e C.	42
Figura 5. Teores de fósforo no plasma (mg/100 ml) durante as semanas experimentais dos animais nos tratamentos A, B e C. . . .	45
Figura 6. Teores de fósforo no líquido do <u>rú</u> <u>men</u> (mg/100 ml) durante as semanas <u>experimen</u> <u>tais</u> dos animais nos tratamentos A, B e C.	48
Figura 7. Valores do pH do líquido do <u>rúmen</u> <u>duran</u> <u>te</u> as semanas experimentais dos animais nos tratamentos A, B e C.	50
Figura 8. Incorporação " <i>in vitro</i> " de ^{32}P pelos mi- croorganismos do <u>rúmen</u> dos animais nos tratamentos A, B e C.	53

1. RESUMO

Doze carneiros machos castrados, com peso médio de 24,5 kg e 12 meses de idade, foram utilizados para verificar a influência do nível de ingestão de fósforo sobre o consumo de alimento, teor desse elemento no plasma e no líquido do rúmen, pH do líquido rúmen e incorporação de ^{32}P pelos microorganismos do rúmen.

A dieta básica dos animais constituiu-se de feno com baixo teor de fósforo (0,06%), melaço e caseína. O fósforo foi suplementado como fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em níveis de 2 e 4 g diários, aos animais dos tratamentos B e C. Os animais do tratamento A não receberam a suplementação de fosfato.

O controle da quantidade de feno ingerida foi feito diariamente. Determinou-se semanalmente o teor de fósforo no plasma e no líquido do rúmen, o pH do líquido do rú

.2.

men e, por incubação "*in vitro*" com ^{32}P , a incorporação de fósforo pelos microorganismos.

O nível de ingestão de fósforo teve efeito sobre:

- a) o consumo de alimento, sendo que o nível de 2 g de P/dia resultou em maior ingestão de feno (média diária = 629,77 g);
- b) o teor de fósforo no plasma e no líquido do rúmen, sendo que o nível mais alto da dieta resultou em maior concentração do elemento no plasma (7,34 mg/100 mL) e no rúmen (82,23 mg/100 mL);
- c) a incorporação de ^{32}P pelos microorganismos do rúmen, que foi maior nas amostras coletadas dos animais que ingeriram quantidade mais elevada de fósforo (média = 0,134 mg);

O teor de fósforo na dieta não teve influência sobre o pH do líquido do rúmen, medido 24 horas após o fornecimento da suplementação.

No presente trabalho, o nível de 2 g de P/dia foi o mais adequado, enquanto que 4 g do elemento/dia mostrou ser prejudicial aos animais, causando falta de apetite, diarreia e apatia.

O longo período experimental também prejudicou os animais, devido à fadiga pela permanência nas gaiolas. É re

.3.

comendado portanto que, em experimentos desse tipo, a duração máxima seja de 7 a 8 semanas.

2. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista metabólico, o fósforo é um elemento importante. Além de contribuir na formação dos ossos e dentes, desempenha papel primordial no processo energético, entrando na formação dos carboidratos fosforilados e fazendo parte das ligações fosfatadas ricas em energia, principalmente ATP. Esse mineral entra também na composição dos ácidos nucleicos e fosfolipídios, sendo que estes últimos constituem o principal meio de transporte dos ácidos graxos pelo corpo.

É reconhecida a importância do fósforo na dieta para o crescimento e desenvolvimento dos ruminantes e a necessidade desse elemento para os animais, bem como os fatores a ela relacionados, têm sido determinados por vários autores.

O fósforo faz parte da complexa exigência mineral dos microorganismos do rúmen e além dos numerosos mecanis

mos envolvendo fosforilação, ele fornece um eficiente meio tampão para as grandes quantidades de ácidos graxos formados através do metabolismo microbiano.

A necessidade desse elemento pelos microorganismos não é bem conhecida, mas um aumento de sua população tem sido observado quando fosfato é adicionado a um meio de incubação contendo microorganismos do rúmen ou a rações de animais deficientes em fósforo.

O estudo do metabolismo microbiano, feito através da técnica de rúmen artificial e com o uso de radioisótopos, tem trazido resultados satisfatórios, sendo o fósforo-32 um dos isótopos mais utilizados.

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Verificar o efeito de 3 níveis de fósforo da dieta de carneiros sobre o consumo de alimento, teores de fósforo inorgânico no plasma e no rúmen, pH do líquido do rúmen e incorporação "*in vitro*" de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen.
- 2) Investigar a existência de possíveis relações de dependência entre essas medidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Metabolismo do fósforo nos ruminantes

3.1.1. Distribuição e cinética

Vários estudos relacionados com a variação do teor de fósforo no soro dos animais têm sido feitos.

UNDERWOOD (1969) cita que o nível do fósforo inorgânico no soro sanguíneo dos animais domésticos varia de 4,5 a 6,5 mg/100 mL. De acordo com *MAYNARD e LOOSLI (1969)* o nível do fósforo no plasma está entre 4 e 9 mg/100 mL, dependendo da idade e espécie animal, e *DONALD et alii (1973)* indicam que existe uma variação de 4 a 12 mg/100 mL. Para os ovinos, o valor médio é de 6 mg/100 mL (*Kay in IRVING, 1964*).

Vários são os fatores que influenciam no teor do fósforo inorgânico no plasma, sendo que os principais são: idade e espécie animal, local de amostragem, dieta, meio ambiente e estação do ano.

Alguns trabalhos objetivando o estudo da influência da dieta foram realizados.

PRESTON e PFANDER (1964) observaram que o nível de fósforo no plasma de ovelhas estava diretamente relacionado ao teor desse elemento na dieta. *BENZIE et alii (1959)* e *VIPPERMAN et alii (1969)* mostraram também que existe uma correlação entre o nível de ingestão de fósforo e o nível no plasma.

Entretanto, os resultados das pesquisas de *BE*ESON et alii (1944a) e *White et alii in MOODIE (1975)* revelaram que nem sempre isso ocorre. Em situações de jejum ou quando há ingestão inadequada de proteína, ou de energia, os níveis de fósfono plasma aumentam. Os níveis de fósforo no plasma de bovinos podem também ser significativamente aumentados em estado de excitação (*Gartner in COHEN, 1974*).

Além do nível de ingestão de fósforo, o conteúdo de cálcio na dieta é importante com relação ao teor daquele elemento no plasma.

As proporções indicadas de cálcio e fósforo na dieta estão entre 2:1 e 1:1, embora condições adequadas de nutrição sejam possíveis fora desses limites (*THOMPSON, 1978*).

No plasma, o nível de fósforo está inversamente relacionado ao nível de cálcio.

BUSHMAN et alii (1965) observaram que um aumento no nível de cálcio na dieta de ovelhas resultou em valores mais baixos de fósforo no soro e *VIPPERMAN et alii* (1969), em estudos com ovelhas alimentadas com rações contendo níveis de cálcio de 0,19 a 0,46% e teores de fósforo de 0,21 a 0,44%, observaram que a concentração de fósforo inorgânico no plasma foi mais baixa quando os animais receberam os níveis mais altos de cálcio.

Sabe-se que o cálcio e o fósforo podem ser retirados dos tecidos, principalmente dos ossos, para manter os níveis no plasma durante a deprivação desses elementos na dieta. Isso é feito pela ação do hormônio da paratireóide e tirocalcitonina (*Hays e Swenson in SWENSON, 1970*).

A secreção desses hormônios é primariamente dependente da concentração de íons cálcio no plasma que se difunde na região tiro-paratireóide (*Buckle in MOODIE, 1975*).

O hormônio da paratireóide age diretamente sobre os ossos, mobilizando cálcio para o sangue e o hormônio tirocalcitonina reduz o nível desse elemento no sangue, limitando a absorção ou reduzindo a mobilização de Ca do osso (*CHURCH et alii, 1971*).

Assim, quando há insuficiência de cálcio, ocorre mobilização deste, do osso para o sangue e ao mesmo tempo há também liberação do fósforo. Quando o cálcio está em ex

cesso, não há retirada dos ossos e conseqüentemente menor quantidade de fósforo fica disponível para o sangue.

O teor de fósforo no líquido do rúmen também apresenta variações. Através de análises, *Garton* in *BARNETT e REID (1961)* e *Parthasarathy* in *BARNETT e REID (1961)* mostraram que o conteúdo de fósforo variou de 30 a 90 mg/100 ml.

O nível do fósforo no líquido do rúmen é relacionado ao teor desse elemento na dieta (*EVANS e DAVIS, 1961; PRESTON e PFANDER, 1964*). Uma correlação positiva ($r = 0,77$) entre o teor de fósforo na dieta e no rúmen de bovinos foi obtida (*EVANS e DAVIS, 1968*), e os valores de 0,04; 0,16 e 0,54% de fósforo na dieta resultaram, respectivamente, em 198, 417 e 543 μg de fósforo/ml de líquido do rúmen.

Djordjević et alii in *NIKOLIĆ (1976)* observaram que quando o fósforo da dieta foi aumentado de 0,39 para 0,66%, a concentração do fósforo total do rúmen se elevou de 45 para 62 meq/kg (465 $\mu\text{g/g}$ para 640 $\mu\text{g/g}$) e a concentração do fósforo solúvel mudou de 23 para 32 meq/l (238 $\mu\text{g/ml}$ para 331 $\mu\text{g/ml}$).

Os resultados do trabalho de *CLARK (1953)* não mostraram diferença entre o teor de fósforo no rúmen de carneiro normal e de animal mantido com dieta deficiente nesse elemento.

Grande quantidade do fósforo encontrado no rúmen procede da saliva (*ANNENKOV et alii, 1970*) e existe uma correlação entre o teor nesse líquido e no sangue (*LUEKER e LOFGREEN, 1961; TOMAS et alii, 1967*). Outros autores observaram uma alta correlação ($r = 0,91$) entre a concentração de fósforo inorgânico no líquido do rúmen e na saliva da parótida de carneiro, entre o nível desse elemento no plasma e na saliva ($r = 0,64$) e entre o teor no plasma e no líquido do rúmen ($r = 0,75$) (*TOMAS et alii, 1967*).

A quantidade de fósforo presente na saliva é 4 a 15 vezes maior que aquela encontrada no sangue (*PRESTON e PFANDER, 1964*). Em carneiros mantidos em dietas com diferentes níveis de fósforo (de 0,42 a 4,02 g/dia) e com um fluxo salivar da parótida de 3,2 a 4,2 litros por dia, a secreção de fósforo estimada variou de 3,0 g por dia com o nível mais baixo de ingestão desse elemento, até 5,3 g para o mais elevado (*TOMAS et alii, 1967*). *KAY (1960)* estimou a secreção salivar em carneiro de 6 a 16 litros/dia, o que significaria uma secreção de 3 a 8 gramas de fósforo por dia e *LEIBHOLZ (1974)* obteve um valor de aproximadamente 3 g diárias para animal recebendo uma dieta moída e peletizada.

A secreção salivar de fósforo é o principal fator que influencia a homeostase desse elemento em carneiros (*TOMAS e SOMERS, 1974; TOWNS et alii, 1978*).

Observou-se, em carneiros, que existe passagem de fosfato da luz do trato digestivo para o sangue e vice-versa.

PARTHASARATHY et alii (1952) fizeram estudos "*in vivo*" com esses animais e demonstraram a permeabilidade da parede do rúmen em qualquer direção.

SMITH et alii (1955), em pesquisas com carneiros, observaram que alguma excreção endógena do fósforo ocorreu ao longo do trato digestivo, porém a maior quantidade foi através do rúmen.

O valor do pH do conteúdo do rúmen usualmente está entre 5,0 e 7,0 (*Phillipson in SWENSON, 1970*). As variações que ocorrem dependem da natureza da dieta, do intervalo após a alimentação e do consumo de água (*SWENSON, 1970*) e são relacionadas principalmente com mudança na concentração de ácidos orgânicos, fosfato e bicarbonato no rúmen (*Turner e Hodgetts in CHURCH, 1969; EMMANUEL et alii, 1970; FONNESBECK et alii, 1970*).

A capacidade de tampão do líquido do rúmen é considerável sendo que o fosfato é um dos importantes componentes a ela relacionados (*EMMANUEL et alii, 1970; CHURCH et alii, 1971*). *EMMANUEL et alii (1970)* observaram que o poder tampão do fosfato contribuiu para manter um alto pH no rúmen, especialmente 2 a 3 horas após a alimentação, quando houve tendência de um aumento de ácidos graxos voláteis. *FONNESBECK et*

alii (1970), estudando o efeito de três níveis de fósforo (0,12; 0,23 e 0,34%) sobre o pH do rúmen de carneiros, não verificaram diferenças entre os tratamentos, entretanto, observaram com o mais alto nível do elemento, um decréscimo na concentração de ácidos graxos 3 horas após a alimentação.

3.1.2. Necessidades de fósforo para os ruminantes

Observações feitas por vários pesquisadores indicam que uma dieta deficiente em fósforo pode levar à redução no desempenho reprodutivo dos animais, a um crescimento lento, menor produção de lã nos ovinos e em casos extremos à morte.

THEILER et alii (1928) observaram que, quando bovinos deficientes em fósforo recebiam uma suplementação, havia redução na mortalidade e aumento na fertilidade e os animais tornavam-se mais saudáveis, mostrando assim a importância desse elemento.

CALL et alii (1978), comparando a influência de dois níveis de fósforo (0,14 e 0,36%) na dieta de bovinos, sobre o consumo de alimento, ganho de peso, puberdade e a eficiência reprodutiva, observaram que não houve diferenças significativas no ganho de peso, eficiência na utilização do alimento e na idade da puberdade. Entretanto, o índice de fertilidade e a sobrevivência dos bezerros foi maior nos animais que receberam o nível mais elevado de fósforo.

Alguns trabalhos foram feitos com ovinos, vissando estabelecer os efeitos da suplementação de fósforo.

As pesquisas de *BEESON et alii* (1944) com ovelhas jovens e de *BENZIE et alii* (1959), com carneiros, indicaram que houve um marcado efeito depressivo da deficiência de fósforo sobre o crescimento. *KEITH et alii* (1955) observaram que baixa ingestão desse mineral, por ovelhas em lactação e gestação, provocou perda de peso e alta mortalidade dos borregos nos primeiros dias de vida. Entretanto, não houve influência na porcentagem de nascimentos, peso ao nascer, número de abortos e de natimortos.

Dutoit et alii in *MOODIE* (1975), utilizando carneiros em dietas com ou sem suplementação de fósforo, mostraram que a suplementação não teve efeito no peso vivo de ovelhas adultas não reprodutoras.

Vários estudos foram feitos no sentido de estabelecer as quantidades adequadas de fósforo para os ruminantes.

Jones et alii in *WISE et alii* (1958), trabalhando com novilhos de 8 meses de idade, observaram um desenvolvimento maior após aumento no nível de fósforo da dieta de 0,26 para 0,36%. *HUFFMAN et alii* (1933) estabeleceram que 0,20% de fósforo na alimentação foi insuficiente para o crescimento satisfatório de novilhos de 3 a 18 meses. Em discordância

cia com esses autores, num estudo similar envolvendo dois grupos de bezerros com 6 meses de idade *ARCHIBALD* e *BENNETT (1935)* concluíram que 0,18% de fósforo foi tão efetivo quanto 0,31% em promover o crescimento. *WISE et alii (1958)* recomendam um nível de 0,30% de fósforo na alimentação para o crescimento normal de bezerros com 3-4 meses de idade.

Algumas pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de estabelecer os níveis adequados de fósforo na alimentação dos ovinos.

Em uma série de experimentos, *BEESON et alii (1944)* encontraram que para ovelhas em engorda, os níveis de 0,12, 0,14 e 0,15% de fósforo ou acima desse valor foram, respectivamente, inadequado, marginal e adequado. Nesse estudo, os critérios utilizados para a avaliação dos efeitos dos diferentes níveis de fósforo foram ganho de peso, eficiência alimentar e manutenção de níveis do mineral no sangue.

GALLUP e BRIGGS (1950) fizeram um estudo de balanço de fósforo para determinar as necessidades desse elemento por ovelhas em crescimento. Os níveis testados variaram de 0,13 a 0,30% e todos os animais que receberam rações com 0,25, 0,28 e 0,30% de fósforo apresentaram balanço positivo desse elemento e os que receberam de 0,13 a 0,17%, balanço negativo.

PRESTON e PFANDER (1964), trabalhando com ovelhas que recebiam uma ração balanceada, testaram os efeitos

de três níveis de fósforo (0,12; 0,15 e 0,29%) sobre o crescimento e metabolismo. Os animais que receberam os níveis mais baixos apresentaram ganhos reduzidos, menor consumo de alimento e nível baixo de fósforo no plasma (2,5 a 3 mg de fósforo/100 ml).

BUSHMAN et alii (1965), em experimento com ovelhas, estudaram os efeitos dos níveis de 0,25 e 0,55% de fósforo na dieta em várias combinações com 4 níveis de cálcio (0,37; 0,57; 0,77 e 1,27%) e 2 de magnésio (0,18 e 0,38%). O nível mais alto de fósforo resultou em valores significativamente mais elevados do mineral no soro (8,37 a 12,07 mg de fósforo/100 ml) e na urina. O nível de 0,38% de Mg causou uma elevação do nível de fósforo no soro, porém, o teor desse elemento na urina foi mais baixo. Um aumento do nível de cálcio resultou em redução da quantidade de fósforo no soro e na urina.

Blaxter in HUNGATE (1966) estimou que necessidade de fósforo para carneiro varia de 0,15 a 0,20% com base na ingestão de matéria seca.

Baseando-se nos trabalhos citados acima conclui-se que o nível recomendado de fósforo para os ovinos, em condições adequadas de alimentação, está em torno de 0,20%, com base na matéria seca ingerida.

Muitas vezes, quando se faz suplementação de fósforo a uma ração básica deficiente nesse elemento, mesmo

que o nível esteja na quantidade adequada, a resposta a essa suplementação falha. Isso foi observado em condições de campo (*Winks e Laing in POPPI e TERNOUTH, 1979*) e em experimentos de metabolismo (*FISHWICK et alii, 1974*).

Em alguns casos, a falta de resposta à suplementação pode ser explicada por outras deficiências como a de energia e de proteína, mas, por outro lado, parece que esse fato se deve à forma química do suplemento de fósforo (*POPPI e TERNOUTH, 1979*). Foi observado que o ácido fosfórico, utilizado como suplemento de fósforo para carneiros, causou diminuição no ganho de peso e intoxicação, quando fornecia acima de 1,5 g de P/dia (*McMENIMAN, 1973*). *HOAR et alii (1970)* também observou menor ganho de peso e baixo consumo de alimento em ovelhas que receberam 0,57% de P na forma de fosfato de sódio (Na_2HPO_4).

Também, quando há um excesso de fósforo em relação ao cálcio, podem ocorrer situações adversas para o animal, tais como na febre do leite, na formação de cálculos urinários ou na osteodistrofia (*CHURCH et alii, 1971*).

Quando um experimento é conduzido com o objetivo de se estudar o efeito de níveis de fósforo, adicionando-se um suplemento a uma ração deficiente, deve-se pois, ter em mente essas dificuldades.

3.1.3. Necessidade de fósforo para os microorganismos do rúmen

O fosfato presente no rúmen encontra-se em maior parte na forma inorgânica, mas, pesquisas mostraram que os microorganismos existentes nesse órgão são capazes de utilizar as formas orgânicas presentes na dieta (BARNETT e REID, 1961).

As necessidades de fósforo para o desenvolvimento e manutenção dos microorganismos não são bem conhecidas e vários experimentos "*in vitro*" foram feitos com o objetivo de se estudar a importância desse elemento para tais organismos.

BURROUGHS *et alii* (1951), usando a técnica de rúmen artificial em estudos sobre a influência de minerais na utilização da uréia e digestão da celulose, verificaram que o fósforo estimulou tanto a utilização da uréia como a digestão da celulose.

ANDERSON *et alii* (1956) observaram que a adição de 80 µg de fósforo/ml de meio de incubação contendo microorganismos do rúmen, causou um aumento da digestão da celulose de 34 a 80%.

Em concordância com esses autores HALL *et alii* (1961), testando diferentes fontes de fósforo, mostraram que

houve um aumento acentuado da digestão da celulose, quando os níveis de fósforo variaram de 20 a 100 µg/ml de meio, sendo que com o nível de 60 µg todas as fontes testadas produziram a mesma resposta.

CHICCO et alii (1965), em estudo semelhante, testaram os níveis de 1500, 3000 e 4500 µg de fósforo por frasco de incubação. O máximo da digestão da celulose ocorreu ao nível de 3000 µg, o que correspondia a 60 µg/ml, resultado esse que concorda com aqueles obtidos por *ANDERSON et alii (1956)* e *HALL et alii (1961)*.

EVANS e DAVIS (1966a), utilizando novilhos, estudaram os efeitos de vários elementos minerais sobre a atividade dos microorganismos "*in vivo*" e "*in vitro*". Esses autores observaram que o fósforo estimulou a digestão da celulose, quando foi feito estudo "*in vivo*" e que a adição desse elemento em meio de cultura "*in vitro*" também aumentou a atividade celulolítica dos microorganismos.

Em estudos de suplementação de minerais, *KLICENKO (1969)* observou que o fornecimento de diamônio fosfato para bovinos provocava um aumento da digestão da celulose.

EMMANUEL et alii (1970), em estudo sobre o efeito de suplementos de fosfato e bicarbonato nos sistemas de tamponamento do rúmen de carneiros, observaram que esses tampões aumentaram sig

nificativamente a atividade celulolítica do líquido do rúmen.

3.2. Utilização de radioisótopos no estudo do metabolismo dos microorganismos

Nas pesquisas relacionadas com o metabolismo microbiano, a técnica de rúmen artificial associada com o uso de radioisótopos tem mostrado resultados satisfatórios. Os elementos mais utilizados são o fósforo-32, fósforo-33, enxôfre-35 e carbono-14, e o método baseia-se na incorporação do radioisótopo pelos microorganismos.

Alguns estudos foram feitos com o objetivo de avaliar o crescimento dos microorganismos através de técnica com o uso do fósforo radioativo.

VAN NEVEL e *DEMEYER* (1973) indicaram que o uso de fósforo-32, para o estudo do crescimento microbiano "*in vitro*", trouxe resultados satisfatórios. Nesse trabalho os autores utilizaram 40 ml de líquido de rúmen por frasco e períodos de incubação de 0,5; 1; 1,5 e 2 horas foram testados. Os valores da produção das células, obtidos através da incorporação do fósforo radioativo, concordaram com os resultados teóricos calculados pela produção de ácidos graxos voláteis (30 g/mol e de lactato (15 g/mol.

Entretanto, o trabalho de *VAN NEVEL et alii* (1976) mostrou que os valores da produção celular, calculados pelo

uso do fósforo-32, foram significativamente diferentes dos resultados obtidos através do método de utilização de amônia ou nitrogênio solúvel total, em meio desprovido de proteínas. Essas diferenças são explicadas baseando-se no fato de que, através da utilização da amônia, se mede o resultado do crescimento e degradação das células (crescimento líquido) e, pela incorporação de radioisótopos, é medido o crescimento total. Assim, os autores sugerem cautela na interpretação dos resultados e recomendam a aplicação de métodos químicos associados com essa determinação.

Também VAN NEVEL e DEMEYER (1977), utilizando o fósforo-32 em estudo do crescimento microbiano e comparando os resultados com os valores obtidos por métodos químicos, concluíram que através da incorporação do radioisótopo é medido o crescimento total.

DURAND *et alii* (1976) utilizaram a técnica de incorporação de ^{32}P para o estudo dos efeitos da fonte de energia e de alguns minerais sobre o crescimento microbiano.

Esses autores testaram a influência de grãos de amido de diferentes origens sobre a utilização da uréia pelos microorganismos do rúmen. Os efeitos da adição de enxofre e zinco ao meio de incubação e do nível de zinco da dieta também foram estudados. Os resultados mostraram que o enxofre adicionado na forma de Na_2SO_4 aumentou significativamente

a incorporação de fósforo-32 pelas células bacterianas, mas não houve evidência de qualquer efeito do zinco da dieta ou daquele adicionado ao meio.

A incorporação de fósforo-32 em fosfato inorgânico intracelular e em fosfolipídeos e a relação entre crescimento celular e síntese de fosfolipídeos foram estudadas por *BUCHOLTZ* e *BERGEN* (1973). Esses pesquisadores observaram que, na presença de substrato contendo 180 µg de fósforo/ml, houve acentuada incorporação do elemento radioativo em fosfato inorgânico e fosfolipídeos. Um aumento na incorporação também foi observado quando microorganismos do líquido do rúmen de carneiros, mantidos em dietas ricas em proteínas, foram incubados com fósforo-32.

Outros radioistótopos são utilizados em pesquisas que envolvem o metabolismo dos microorganismos do rúmen.

DURAND et alii (1975) estimaram a síntese de proteína microbiana "*in vitro*", através do enxofre-35 na forma de Na_2SO_4 . Os resultados, quando comparados com aqueles obtidos pela medida do consumo de uréia ou amônia do meio, mostraram as mesmas tendências, mas não foram proporcionais. Uma das explicações para esse fato é que a radioatividade incorporada em produtos intermediários da síntese de proteínas, tais como os aminoácidos, não foi medida. Para obtenção de resultados quantitativos com o emprego do enxofre-35, os autores sugerem

que sejam feitas determinações do conteúdo do enxofre do meio, bem como da incorporação da radioatividade nos aminoácidos.

HARMEYER *et alii* (1975) fizeram estimativas do crescimento microbiano "*in vitro*", utilizando amostras de conteúdo do rúmen de carneiros mantidos em dietas purificadas, livres de proteínas. A síntese de proteínas foi medida através da análise química dos teores de nitrogênio, fósforo e enxofre na matéria seca microbiana e pela incorporação de fósforo-32 e enxofre-35. Esses autores observaram que os valores obtidos através dos radioisótopos foram mais altos que aqueles baseados na análise química direta, indicando que, pelo método da incorporação de marcadores isotópicos, foi medido o crescimento total.

Estimativas "*in vivo*" do metabolismo dos microorganismos presentes no rúmen foram feitas por alguns autores.

WALKER e NADER (1975) descreveram um método de medida "*in vivo*" da síntese de proteínas no rúmen. Sulfato inorgânico marcado com enxofre-35 foi inoculado continuamente neste órgão e a medida da síntese foi feita através da radioatividade incorporada em proteínas microbianas.

Também WALKER *et alii* (1975), baseando-se na incorporação do enxofre-35 em aminoácidos microbianos, compa

raram a síntese proteica em ovinos alimentados com forragens verde e feno. Esses autores observaram que a síntese foi maior nos animais que receberam a forragem verde.

A literatura citada sugere que a técnica da incorporação de isótopos pelos microorganismos apresenta resultados mais precisos quando é utilizada em associação com métodos de análise química e que, quando se compara o uso de diferentes isótopos, aqueles do fósforo mostraram melhores resultados para o estudo do crescimento dos microorganismos que os isótopos do nitrogênio ou enxofre.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O presente trabalho foi realizado na Divisão de Ciências Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba, Estado de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas de metabolismo no biotério e o preparo de amostras e as análises foram realizadas nos laboratórios da Divisão de Ciências Animais. A detecção da radioatividade das amostras foi feita no laboratório da Seção de Dosimetria e Proteção Radiológica do CENA.

4.2. Animais

Foram utilizados 12 carneiros machos castrados, mestiços com peso médio de 24,5 kg e idade aproximada de 12 meses, nascidos e criados no Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga, do Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo. Os animais foram vermifugados e tosquiados, tendo sido também

vacinados contra febre aftosa.

4.3. Dieta experimental

A dieta básica constituiu-se de feno de capim Jaraguá (*Hyparrhenia rufo*) com baixo teor de fósforo, produzido pelo Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, cuja composição é mostrada abaixo:

Matéria seca %	91,12
Proteína bruta %	3,99
Fibra bruta %	35,77
Extrato etéreo %	2,59
Extrativos não nitrogenados %	50,78
Cinza %	6,87
Fósforo %	0,059
Potássio %	3,55
Cálcio %	0,44
Magnésio %	0,23
Enxofre %	0,11
—Ferro ppm	656,0
Cobre ppm	8,52
Manganês ppm	155,0
Zinco ppm	28,17
Energia bruta cal/g	3556

Através da análise bromatológica, verificou-se que este feno não fornecia quantidade suficiente de energia, proteína e alguns minerais, tornando-se necessária uma suplementação.

Para suprir as necessidades em energia e pro

teína de cada carneiro, foram utilizados, respectivamente, melão e caseína industrial. A composição desses suplementos é indicada abaixo:

	Caseína	Melão
Matéria seca %	91,73	79,20
Proteína bruta %	80,16	-
Cinza %	3,68	6,62
Fósforo %	1,10	0,03
Potássio %	0,60	1,38
Cálcio %	1,67	0,97
Magnésio %	0,07	3,26

Cada animal recebeu, em solução, sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em quantidade suficiente para satisfazer a sua exigência em zinco e cobalto, de acordo com as tabelas do NRC (1975).

Visando obter diferentes níveis de ingestão de fósforo, fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi adicionado à dieta básica para fornecer 2 e 4 g do elemento por dia aos animais dos tratamentos B e C respectivamente. Os animais do tratamento A não receberam este suplemento. Cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado para balancear a ingestão de sódio de cada carneiro.

Os animais receberam também água desmineralizada com 3 ppm de fósforo, o que é muito pouco comparado com a ingestão de fósforo da dieta.

A distribuição dos suplementos nos vários tratamentos foi feita de acordo com o esquema abaixo:

Suplemento	Tratamento		
	A	B	C
Melaço (ml/dia)	100,00	100,00	100,00
Caseína (g/dia)	35,00	35,00	35,00
Fosfato de sódio (g/dia)	0,00	11,50	23,00
Cloreto de sódio (g/dia)	15,26	7,60	0,00
Zinco (mg/dia)	42,50	42,50	42,50
Cobalto (mg/dia)	0,10	0,10	0,10

4.4. Equipamentos

4.4.1. Gaiolas para estudo de metabolismo

Foram utilizadas 6 gaiolas montadas com tubos e chapas galvanizadas, e cujo modelo é mostrado na Figura 1.

4.4.2. Coletor de líquido do rúmen

Para a coleta de líquido do rúmen foram usados 2 tubos plásticos com diâmetros internos de 0,5 e 1 cm colocados

dos um no interior do outro. Em uma das extremidades do tubo de menor diâmetro adaptou-se uma pera de borracha. Nos últimos 15 cm da outra extremidade desse tubo, uma série de pequenos orifícios foi feita para auxiliar na passagem do líquido.

Para facilitar a entrada deste tubo até o rúmen e evitar a destruição do mesmo pelo animal, introduziu-se antes o tubo de maior diâmetro pela boca até os 2/3 anteriores do esôfago. Após a introdução do tubo de menor diâmetro, o líquido do rúmen foi coletado por sucção.

Os detalhes desse coletor são mostrados na Figura 2.

4.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, sendo considerados três tratamentos, quatro blocos e doze semanas experimentais. Na análise estatística foi feita a regressão através do método dos polinômios ortogonais, procurando ajustar as curvas aos dados observados.

O teste F foi usado para verificar a significância dos quadrados médios das fontes de variação. Para comparação das médias das diversas determinações foi aplicado o teste de Tukey.

Foram ainda calculadas as correlações entre os

Fig. 1 - Gaiola de metabolismo utilizada no experimento

Fig. 2 - Coletor de líquido do rúmen

parâmetros estudados.

4.6. Períodos experimentais

4.6.1. Período de adaptação

Durante cinco dias os animais foram mantidos nas gaiolas para adaptação, recebendo feno de capim Rhodes (*Chloris gayana*) contendo 0,18% de fósforo e água à vontade.

4.6.2. Período pré-experimental

No período pré-experimental, cuja duração foi de 7 dias, a mesma alimentação foi mantida, sendo registrado o consumo de cada animal. Neste período foi iniciada a suplementação de proteína e de energia, através do fornecimento de caseína e melado, respectivamente.

4.6.3. Período experimental

No período experimental com duração de 13 semanas fez-se, diariamente, o controle das quantidades de feno e água ingeridos pelos animais.

Os carneiros receberam o feno deficiente em fósforo 2 vezes ao dia, sendo que na porção dada pela manhã foram misturados os suplementos.

Semanalmente antes da alimentação matinal, foram coletados, em frascos contendo 0,2 ml de Heparina*, 50 ml

*Nome comercial: Liquepine - ROCHE

de sangue de cada animal para determinar o teor de fósforo no plasma. Amostras de 200 ml de líquido do rúmen também foram retiradas e, após filtradas com pano de algodão ("tipo queijo"), foram colocadas em garrafas térmicas. O líquido do rúmen foi utilizado para incubações e determinações do pH e do nível de fósforo.

4.7. Solução radioativa

A solução radioativa usada foi produzida pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo e constituiu-se de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$, livre de carregador.

Em 50 ml de uma solução de Na_2HPO_4 com 1 ppm de fósforo foi adicionada uma alíquota de material radioativo correspondente a 0,25 mCi, sendo então esta solução utilizada no experimento.

4.8. Incubações

Para as incubações foram utilizados tubos de ensaio de pirex com capacidade de 50 ml, sendo usados 3 tubos para ca

da tratamento.

Em cada um colocou-se substrato constituído de 300 mg de glucose (D glucose monohidrato), 30 mg de uréia e 19 ml de saliva artificial preparada de acordo com o trabalho de *DURAND et alii* (1976). Para se conseguir um meio isento de fósforo, exclui-se da composição da saliva o composto contendo esse elemento, assegurando assim que o fósforo utilizado pelos microorganismos originou-se do próprio líquido do rúmen adicionado e da solução radioativa.

A composição da saliva artificial é apresentada da abaixo:

	g/l
NaCl	0,470
KCl	0,450
MgCl ₂	0,047
CaCl ₂	0,055
NaHCO ₃	9,240
Na ₂ SO ₄	0,160
	mg/l
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2,000
MnSO ₄ . H ₂ O	4,000
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,080
CoCl ₂	2,000
FeSO ₄ . 7H ₂ O	75,000

Os tubos foram em seguida colocados em banho-maria a 39°C. Borbulhou-se CO₂ na solução durante 5 minutos,

utilizando-se agulha de injeção adaptada na extremidade de um tubo de latex. A outra extremidade foi colocada na saída de um distribuidor ligado a 1 cilindro de CO₂. Os tubos foram fechados com tampa de borracha, permanecendo no banho-maria por 20 minutos para haver um equilíbrio da temperatura do substrato.

A cada frasco de incubação adicionou-se 1 ml de líquido do rúmen e 20 microlitros da solução contendo fósforo radioativo, correspondendo a 0,1 µCi de ³²P. Nos tubos fechados manteve-se um fluxo de CO₂ por 5 minutos, a 50 atmosferas.

Decorridos 60 minutos, os tubos foram mergulhados em cuba contendo água e gelo, para obter um abaixamento da temperatura para aproximadamente 8°C. Adicionou-se 0,2 ml de solução de ácido sulfúrico 5N a cada tubo, interrompendo assim a fermentação.

4.9. Análises

Após a incubação, centrifugou-se o conteúdo dos tubos a 27000 g a 8°C por 20 minutos, em ultracentrífuga MSE modelo PREPSIN 75. O sobrenadante foi retirado e alíquotas de 1 ml foram colocadas em frascos contendo 9 ml de ácido tricloroacético a 10% para determinação do teor de fósforo inorgânico, realizada pelo método de *FISKE* e *SUBBAROW (1925)*. A radioatividade do sobrenadante foi medida através do efeito CE

RENKOV, em cintilador Beckman LS - 230, no canal 0-500 unida
des arbitrárias. Para essa medida, transferiu-se 1 ml de so
brenadante para os frascos de cintilação que continham 19 ml
de água destilada.

O precipitado foi misturado com 10 ml de solu
ção salina (8,5 g NaCl/litro de H₂O) e centrifugado a 482 g,
a 8°C, por 2 minutos em centrífuga Sorvall SuperSpeed RC2B,
com a finalidade de separar os resíduos de alimento que fica
ram misturados com os microorganismos. O sobrenadante obtido
foi centrifugado a 27000 g, a 8°C por 20 minutos em centrífu
ga Sorvall. O precipitado, constituído de microorganismos,
foi suspenso em 20 ml de água destilada e transferido para
frascos de cintilação para a contagem da radioatividade incorpor
ada pelos microorganismos.

O líquido do rúmen restante, guardado nas garraf
as térmicas foi utilizado para a medida do pH e determinação
do teor de fósforo inorgânico pelo método de *FISKE* e *SUB*
BAROW (1925). Antes de ser feita esta última determinação,
fez-se uma diluição do líquido do rúmen de 1:20 com água desmin
eralizada.

4.10. Cálculo para a determinação do fósforo incorporado

O método para determinação da quantidade de
fósforo incorporado pelos microorganismos, através do uso de

radioisótopos, envolve, de acordo com o trabalho de *VAN NEVEL* e *DEMEYER (1977)*, os seguintes passos:

1. Marcação com radioisótopo (^{32}P) do meio precursor de constituintes das células microbianas.

2. Incorporação do isótopo radioativo pelos microorganismos em diversas frações celulares (DNA, RNA, fosfolipídeos).

O cálculo é feito a partir da atividade específica do fosfato inorgânico do meio e considerando que, durante a incubação, há um equilíbrio entre a atividade específica desse meio e a da fração representada pelos microorganismos.

Pela definição de atividade específica tem-se:

$$\text{Atividade específica das células} = \frac{\text{cpm inc}}{\text{mgP inc}}$$

$$\text{Atividade específica do meio} = \frac{\text{cpm meio}}{\text{mgP meio}}$$

onde,

cpm inc = contagens por minuto das células

P inc = quantidade de fósforo incorporada pelos microorganismos

cpm meio = contagens por minuto do meio

P meio = teor de fósforo do meio

Havendo o equilíbrio tem-se:

Atividade específica das células = atividade específica do meio.

$$\frac{\text{cpm inc}}{\text{mgP inc}} = \frac{\text{cpm meio}}{\text{mgP meio}}$$

$$\text{mgP inc} = \frac{\text{cpm inc} \times \text{mgP meio}}{\text{cpm meio}}$$

5. RESULTADOS

5.1. Ingestão de fósforo

A ingestão de fósforo foi calculada baseando-se na quantidade desse elemento consumida diariamente no suplemento, melaço, caseína e água, sendo que as médias obtidas para os tratamentos A, B e C foram $0,687 \pm 0,022$; $2,720 \pm 0,025$; $4,649 \pm 0,020$ g/dia, respectivamente e os coeficientes de variação, 3,20; 0,92 e 0,43%.

Os animais nos tratamentos A e B (0 e 2 g de P/dia) tiveram um comportamento normal durante todo o período experimental. Entretanto, os carneiros que receberam 4 g de P/dia apresentaram falta de apetite, diarreia e apatia.

A Figura 3 mostra a quantidade média diária de fósforo ingerida pelos animais nos três tratamentos, com o decorrer do tempo. Para os tratamentos A e B houve uma tendência dos valores de aumentar da primeira à oitava semanas, decrescendo em seguida. Para o tratamento C houve um decrêscimo na quantidade de fósforo ingerida até a 5ª semana, sendo

Fig. 3. Quantidade de fósforo (g/dia) ingerida durante as semanas experimentais pelos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

seguido por um aumento até a 9^a, decrescendo posteriormente.

5.2. Ingestão de feno

A ingestão média diária de feno foi $562,846 \pm 40,387$; $629,769 \pm 48,677$ e $500,385 \pm 36,160$ g, para os tratamentos A, B e C respectivamente. Os coeficientes de variação foram 7,18; 7,73 e 7,23%.

Pela análise da variância, verificou-se que houve efeito de tratamentos e blocos ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 1). A 5% a regressão linear mostrou-se significativa, obtendo-se a seguinte equação:

$$Y = 532,988 + 5,1844X, \text{ onde}$$

Y representa os valores das observações feitas
X representa as semanas experimentais

Como o coeficiente de explicação do modelo ajustado foi baixo (34,36%), não se utilizou a reta ajustada para a interpretação dos resultados.

Aplicando-se o teste de Tukey, observou-se que o tratamento B foi superior aos tratamentos A e C, enquanto que o tratamento A foi superior ao C ao nível de 1% de probabilidade.

Para os tratamentos A e B houve uma tendência de aumentar a ingestão de feno até a 8^a semana experimental, ocorrendo depois um declínio. Para o tratamento C, nas pri

Tabela 1. Análise da variância da quantidade de feno ingerida (g/dia) pelos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

F.V.	G.L.	Q.M.	Teste F
Regressão Linear	1	46.123,38	5,17*
Regressão Quadrática	1	27.763,58	3,11
Regressão Cúbica	1	34.406,35	3,86
Regressão Quarta	1	9.460,78	1,06
Regressão Quinta	1	6.367,92	0,71
Falta de Ajustamento	6	1.686,17	0,19
Semanas	11	12.203,55	1,37
Tratamentos	2	220.129,57	24,67**
Blocos	3	593.299,40	66,50**
Resíduo	127	8.922,45	
Total	143		

meiras cinco semanas, a tendência foi de decrescer, sendo depois observado um aumento até a 9^a semana, decrescendo novamente até o final do experimento (Figura 4).

5.3. Teor de fósforo no plasma

As médias do teor de fósforo no plasma para os tratamentos A, B e C foram $5,355 \pm 0,546$; $7,262 \pm 0,616$ e $7,340 \pm 0,587$ mg/100ml, respectivamente. Os coeficientes de variação foram 10,20; 8,48 e 8,00%.

A análise da variância mostrou que houve efeito de tratamento, blocos e regressão linear ao nível de 1%, não sendo encontrada significância para regressão de 2^a a 5^a ordens, nem para falta de ajustamento do modelo. Ao nível de 5% observou-se efeito de semanas (Tabela 2). A equação de regressão obtida foi:

$$Y = 7,0578 - 0,0678X, \text{ onde}$$

Y representa os valores das observações feitas

X representa as semanas experimentais

O coeficiente de explicação foi 36,08%.

Pelo teste de Tukey, verificou-se que os tratamentos B e C foram significativamente superiores ao tratamento A (1%) e os tratamentos B e C não diferiram estatisticamente entre si.

Fig. 4. Feno ingerido (g/dia) durante as semanas experimentais pelos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

Tabela 2. Análise da variância do teor de fósforo no plasma (mg/100 mL) dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

F.V.	G.L.	Q.M.	Teste F
Regressão Linear	1	10,073	9,040**
Regressão Quadrática	1	2,619	2,350
Regressão Cúbica	1	1,724	1,547
Regressão Quarta	1	1,506	1,352
Regressão Quinta	1	0,260	0,233
Falta de Ajustamento	7	1,677	1,505
Semanas	12	2,327	2,088*
Tratamentos	2	65,670	58,938**
Blocos	3	14,333	12,864**
Resíduo	138	1,1142	
Total	155		

Para os tratamentos A e C, a partir da 3ª semana, os valores tenderam a decrescer, não ocorrendo grandes variações depois da 6ª semana. Os valores para o tratamento B mostraram uma variação maior a partir desta semana e tenderam a aumentar (Figura 5).

5.4. Teor de fósforo no líquido do rúmen

Os valores médios de fósforo no líquido do rúmen obtidos para os tratamentos A, B e C foram $38,166 \pm 5,614$; $60,815 \pm 5,418$ e $82,232 \pm 8,996$ mg/100 mL, respectivamente. Os coeficientes de variação foram: 14,71; 8,91 e 10,94%.

A análise da variância mostrou que ao nível de 1% de probabilidade houve efeito de tratamentos e blocos, sendo que não foi encontrada significância para semanas, falta de ajustamento, nem para regressão de 2ª a 5ª ordens. Ao nível de 5% detectou-se efeito de regressão linear (Tabela 3), obtendo-se a seguinte equação:

$$Y = 64,2314 - 0,8002X, \text{ onde}$$

Y representa os valores das observações feitas

X representa as semanas experimentais

O coeficiente de explicação foi 37,22%.

Pelo teste de Tukey, observou-se que os tratamentos diferiam entre si ao nível de 1% de probabilidade, sendo

Fig. 5. Teores de fósforo no plasma (mg/100 ml) durante as semanas experimentais dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

.46.

Tabela 3. Análise da variância do teor de fósforo no líquido rúmen (mg/100 ml) dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

F.V.	G.L.	Q.M.	Teste F
Regressão Linear	1	1398,576	5,48*
Regressão Quadrática	1	812,302	3,18
Regressão Cúbica	1	3,464	0,01
Regressão Quarta	1	28,844	0,11
Regressão Quinta	1	67,602	0,26
Falta de Ajustamento	7	206,649	1,81
Semanas	12	313,111	1,23
Tratamentos	2	25174,362	98,63**
Blocos	3	1604,108	6,29**
Resíduo	138	255,246	
Total	155	607,370	

do que o tratamento C foi estatisticamente superior ao B e este, superior ao A.

Apesar das oscilações que ocorreram durante as semanas experimentais, os valores tenderam a decrescer para os três tratamentos (Figura 6).

5.5. pH do líquido do rúmen

Pela análise da variância verificou-se que não houve efeito de tratamentos, semanas, regressão, nem de falta de ajustamento (Tabela 4). As médias obtidas foram: $7,725 \pm 0,169$; $7,707 \pm 0,125$ e $7,590 \pm 0,158$, para os tratamentos A, B e C, respectivamente. Os coeficientes de variação foram: 2,19; 1,62 e 2,08%.

A Figura 7 mostra os valores médios do pH durante as semanas experimentais.

5.6. Incorporação "*in vitro*" de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen

Os valores médios da incorporação de fósforo para os tratamentos A, B e C foram: $0,091 \pm 0,012$; $0,114 \pm 0,021$ e $0,134 \pm 0,032$ mg, respectivamente e os coeficientes de variação, 13,19; 18,42 e 23,88%.

Pela análise da variância observou-se que houve efeito de tratamentos, blocos, regressão quadrática e da

Fig. 6. Teores de fósforo no líquido do rúmen (mg/100 ml) durante as semanas experimentais dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

Tabela 4. Análise da variância dos valores do pH do líquido do rúmen dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

F.V.	G.L.	Q.M.	Teste F
Regressão Linear	1	0,009313	0,018
Regressão Quadrática	1	0,041276	0,079
Regressão Cúbica	1	0,000477	0,001
Regressão Quarta	1	0,153897	0,293
Regressão Quinta	1	0,136751	0,260
Falta de Ajustamento	7	0,075900	0,145
Semanas	12	0,072750	0,139
Tratamentos	2	0,271734	0,518
Blocos	3	4,677979	8,912**
Resíduo	138	0,524916	
Total	155	0,567000

Fig. 7. Valores do pH do líquido do rúmen durante as semanas experimentais dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

falta de ajustamento a 1% de probabilidade. Não foi detectado o efeito de regressão linear, cúbica, de 4ª e 5ª ordens (Tabela 5). O coeficiente de explicação foi 51,72% e a equação obtida,

$$Y = 0,0935 + 0,0127 X - 0,0011X^2, \text{ onde}$$

Y representa os valores das observações feitas

X representa as semanas experimentais.

Pelo teste de Tukey, verificou-se que houve diferença entre os tratamentos, sendo que o A diferiu dos demais ao nível de 1% e o B diferiu do C a 5% de probabilidade.

Em todos os tratamentos observou-se durante as semanas, que os valores da incorporação tiveram uma oscilação semelhante sendo a sua amplitude maior para os tratamentos B e C na 5ª e 9ª semanas (Figura 8).

5.7. Correlações

As análises revelaram que houve alta correlação entre os teores de fósforo ingerido e no líquido do rúmen ($r = 0,72$) e entre a ingestão de fósforo e de feno ($r = 0,81$). Embora com uma relação de dependência regular ($r = 0,59$), pode-se dizer que existiu alguma associação entre o teor de fósforo no plasma e no rúmen.

Não se verificou correlações entre a ingestão de fósforo e o teor desse elemento no plasma, a ingestão de

Tabela 5. Análise da variância da incorporação "*in vitro*" de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

F.V.	G.L.	Q.M.	Teste F
Regressão Linear	1	0,0019	1,50
Regressão Quadrática	1	0,03147	24,78**
Regressão Cúbica	1	0,00040	0,31
Regressão Quarta	1	0,00260	2,05
Regressão Quinta	1	0,00031	0,24
Falta de Ajustamento	7	0,00398	3,13**
Semanas	12	0,00538	4,23**
Tratamentos	2	0,02436	19,16**
Blocos	3	0,09657	75,97**
Resíduo	138	0,00127	
Total	155

Fig. 8. Incorporação "*in vitro*" de ^{32}P pelos microorganismos do rúmen durante as semanas experimentais, dos animais nos tratamentos A, B e C (0, 2 e 4 g de P/dia, respectivamente).

fósforo e a incorporação pelos microorganismos, e entre o teor de fósforo no líquido do rúmen e a incorporação pelos microorganismos (Tabela 6).

Tabela 6. Correlações entre os resultados do fósforo ingerido, pH do líquido do rúmen, teor de fósforo no líquido do rúmen e no plasma, fósforo incorporado pelos microorganismos e feno ingerido.

	Fósforo Ingerido	pH do líquido do rúmen	Fósforo no líquido do rúmen	Fósforo no plasma	Fósforo Incorporado	Feno Ingerido
Fósforo ingerido	1	- 0,098	0,716	0,058	0,328	0,811
pH do líquido do Rúmen		1	- 0,316	-	-	-
Fósforo no líquido do rúmen			1	0,594	0,125	- 0,281
Fósforo no plasma				1	0,034	- 0,226
Fósforo incorporado					1	0,535
Feno ingerido						1

6. DISCUSSÃO

6.1. Ingestão de fósforo

A falta de apetite e a diarreia observadas nos animais que receberam 4 g de P/dia foram também encontradas por *McMENIMAN (1973)*, quando utilizou quantidade de ácido fosfórico correspondente a 1,5 g de P/carneiro/dia. A explicação dada por aquele autor foi de que os efeitos tóxicos não foram devidos ao elemento propriamente dito, mas, à forma química do suplemento e às impurezas presentes nesse composto. O fosfato de sódio utilizado no presente experimento apresentava alto grau de pureza, ficando portanto rejeitada esta última hipótese para o experimento desta dissertação.

A intoxicação observada teve como principais causas a forma e a quantidade do suplemento, o que concorda com *HOAR et alii (1970)* que encontraram problema semelhante em ovelhas quando utilizaram a mesma fonte de fósforo (Na_2HPO_4) e em nível abaixo daquele usado para o tratamento C

(0,57%).

Um outro fato que pode ter contribuído para causar a intoxicação foi o excesso de fósforo em relação ao cálcio (*CHURCH et alii*, 1971). Uma vez que não foi fornecida outra fonte de cálcio, além do feno, e como os animais do tratamento C receberam elevada quantidade de fósforo, houve um desequilíbrio entre esses elementos.

As variações na ingestão de fósforo, com o decorrer do tempo, foram devidas principalmente à variação na quantidade desse elemento ingerida através do feno, o que pode ser observado quando se compara as Figuras 3 e 4.

Uma vez que a quantidade de fósforo presente na água consumida pelos animais foi muito pequena, a sua contribuição para o cálculo da ingestão de fósforo foi insignificante, não afetando esses resultados.

A alta correlação encontrada entre o teor de fósforo ingerido e o consumo de feno é óbvia, já que na determinação da ingestão daquele elemento as duas fontes de variação foram o consumo de feno e de água.

6.2. Ingestão de feno

No que se refere ao efeito do nível de fósforo sobre o consumo de feno, os resultados obtidos para os trata

mentos A e B estão em concordância com os achados de *PRESTON* e *PFANDER (1964)*, que mostraram haver uma maior ingestão de alimento com o aumento do nível de fósforo dietético. Entretanto, o consumo mais baixo, para os animais no tratamento C, indica que nem sempre isso ocorre. Esta discordância pode ser explicada pelo fato de que o nível de fósforo utilizado para o tratamento C foi muito acima daqueles citados por *PRESTON* e *PFAN*DER (1964).

A diminuição na ingestão de feno pelos carneiros nesse tratamento foi devida ao efeito tóxico da alta quantidade de suplemento fornecido, como já se discutiu anteriormente.

O aumento na ingestão até a 8^a semana para os tratamentos A e B, provavelmente foi devido a melhor adaptação dos animais ao confinamento e à alimentação fornecida. O declínio observado após, pode ter sido causado pela fadiga dos animais em consequência do longo período de tempo que permaneceram nas gaiolas.

6.3. Teor de fósforo no plasma

Os teores de fósforo no plasma para os tratamentos B e C estão acima dos considerados normais para essa espécie (*Kay* in *IRVING, 1964*) e as variações que ocorreram já eram previstas de acordo com os achados de *DONALD et alii*

(1973). Os valores médios para os animais do tratamento A foram baixos, mas não podem ser considerados como indicadores de deficiência, pois o limite mínimo indicado por MAYNARD e LOOSLI (1969) e por DONALD *et alii* (1973) é de 4 mg de P/100 ml e por UNDERWOOD (1969) é de 4,5 mg de P/100 ml.

No tratamento A, o decréscimo dos níveis no plasma, principalmente nas seis primeiras semanas, deve-se à quantidade insuficiente de fósforo ingerida (PRESTON e PFANDER, 1964). O fato dos animais deste tratamento conseguirem manter os níveis normais, mesmo após uma longa permanência em dieta com baixo teor de fósforo, indica que houve uma adaptação do organismo a essas condições. Isso poderia ser conseguido através da retirada do elemento dos tecidos e outros fluídos (Hays e Swenson in SWENSON, 1970). Deve-se levar em conta também que os animais utilizados tinham, em média, 12 meses de idade e uma resposta mais evidente poderia ter sido obtida se eles fossem mais jovens (MOODIE, 1975).

Comparando-se os resultados das seis primeiras semanas para os 3 tratamentos (Figura 5), pode-se dizer que houve uma relação direta entre o nível de fósforo ingerido e os valores no plasma, o que concorda com os achados de BENZIE *et alii* (1959); PRESTON e PFANDER (1964) e VIPPERMAN *et alii* (1969). Entretanto, a variação observada a partir da 7ª semana pode indicar que um longo período experimental causou fadiga aos animais, afetando esses níveis (Gartner *et alii* in

COHEN, 1974). O fato de não se verificar uma correlação entre a ingestão de fósforo e o teor no plasma, pode estar relacionado a esse aspecto.

6.4. Teor de fósforo no líquido do rúmen

Os resultados do teste de médias e a correlação positiva entre o teor de fósforo ingerido e no líquido do rúmen mostraram que um aumento do nível na dieta resultou em maior concentração desse mineral no líquido do rúmen (EVANS e DAVIS, 1961; PRESTON e PFANDER, 1964; EVANS e DAVIS, 1966; Djordjevic et alii in NIKOLIĆ, 1976). A alta correlação obtida ($r = 0,72$) confirma os resultados de EVANS e DAVIS (1966) que obtiveram um valor semelhante ($r = 0,77$).

A correlação positiva entre os níveis de fósforo no plasma e no líquido do rúmen, observada no presente trabalho, está de acordo com os achados de TOMAS et alii (1967) e indica que pode ter havido uma passagem do mineral do plasma, através da parede do rúmen, para esse órgão e vice-versa (PARTHASARATHY et alii, 1952).

Um aspecto importante do efeito do fósforo da dieta sobre o conteúdo do rúmen seria que os níveis dietéticos considerados deficientes refletiriam não só diretamente no animal, mas também nos microorganismos, afetando assim a utilização de nutrientes.

O fato de *CLARK (1953)* não ter encontrado diferença entre o teor de fósforo no rúmen de carneiro mantido em dieta normal ou com baixo nível desse elemento pode ser devido ao número insuficiente de animais utilizados. Entretanto, outros fatores, poderiam ter contribuído para a não significância entre os tratamentos. Como não há nesse trabalho maiores detalhes na metodologia utilizada, torna-se difícil explicar as diferenças entre tais resultados e os do presente trabalho.

Apesar do decréscimo do teor de fósforo no líquido do rúmen com o decorrer do tempo, para os três tratamentos, a variação observada pode ser considerada dentro dos limites normais de acordo com *Gar-ton in BARNETT e REID (1961)* e *Parthasarathy in BARNETT e REID (1961)*.

6.5. pH do líquido do rúmen

Os valores do pH do líquido do rúmen para os três tratamentos estão acima daqueles encontrados usualmente (*Phillipson in SWENSON, 1970*), o que pode ter sido devido à natureza da dieta fornecida (*SWENSON, 1970*).

Como o fosfato é um dos importantes componentes tampões que existem no rúmen (*EMMANUEL et alii, 1970; CHURCH et alii, 1971*), contribuindo para manter um alto valor de pH (*EMMANUEL et alii, 1970*), era de se esperar que fossem encontradas diferenças entre os animais que receberam ou não a suplementação

de fósforo. Entretanto, da mesma forma que *FONNESBECK et alii* (1970), não se verificou efeito do nível de fósforo sobre o pH do líquido do rúmen.

No presente trabalho, o pH foi medido antes da alimentação matinal, ou seja, 24 horas após o fornecimento do suplemento. Isso pode ter prejudicado a detecção de qualquer influência do fósforo pois, observa-se pela literatura citada que o efeito desse elemento foi mais evidente 2 a 3 horas após a alimentação (*FONNESBECK et alii*, 1970; *EMMANUEL et alii*, 1970). Sugere-se, então, nos estudos da influência do fósforo sobre o pH do líquido do rúmen, que sejam feitas determinações em vários intervalos após a alimentação.

6.6. Incorporação "*in vitro*" de fósforo-32 pelos microorganismos do rúmen

Pelos resultados observa-se que a incorporação de fósforo pelos microorganismos foi menor para o mais baixo conteúdo desse elemento na dieta. Considerando o significado do teste de incorporação de fósforo proposto originalmente por *VAN NEVEL* e *DEMEYER* (1973), e mais tarde por outros autores (*VAN NEVEL et alii*, 1976; *DURAND et alii*, 1976; *VAN NEVEL* e *DEMEYER*, 1977), como medida do crescimento celular, pode-se dizer que, no tratamento A, o crescimento dos microorganismos foi menor, produzindo-se conseqüentemente uma quantidade menor de nutrientes para o animal.

A existência de uma oscilação semelhante para os três tratamentos, com o decorrer do tempo, indica que houve um ritmo inerente aos próprios microorganismos para todos os animais, independente da quantidade de fósforo ingerida. As causas dessa variação não são conhecidas e mais estudos deverão ser feitos com o objetivo de se obter maiores informações a respeito do comportamento dos microorganismos nessas condições experimentais.

Os resultados mostraram que os teores de fósforo no rúmen não foram relacionados com a quantidade desse elemento incorporada pelos microorganismos, o que poderia indicar que as diferenças entre os valores encontrados no rúmen não foram suficientes para se detectar uma resposta na incorporação de fósforo. Como o nível de fósforo, presente em meios de incubação, tem efeito sobre a atividade dos microorganismos (*ANDERSON et alii*, 1956; *HALL et alii*, 1961; *CHICCO et alii*, 1965), a causa dessa falta de resposta poderia ter sido uma metodologia não apropriada. Provavelmente, se fosse usada nas incubações maior quantidade de líquido do rúmen ou maior tempo, como no trabalho de *VAN NEVEL* e *DEMEYER* (1973), os efeitos do fósforo sobre a incorporação poderiam ter sido mais evidentes.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que:

1. Com relação à ingestão de feno, a quantidade de fósforo, na forma de Na_2HPO_4 , mais adequada para carneiros com peso médio de 24,5 kg e 12 meses de idade foi 2g/dia.
2. Quatro gramas de P/dia, na forma de Na_2HPO_4 , foram tóxicos, causando falta de apetite, diarreia e apatia nos carneiros.
3. O teor de fósforo no plasma, no líquido do rúmen e a incorporação de fósforo pelos microorganismos foram influenciados pelo nível desse elemento na dieta. Esses parâmetros poderiam portanto, ser usados na avaliação do estado nutricional dos animais com relação ao fósforo.
4. Os níveis de fósforo no plasma e no rúmen foram correlacionados positivamente.

5. Durante o período experimental, não se verificou efeito da ingestão do elemento sobre o pH do líquido do rúmen, quando este foi medido 24 horas após o fornecimento do suplemento de fósforo.
6. Devido ao desconforto causado aos animais pelo longo tempo de permanência nas gaiolas, recomenda-se, em tal tipo de experimento, que o período experimental não ultrapasse 7 ou 8 semanas. Nas incubações com ^{32}P é aconselhável que mais estudos sejam feitos com relação à quantidade de líquido do rúmen utilizada e ao período de incubação.

8. SUMMARY

Twelve sheep were kept in metabolism crates for thirteen weeks, to study the influence of different levels of phosphorus in the diet on intake of food, plasma and rumen liquid inorganic phosphorus, pH of rumen liquid, and "*in vitro*" ^{32}P uptake by rumen microorganisms.

The diet comprised grass hay, molasses and casein. Phosphorus was supplemented as sodium phosphate (Na_2HPO_4) at levels 2 and 4 g per day, to animals in treatments B and C. Animals in treatment A did not receive phosphorus supplement.

Food ingestion was recorded daily. Blood and rumen liquid samples were collected weekly to determine the content of inorganic phosphorus, and the pH of rumen liquid was determined weekly. Rumen liquid samples were incubated with ^{32}P to determine the "*in vitro*" uptake by microorganisms.

The effect of the phosphorus in the diet was as follows:

- a) Intake of food: The animals which received 2 g of P/day showed the highest intake of hay (daily average = 629,77 g);
- b) Phosphorus content in the plasma and in the rumen liquid: The highest level in the diet resulted in the highest values in the plasma (7,34 mg/100 ml) and in the rumen (82,23 mg/100 ml);
- c) "*In vitro*" uptake by rumen microorganismos: The rumen liquid samples collected from the animals which received 4 g of P/day showed the highest values (average = 0,134 mg).

Phosphorus ingestion had no effect on the pH of rumen liquid 24 hours after phosphorus supplementation.

The best level of this element in the diet for the sheep in this study was 2 g/day. The animals which received 4 g/day showed loss of appetite, diarrhea and apathy.

The long period in the cages caused stress to the animals and an experimental period of only 7 to 8 weeks is recommended.

- 9. LITERATURA CONSULTADA

ANDERSON, R.; E. CHENG e W. BURROUGHS. 1956. A laboratory technique for measuring phosphorus availability of feed supplement fed to ruminants. *J. Anim. Sci., New York*, 15(2): 489-495.

ANNENKOV, B.N.; V.L. MADISON e P.JU. FOMICIEV. 1970. P metabolism in sheep. In: *NUTR. ABSTR. REV.* 41(1): 119, 1971.

ARCHIBALD, J.G. e E. BENNETT. 1935. The phosphorus requirements of dairy heifers. *J. Agric. Res., Washington* 51(1): 83-96.

BARNETT, A.J.G. e R.L. REID. 1961. The minerals involved in rumen function In:- *Reactions in the rumen.* London, Edward Arnold LTD, Cap. 7 p. 170-207.

BEESON, W.M.; C.E. TERRIL e D.W. BOLIN. 1944a. Some factors affecting the blood phosphorus levels of range ewes. *J. Anim. Sci., New York*, 3(2): 175-182.

BEESON, W.M.; R.F. JOHNSON; D.W. BOLIN e C.W. HICKMAN. 1944.

The phosphorus requirement of fattening lambs. *J. Anim. Sci.*, New York, 3(1): 63-70.

BENZIE, D.; A.W. BOYNE; A.C. DALGARNO; J. DUCKWORTH e R. HILL.

1959. Studies of the skeleton of the sheep. III. The relationship between phosphorus intake and resorption and repair of skeleton in pregnancy and lactation. *J. Agric. Sci.*, London, 52, parte 1: 1-12.

BUCHOLTZ, H.F. e W.G. BERGEN. 1973. Microbial phospholipid synthesis as a maker for microbial protein synthesis in the rumen. *Appl. Microbiol.* Washington 25(4): 504-513.

BURROUGHS, W.; A. LATONA; P. DEPAUL; P. GERLAUGH e R.M.

BETKE. 1951. Mineral influences upon urea utilization and cellulose digestion by rumen microorganisms using the artificial rumen technique. *J. Anim. Sci.*, New York, 10(1): 693-705.

BUSHMAN, D.H.; R.J. EMERICK, e L.B. EMBRY. 1965. Experimentally induced ovine phosphatic urolithiasis; relationships involving dietary calcium, phosphorus and magnesium. *J. Nutr.* Philadelphia, 87(4): 499-504.

CALL, J.W.; J.E. BUTCHER; J.T. BLAKE; R.A. SMART e J.L.

SHUPE. 1978. Phosphorus influence on growth and reproduction of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, New York, 47(1): 216-225.

CHICCO, C.F.; C.B. AMMERMAN; J.E. MOORE; P.A. van WALLEGHEM,

L.R. ARRINGTON e R.L. SHIRLEY. 1965. Utilization of inorganic ortho-meta and pyrophosphates by lambs and by cellulolytic rumen microorganisms "*in vitro*". *J. Anim. Sci.*, New York, 24(2): 355-363.

CHURCH, D.C. 1969. *Digestive Physiology and Nutrition of*

Ruminants. Corvallis, O & B. Books. V. 1. Cap. 10 p. 166-173.

CHURCH, D.C.; G.E. SMITH; J.P. FONTENOT e A.T. RALSTON. 1971.

Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. Corvallis, O. & B. Books. V. 2 Cap. 19. p. 413-451.

CLARK, R. 1953. A study of the water-soluble phosphate

concentration of the ruminal contents in normal and phosphorus deficient animals. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 26(1): 137-140.

COHEN, R.D.H. 1974. Phosphorus nutrition of beef cattle. 4.

The use of faecal and blood phosphorus for the estimation of phosphorus intake. *Aust. J. of Exp. Agric. and Animal Husb.*, New South Wales, 14(71): 709-715.

- DONALD, P.; R.A. EDWARDS e J.F.D. GREENHALG. 1973. *Animal Nutrition* 2^a Ed., London, Longman. Cap. 6 p. 89-112.
- DURAND, M.; A. KUMARESAN; Ph BEAUMATIN; C. DUMAY e L. GUEGUEN. 1976. "In vitro" studies on non-protein nitrogen utilization by rumen microflora. I. Effect of nature of energy and minerals using ^{32}P as a label microbial growth. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants.III*. (Proc. Research Co-ordination Meeting, Alexandria, 1976), Vienna. p. 27-39.
- DURAND, M.; L. GUEGUEN e F. PRIETO. 1975. Effect of source of energy and minerals on microbial protein synthesis in the rumen using labelled sulphur as indicator. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants.II* (Proc. Research Co-ordination Meeting, Vienna, 1974), Vienna. p. 29-42.
- EMMANUEL, B.; M.J. LAWLOR e D. MCLEESE. 1970. The effect of phosphate and carbonate-bicarbonate supplements on the rumen buffering systems of sheep. *Br. J.Nutr.*, London, 24: 653-660.
- EVANS, J.L. e G.K. DAVIS. 1961. Effects of phosphorus, sulphur and molybdenum supplementation of a steer ration on cellulose digestion and on the rumen liquid concentrations of phosphorus and sulphur. *J. Anim. Sci.*, New York, 20(1): 200 (Abstr.).

- EVANS, J.L. e G.K. DAVIS. 1966. Dietary phosphorus sulphur and molybdenum and mineral composition of rumen fluid. *J. Anim. Sci.*, New York, 25(4): 1010-1013.
- EVANS, J.L. e G.K. DAVIS. 1966a. Influence of sulphur, molybdenum, phosphorus and copper interrelationship in cattle upon cellulose digestion "*in vivo*" and "*in vitro*". *J. Anim. Sci.*, New York, 25(4): 1014-1018.
- FISHWICK, G.; J. FRASER; R.G. HEMINGWAY, J.J. PARKINS e N.S. RITCHIE. 1974. The voluntary intake and digestibility of oat straw by pregnant cows as influenced by urea and phosphorus supplementation contained in molasses sugar-beet pulp. *J. Agric. Sci.*, London, 82, Parte 3: 427-432.
- FISKE, C.H. e Y. SUBBAROW. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 66(2): 375-400.
- FONNESBECK, P.V.; L.E. HARRIS e C.W. COOK. 1970. Influence of protein and phosphorus on the composition of the rumen ingesta of sheep. *J. Anim. Sci.*, New York, 30(2): 283-290.
- GALLUP, W.D. e H.M. BRIGGS. 1950. The minimum phosphorus requirement of lambs for phosphorus equilibrium. *J. Anim. Sci.*, New York, 9(3): 426-430.

HALL, O.G.; H.D. BAXTER e C.S. HOBBS. 1961. Effect of phosphorus in different chemical forms on "*in vitro*" cellulose digestion by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.*, New York, 20(4): 817-819.

HARMEYER, H.; H. HÖLLER; H. MARTENS e C. von GRABE. 1975. Estimate of microbial protein synthesis "*in vitro*" by the simultaneous use of three different isotopic markers. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants II*. (Proc. Research Co-ordination Meeting and Panel, Vienna 1974), Vienna. p. 69-80.

HAYS, V.M. e M.J. SWENSON. 1970. Minerals. In: SWENSON, M.J. *Duke's Physiology of Domestic Animals*. 8^a Ed. Ithaca e London. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Cap. 33 p. 663-690.

HOAR, D.W.; R.J. EMERICK e L.B. EMBRY. 1970. Potassium, phosphorus and calcium interrelationships influencing feedlot performance and phosphatic urolithiasis in lambs. *J. Anim. Sci.*, New York, 30(4): 597-600.

HUFFMAN, C.F.; C.S. ROBINSON; C.W. DUNCAN; L.W. LAMB e M.F. MASON. 1933. A study of phosphorus requirement of dairy cattle. I. Phosphorus requirement for growth and reproduction from three months of age to first calving. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 16(3): 203-223.

HUNGATE, R.E. 1966. *The rumen and its microbes* New York, Academic Press, Cap.8, p. 331-352.

IRVING, J.T. 1964. Dynamics and function of phosphorus. In: COMAR, C.L. e C.F. BRONNER. *Mineral Metabolism*. New York, Academic Press, V.2 parte A, Cap.18, p.249-313.

KAY, R.N.B. 1960. The rate of flow and composition of various secretions in sheep and calves. *J. Physiol.*, London, 150:515-537.

KEITH, T.B.; H. MELENDY e R.F. JOHNSON. 1955. The performance of the pregnant and lactating ewe as affected by phosphorus sources and quantity. *Idaho Agric. Exp. Stat. Res. Bull.* n° 29. pp.22. In: *NUTR. ABSTR. REV.* 27(12): 577, 1957.

KLICENKO, G.T. 1969. Some properties of rumen contents of cows given different P supplements. *In*: *NUTR. ABSTR. REV.* 41(1): 261, 1971.

LEIBHOLZ, J. 1974. The flow of calcium and phosphorus in the digestive tract of sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 25(1):147-154.

LUEKER, C.E. e G.P. LOFGREEN. 1961. Effects of intake and calcium to phosphorus ratio on absorption of these elements by sheep. *J. Nutr.*, Philadelphia, 74(3):233-238.

- MAYNARD, L.A. e J.K. LOOSLI. 1969. *Animal nutrition*. 6a. Ed., Bombay - New Delhi, Mc Graw Hill Publishing Company Ltd., Cap. 8, p. 154-228.
- McMENIMAN, N.P. 1973. The toxic effect of some phosphate supplements fed to sheep. *Aust.Vet.J.* Artarmon, 49(3): 150-152.
- MOODIE, E.W. 1975. Mineral metabolism In: BLUNT, M.H. *The blood of sheep: composition and function*. Berlin. Springer Verlag, p. 63-99.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1975. *Nutrient requirements of sheep*. 5a. ed. Washington - National Academy of Sciences. 72 p. (Nutrient Requirements of Domestic Animals, n° 5).
- NIKOLIĆ, J.A. 1976. Some aspects of nitrogen metabolism in the bovine rumen. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Nuclear Techniques in Animal Production and Health* (Proc. Symp. Vienna, 1976). Vienna. p. 301-308.
- PARTHASARATHY, D., G.A. GARTON e A.T. PHILLIPSON. 1952. The passage of phosphorus across the rumen epithelium of sheep. *Biochem. J.*, London, 52(4); xvi-xvii.
- PHILLIPSON, A.T. 1970. Ruminant digestion. In: SWENSON. M.J. *Duke's physiology of domestic animals*. 8a. ed. Ithaca e London. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Cap. 22, p. 424-483

POPPI, D.P. e J.H. TERNOUTH. 1979. Secretion and absorption of phosphorus in the gastrointestinal tract of sheep fed on four diets. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 30(3): 503-512.

PRESTON, R.L. e W.H. PFANDER. 1964. Phosphorus metabolism in lambs fed varying phosphorus intake. *J. Nutr.*, Philadelphia, 83(4):369-378.

SMITH, A.H., M. KLEIBER, A.L. BLACK e C.F. BAXTER. 1955. Transfer of phosphate in the digestive tract. II- Sheep *J. Nutr.*, Philadelphia, 57(4):507-526.

SWENSON, M.J. 1970. *Duke's physiology of domestics animals*. 8a. ed. Ithaca e London. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. 1463p.

THEILER, A., H.H. GREEN e P.J. DU TOIT. 1928. Studies in mineral metabolism. III- Breeding of cattle on phosphorus deficient pasture. *J. Agric. Sci.*, London, 18(3):369-371.

THOMPSON Jr., W.R. 1978. Phosphorus in animal nutrition. In: *Phosphorus for Agriculture: a situation analysis*. Atlanta, Potash/Phosphate Institute, p.126-158.

TOMAS, F.M. e M. SOMERS. 1974. Phosphorus homeostasis in sheep. I- Effects of ligation of parotid salivary ducts *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 25(3):475-483.

TOMAS, F.M.; R.J. MOIR e M. SOMERS. 1967. Phosphorus turnover in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 18(4): 635-645.

TOWNS, K.M., R.C. BOSTON e D.D. LEAVER. 1978. The effect of intravenous administration of phosphorus on phosphorus and calcium metabolism in sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 29(3): 587-593.

UNDERWOOD, E.J. 1969. *Los minerales en la alimentación del ganado*. Trad. P. Ducar Maluenda. Zaragoza. Acribia. 320 p.

VAN NEVEL, C.J. e D.I. DEMEYER, 1973. Determination of microbial cells synthesis in the rumen "*in vitro*" by measurement of ^{32}P labelled phosphate incorporation. *Annual Meeting of the European Society of Nuclear Methods in Agriculture* (ESNA). Louvain, Belgium.

VAN NEVEL, C.J. e D.I. DEMEYER. 1977. Determination of rumen microbial growth "*in vitro*" from ^{32}P - labelled (phosphate incorporation. *Br. J. Nutr.*, London, 38(1): 101-114.

VAN NEVEL, C.J., D.I. DEMEYER e W.J. MAENG. 1976. Problems in estimating rumen microbial growth from phosphorus-32 incorporation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Nuclear Techniques in Animal Production and Health* (Proc. Symp. Vienna, 1976). Vienna. p. 309-317.

VIPPERMAN, P.E., R.L. PRESTON, L.D. KINTNER e W.D. PFANDER.

1969. Role of calcium in the nutritional aetiology of a metabolic disorder in ruminants fed a high grain ration. *J. Nutr.*, Maryland, 97(4):449-462.

WALKER, D.J., A.R. EGAN, C.J. NADER, M.J. ULYATT e G.B. STORER

1975. Rumen microbial protein synthesis and proportions of microbial and non-microbial nitrogen flowing to the intestines of sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 26(5):699-708.

WALKER, D.J. e C.J. NADER. 1975. Measurement "*in vivo*" of rumen microbial protein synthesis. *Aust. J. Agric. Res.*, Melbourne, 26(5):689-698.

WISE, M.B., S.E. SMITH e L.L. BARNES. 1958. The phosphorus requirement of calves. *J. Anim. Sci.*, New York, 17(1): 89-99.