



Acta Scientiarum. Animal Sciences

ISSN: 1806-2636

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá  
Brasil

Moura Alves, Evanilton; dos Santos Pedreira, Márcio; Albuquerque Pereira, Mara Lúcia; Presidio Almeida, Paulo José; Gonsalves Neto, João; Ribeiro Freire, Leile Daiane  
Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais  
Acta Scientiarum. Animal Sciences, vol. 34, núm. 3, julio-septiembre, 2012, pp. 287-295  
Universidade Estadual de Maringá  
.png, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126511009>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



## Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais

Evanilton Moura Alves<sup>1\*</sup>, Márcio dos Santos Pedreira<sup>2</sup>, Mara Lúcia Albuquerque Pereira<sup>2</sup>, Paulo José Presidio Almeida<sup>2</sup>, João Gonsalves Neto<sup>2</sup> e Leile Daiane Ribeiro Freire<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Baiano, Campus Guanambi, Zona Rural, 46430-000, Distrito de Ceraíma, Guanambi, Bahia, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: [alveszootec@gmail.com](mailto:alveszootec@gmail.com)

**RESUMO.** Objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos da inclusão de ureia em dietas contendo farelo da vagem de algaroba sobre o balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais em ovinos. Foram utilizados oito animais, machos castrados, com peso médio de 33,5 kg, distribuídos em dois quadrados latinos 4 x 4. Os tratamentos constituíram da inclusão de níveis de ureia na dieta, sendo: 0; 0,5; 1,0 e 1,5% da MS total. A dieta foi fornecida como dieta total na relação volumoso:concentrado de 40:60 com base na MS total da dieta. Foi realizada a coleta total de urina e fezes e determinada a excreção de nitrogênio. Foi coletado sangue, seguido com a extração do plasma e determinação do N-ureico. Para avaliação do pH e N-amoniaco no líquido ruminal foram utilizados quatro animais fistulados no rúmen. A ingestão de N (31,68 g dia<sup>-1</sup>) e perdas vias fecal (7,94 g dia<sup>-1</sup>) e urinária (9,95 g dia<sup>-1</sup>) não sofreram alterações. As concentrações de N-amoniaco e N-ureico no plasma aumentaram de forma linear. O pH ruminal foi semelhante entre os tratamentos. A inclusão de ureia não influencia o balanço de nitrogênio, porém eleva as concentrações de N-amoniaco no rúmen e N-ureico no plasma podendo influenciar o gasto de energia no organismo.

**Palavras-chave:** alimento alternativo, confinamento, metabolismo, nitrogênio não-proteico, pequenos ruminantes.

## Mesquite pod meal associated with levels of urea on feeding sheep: nitrogen balance, plasma urea-N and ruminal parameters

**ABSTRACT.** The goal of this study was to evaluate the effects of including urea in diets containing mesquite pod meal on nitrogen balance, plasma urea-N and ruminal parameters. Eight gelded males, with mean weight of 33.5 kg, were divided into two 4 x 4 Latin squares. Treatments consisted of following urea levels in diet: 0, 0.5, 1.0 and 1.5% of total dry matter. The diet was provided as total diet a 40:60 forage: concentrate ratio based on total diet DM. Total urine and feces were collected and nitrogen excretion was determined. Blood was collected, followed by plasma extraction and quantification of urea nitrogen. To evaluate pH and ammonia-N in rumen fluid, four rumen fistulated animals were used. Intake of N (31.68 g day<sup>-1</sup>) and losses through feces (7.94 g day<sup>-1</sup>) and urine (9.95 g day<sup>-1</sup>) did not change. The concentrations of ammonia-N and plasma urea-N increased linearly. Rumen pH was similar among treatments. The inclusion of urea does not influence the nitrogen balance, but increases the concentrations of rumen ammonia-N and urea nitrogen in plasma, which may influence energy expenditure in the body.

**Keywords:** alternative feed, confinement, metabolism, non-protein nitrogen, small ruminants.

### Introdução

A alimentação racional dos animais domésticos visa fornecer os nutrientes capazes de manter e assegurar as exigências de manutenção e o nível de produção pretendido. A proteína tem sido um dos nutrientes mais pesquisados na nutrição de ruminantes, sendo que, em razão de sua natureza diversificada, a ela têm sido atribuídos ganhos diferenciados no desempenho

animal, bem como a possibilidade da melhor extração de energia das porções fibrosas dos alimentos volumosos pelo atendimento das demandas microbianas por nitrogênio.

Mediante o grande volume de informações resultante das pesquisas, não somente acerca da proteína, mas também relacionadas à nutrição energética de animais ruminantes, propostas de

sistemas de alimentação têm sido formuladas e a característica que estes sistemas têm em comum é que os difere das propostas voltadas para outras espécies animais reside na íntima relação entre a energia e a proteína na predição do rendimento microbiano a partir da ingestão de nitrogênio degradável e da matéria orgânica fermentável no rúmen.

Pesquisadores (CALDAS NETO et al., 2007, 2008; FREGADOLLI et al., 2001; PRADO et al., 2004; ZEOULA et al., 2006) têm buscado associar a velocidade de liberação do N oriundo da ureia e energia das fontes de carboidratos, buscando maior eficiência microbiana no aproveitamento desses nutrientes, com aumento no fluxo de proteína microbiana para o intestino e, conseqüentemente, redução da necessidade de fontes proteicas verdadeiras.

A degradação dos nutrientes é determinada pela competição entre a taxa de degradação e passagem, e o conhecimento de ambas é necessário para estimar as quantidades de energia e de compostos nitrogenados disponíveis no rúmen (RUSSEL et al., 1992). Quando a taxa de degradação de proteína excede a de carboidratos, grandes quantidades de nitrogênio podem ser perdidas.

A eficiência de utilização do N proveniente de compostos nitrogenados não-proteicos (como a ureia) pelos microrganismos do rúmen depende de uma série de fatores, dentre eles a perfeita sincronização entre a liberação de amônia, decorrente da hidrólise da ureia, e presença de energia para síntese de proteína microbiana.

A hidrólise da ureia é extremamente rápida, o que pode facultar a perda de N através da urina, que além de representar prejuízo econômico, aumenta a contaminação ambiental pela maior excreção deste elemento. Por estas razões, a adequação das fontes de proteína e energia nas rações animais pode contribuir com a otimização da utilização do nitrogênio, permitindo maior economicidade nos sistemas de produção.

A amônia formada no rúmen quando não é capturada pelos microrganismos ruminais para a síntese proteica é absorvida por meio da parede ruminal e levada pela corrente sanguínea até o fígado, onde é convertida novamente em ureia por meio do processo conhecido como “ciclo da ureia” (RUSSEL et al., 1992). Este processo de reconversão de amônia em ureia no fígado é oneroso ao organismo, custando média de 12 kcal g<sup>-1</sup> de nitrogênio (VAN SOEST, 1994). Parte dessa ureia retorna ao rúmen por intermédio da saliva ou epitélio ruminal e a outra parte vai para os rins, sendo excretada na urina.

As concentrações de ureia plasmática têm sido utilizadas para monitorar o consumo de proteína dietética (teor e degradabilidade ruminal) próximo às exigências, já que o consumo excessivo de proteína pode afetar o desempenho reprodutivo do animal, aumentando sua exigência em energia, ou ainda, o custo da ração (BRODERICK; CLAYTON, 1997). Assim, é importante avaliar a ureia sanguínea quando se utilizam fontes nitrogenadas com diferentes degradabilidades ruminais.

Nesse sentido, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de ureia na dieta sobre o balanço de compostos nitrogenados, parâmetros ruminais e concentrações de N-ureico no plasma de ovinos.

### Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Ovinocaprinocultura, do Departamento de Tecnologia Rural e Animal – DTRA, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga, localizada a 15°09'07" de latitude Sul, 40°15'32" de longitude Oeste, precipitação média anual de 800 mm, temperatura média anual de 27°C e com altitude média de 268 m.

Foram utilizados oito ovinos da raça Santa Inês, machos castrados, com peso corporal médio de 33,5 kg e idade de cinco meses, ao início do experimento. Os animais foram vermifugados e confinados em gaiolas metálicas metabólicas de 1,0 x 0,80 m (0,80 m<sup>2</sup>) com piso ripado, com acesso a comedouros e bebedouros individuais, distribuídos em dois quadrados latinos (QL) 4 x 4 balanceados, de forma que cada tratamento precedesse o outro no mesmo número de vezes. O experimento teve duração de 91 dias, sendo sete dias iniciais destinados à adaptação dos animais às instalações e manejo e quatro períodos de 21 dias, dos quais seis dias foram para adaptação à mudança nos teores de ureia, oito dias para adaptação às dietas e sete dias para coleta de dados.

A dieta foi fornecida como dieta total com relação volumoso:concentrado de 40:60 com base na MS (matéria seca) do feno de capim *Tifton* 85 e do concentrado. O farelo de vagem de algaroba (FVA) foi o principal ingrediente do concentrado, compondo 50%, o que representou 30% na MS total da dieta. As dietas foram formuladas para serem isoproteicas (12% PB), para os seguintes tratamentos: 0; 0,5; 1,0 e 1,5% de ureia com base na MS da dieta total.

Ao início de cada período, foram realizadas coletas de amostras do concentrado e do feno para determinação da MS e manutenção das proporções dos alimentos nas dietas. As amostras dos alimentos

oferecidos e sobras foram colhidas do 15º ao 21º dia de cada período experimental formando amostras compostas, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer com temperatura a -10°C. Ao término do período de coletas, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas, em seguida foi realizada a pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h, sendo trituradas em moinho de facas dotado de peneiras de crivo 1 mm de diâmetro. As avaliações bromatológicas das dietas experimentais, do farelo da vagem de algaroba e do feno de capim *Tifton 85* foram feitas conforme metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). Na Tabela 1 está exposta a composição química do feno, FVA e concentrados, enquanto na Tabela 2 encontra-se a proporção dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais.

**Tabela 1.** Composição química dos alimentos e concentrados.

Item	FVA	FT-85	Concentrados			
			Nível de ureia na MS da dieta (%)			
			0,0	0,5	1,0	1,5
MS (%)	92,97	88,41	88,32	88,07	87,59	87,15
MO (% MS)	96,56	94,97	95,45	95,60	96,11	96,17
PB (% MS)	9,09	8,02	15,04	15,33	15,10	15,35
NIDN (% N-total)	22,15	35,26	14,87	15,06	15,25	15,44
PIDN (%MS)	2,01	2,83	2,24	2,31	2,30	2,37
EE (% MS)	0,87	1,66	2,22	2,26	2,16	2,26
CHOT (% MS)	86,60	84,29	78,19	78,00	78,84	78,56
FDN (% MS)	33,02	80,36	24,65	24,24	24,05	23,75
FDNcp (% MS)	28,17	73,61	19,79	19,26	18,87	18,71
FDA (% MS)	20,43	40,29	13,15	12,76	13,03	12,50
CNF (% MS)	58,43	10,68	58,40	61,67	65,86	68,67
LIG (% MS)	6,45	6,28	3,99	3,90	3,78	3,75
MM (% MS)	3,44	6,03	4,55	4,40	3,89	3,83

FVA: farelo da vagem de algaroba; FT-85: feno do capim *Tifton 85*; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; NIDN: nitrogênio indigestível em detergente neutro; PIDN: proteína indigestível em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CHOT: carboidratos totais; FDN: fibra em detergente neutro; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidratos não-fibrosos; LIG: lignina; MM: matéria mineral.

A ração foi distribuída duas vezes ao dia, pela manhã, às 7h, e à tarde, às 16h, com água disponível todo o tempo. A quantidade de alimento oferecida foi reajustada conforme o consumo do dia anterior, permitindo uma disponibilidade de 10% de sobras como margem de segurança. Diariamente, foi registrada a quantidade de ração oferecida e as sobras foram retiradas e pesadas, objetivando avaliar o consumo médio diário. O consumo de MS e FDN (kg 24h<sup>-1</sup>) foram calculados pelas fórmulas:

$$\text{CMS} = (\text{MNo} \times \text{MS}) - (\text{sMN} \times \text{MSs})$$

$$\text{CFDN} = (\text{MSo} \times \text{FDN}) - (\text{sMS} \times \text{FDNs})$$

em que:

CMS = consumo de MS (kg 24h<sup>-1</sup>);  
MNo = Matéria natural oferecida (kg);  
MS = MS da dieta (%);  
sMN = sobras de matéria natural (kg);

MSs = MS das sobras (%);  
CFDN = consumo de FDN (kg 24h<sup>-1</sup>);  
MSo = MS oferecida (g);  
FDN = FDN da dieta (%MS);  
FDNs = FDN das sobras (% MS).

**Tabela 2.** Composição das rações experimentais (% MS).

Alimento (%)	Nível de ureia na MS da dieta (%)			
	0,0	0,5	1,0	1,5
Farelo da vagem de algaroba	30,00	30,00	30,00	30,00
Milho moído	18,5	21,5	24,5	27,5
Farelo de soja	10,50	7,00	3,50	0,00
Ureia	0,00	0,50	1,00	1,50
Mistura mineral	1,00	1,00	1,00	1,00
Feno <i>Tifton-85</i>	40,00	40,00	40,00	40,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição química				
MS (%)	88,36	88,21	87,92	87,66
MO (% MS)	94,86	94,94	95,25	95,29
PB (% MS)	12,23	12,41	12,27	12,42
NIDN (% N-total)	23,02	23,14	23,25	23,37
PIDN (%MS)	2,48	2,52	2,51	2,55
EE (% MS)	2,00	2,02	1,96	2,02
CHOT (% MS)	80,63	80,52	81,02	80,35
FDN (% MS)	46,94	46,69	46,57	46,39
FDNcp (% MS)	41,32	41,00	40,77	40,67
FDA (% MS)	24,01	23,77	23,93	23,61
CNF (% MS)	39,31	41,28	43,79	45,48
NDT <sub>obs</sub> (% MS)	69,32	71,47	69,17	74,68
LIG (% MS)	4,91	4,85	4,78	4,76
MM (% MS)	5,14	5,06	4,75	4,71

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; NIDN: nitrogênio indigestível em detergente neutro; PIDN: proteína indigestível em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CHOT: carboidratos totais; FDN: fibra em detergente neutro; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidratos não-fibrosos; NDT<sub>obs</sub> = NDT observado; LIG: lignina; MM: matéria mineral.

Os teores de carboidratos totais (CHOT) foram calculados segundo a equação proposta por Sniffen et al. (1992).

$$\text{CHOT} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{MM});$$

em que:

CHOT = carboidratos totais (%MS);  
EE = teor de EE (%MS);  
PB = teor de PB (%MS);  
MM = teor de MM (%MS).

Os teores de CNF nas amostras de alimentos, sobras e fezes foram avaliados por meio da equação proposta por Hall (2000). No caso das dietas nas quais se utilizou ureia como fonte de compostos nitrogenados não-proteicos, os teores dietéticos de CNF foram estimados por adaptação à proposição pelo mesmo autor:

$$\begin{aligned} \text{CNF} &= 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{MM} + \text{FDNcp}) \\ \text{CNF} &= 100 - [(\text{PB} - \text{PBu} + \text{U}) + \text{EE} + \text{MM} + \text{FDNcp}]; \end{aligned}$$

em que:

CNF = teor estimado de CNF (%MS);  
PB = teor de PB (%MS);

EE = teor de EE (%MS);

MM = teor de MM (%MS);

FDN<sub>c</sub>p = teor de FDN corrigido para cinzas e proteína (%MS);

PBu = teor de PB proveniente da ureia (%MS);

U = teor de ureia (%MS).

O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) observados foi obtido a partir da equação somativa:

$$\text{NDT} = \text{PBD} + (2,25 \times \text{EED}) + \text{FDN}_{\text{c}}\text{pD} + \text{CNFD};$$

em que:

PBD = proteína bruta digestível;

EED = extrato etéreo digestível;

FDN<sub>c</sub>pD = fibra em detergente neutro (corrigida para cinzas e proteína) digestível;

CNFD = carboidratos não-fibrosos digestíveis.

Para determinar o nitrogênio na urina, foi adotado o método de coleta total, em que baldes plásticos cobertos com telas foram utilizados, buscando evitar a contaminação com pelos, ração e fezes. A cada balde foram adicionados 100 mL de HCl (concentração de 20%) para evitar a volatilização de N e possível fermentação. A coleta de urina foi realizada durante cinco dias sempre no mesmo horário, pela tarde, e diariamente o volume total foi medido. Amostras de 10% do total foram acondicionadas em um único frasco plástico, devidamente identificado por animal, em cada período experimental (amostra composta). Os frascos foram armazenados em *freezer* com temperatura a -10°C, para posterior análise. O teor de nitrogênio total na urina foi medido pelo método Kjeldahl, seguindo os procedimentos descritos por Silva e Queiroz (2002). O balanço de nitrogênio foi calculado pela fórmula:

$$\text{BN} = \text{Ning} - \text{Nfecal} - \text{Nurinário}$$

em que:

BN = balanço de nitrogênio (g);

Ning = nitrogênio ingerido (g);

Nfecal = nitrogênio excretado nas fezes (g);

Nurinário = nitrogênio excretado na urina (g).

Para determinar o N-ureico no plasma, procedeu-se a coleta de sangue, sendo realizada por punção da veia jugular no dia seguinte após o final do período de coleta de urina. O sangue com EDTA – etilenodiaminotetracético (anticoagulante) foi imediatamente centrifugado a 2.000 rpm por 15 min., obtendo-se o plasma, que foi armazenado em *freezer* com temperatura a -10°C. Ao final do experimento, o plasma foi descongelado à

temperatura ambiente e analisado para determinação de ureia, utilizando *kits* comerciais (Labtest). A concentração de N-ureico plasmático foi obtida por meio do produto da concentração de ureia no plasma por 0,466, correspondente ao teor de N na ureia.

Para avaliação dos parâmetros ruminais, foi realizado de forma paralela um segundo experimento com duração de 91 dias, sendo sete para adaptação às instalações e ao manejo e quatro períodos de 21 dias cada. Foram utilizados quatro animais adultos com peso médio de 46 kg fistulados no rúmen para coleta de líquido ruminal, os quais receberam as mesmas dietas que os animais do Experimento 1, passando por um período de seis dias para adaptação às mudanças nos níveis de ureia, 14 dias para adaptação às dietas, sendo realizada a colheita do líquido ruminal no 21º experimental em cinco tempos pré-estabelecidos (zero, 2, 4, 6 e 8h pós-prandial). Foram coletados aproximadamente 400 mL de líquido ruminal, em seguida, realizou-se a filtração do mesmo, utilizando uma camada de gazes. O pH foi medido imediatamente após a coleta, usando-se um *peagâmetro* digital e, posteriormente, 50 mL de líquido ruminal foram acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico (1:1) e armazenados a -10°C para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) ruminal.

Para medir a concentração de N-NH<sub>3</sub>, as amostras de líquido ruminal foram centrifugadas a 500 rpm, sendo em seguida destiladas em destilador de N. O nitrogênio destilado foi recebido em um *erlenmeyer* contendo 10 mL de solução receptora, cessando o processo ao atingir 50 mL (solução receptora + N destilado); em seguida, foi realizada a titulação com ácido clorídrico - HCl (0,005 N). No processo de destilação, foi utilizado hidróxido de potássio (KOH - 0,2 N) e ácido bórico (2%) como indicador misto de cor como solução receptora (vermelho de metila + verde de bromocresol). Foram utilizados para destilação do líquido ruminal: 2 mL da amostra, 5 mL de KOH, 13 mL de água destilada e 10 mL da solução receptora.

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando-se o programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (RIBEIRO JUNIOR, 2001) versão 9.1. Os resultados foram interpretados estatisticamente por análise de variância e regressão, adotando-se o nível de 5% de significância, após serem calculados os erros e testada a normalidade.

## Resultados e discussão

Os resultados obtidos para nitrogênio (N) ingerido e excretado na urina e nas fezes, bem como o balanço de N e N-ureico no plasma, estão apresentados na Tabela 3. A ingestão de N não foi influenciada pela inclusão de ureia nas dietas, observando-se valor médio de 31,68 g dia<sup>-1</sup>. Embora os teores de ureia nas dietas experimentais tenham sido crescente, estas dietas foram isoproteicas, o que pode explicar esses resultados.

**Tabela 3.** Médias dos consumos de nitrogênio (N), N excretado na urina e fezes, balanço de N e N-ureico no plasma, em função dos níveis crescentes de ureia na dieta.

Itens	Nível de ureia na MS da dieta (%)				Regressão	CV %
	0,0	0,5	1,0	1,5		
N-ingerido						
g dia <sup>-1</sup>	27,44	27,13	25,64	26,30	$\hat{Y} = 26,63$	9,04
g kg <sup>-1</sup> PC <sup>0,75</sup>	1,79	1,77	1,69	1,72	$\hat{Y} = 1,74$	12,96
N-urinário						
(g dia <sup>-1</sup> )	9,90	9,40	9,51	10,99	$\hat{Y} = 9,95$	25,39
% NI	36,08	35,30	37,41	41,82	$\hat{Y} = 37,65$	25,30
g kg <sup>-1</sup> PC <sup>0,75</sup>	0,64	0,61	0,62	0,72	$\hat{Y} = 0,65$	25,25
N-fecal						
(g dia <sup>-1</sup> )	8,07	7,74	8,07	7,87	$\hat{Y} = 7,94$	23,17
% NI	29,36	28,47	31,43	29,64	$\hat{Y} = 29,72$	19,36
g kg <sup>-1</sup> PC <sup>0,75</sup>	0,53	0,51	0,53	0,51	$\hat{Y} = 0,52$	23,97
BN						
(g dia <sup>-1</sup> )	9,47	9,99	8,07	7,44	$\hat{Y} = 8,74$	33,93
% NI	34,57	36,24	31,16	28,54	$\hat{Y} = 32,63$	30,90
g kg <sup>-1</sup> PC <sup>0,75</sup>	0,62	0,66	0,54	0,48	$\hat{Y} = 0,58$	36,51
N-ureico no plasma						
mg dL <sup>-1</sup>	15,13	16,90	22,37	23,65	★★	30,85

\*\* =  $p < 0,05$ ;  $y = 14,86 + 6,21x$ ; sendo  $x$  a % de ureia na dieta;  $R^2 = 0,94$ ; CV = coeficiente de variação; PC<sup>0,75</sup> = peso corporal metabólico.

Zeoula et al. (2003) não observaram diferença na quantidade de nitrogênio ingerida por ovinos, sendo as dietas isoproteicas e a fonte de PB o farelo de soja. Da mesma forma, Zeoula et al. (2006), avaliando níveis crescentes de PDR e de ureia, com mesmo teor de PB na dieta em ovinos, não observaram diferenças no consumo de N.

Mouro et al. (2007), trabalhando com ovinos, utilizaram na composição das dietas diferentes fontes proteicas (farelo de soja, farelo de algodão e ureia) em diferentes proporções e não observaram diferença na ingestão de nitrogênio, uma vez que as dietas foram isoproteicas. Em termos comparativos, o valor médio de N ingerido (1,74 g kg<sup>-0,75</sup>) obtido neste trabalho foi superior ao observado (1,4 g kg<sup>-0,75</sup>) por Zeoula et al. (2003), provavelmente pelo maior teor de PB na dieta, 12,3% e 10,9% PB, respectivamente. Entende-se, portanto, o que influencia a quantidade de nitrogênio ingerido não são as fontes e sim a composição proteica da dieta.

As perdas de nitrogênio (N) pelas vias urinária e fecal não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre as dietas, com valores médios de 9,95 e 7,94 g dia<sup>-1</sup>; 37,65 e 29,72% do nitrogênio ingerido (NI) e 0,65 e 0,52 g kg<sup>-1</sup> de peso metabólico, respectivamente. Percebe-se que a

excreção do N via urinária foi superior à excreção nas fezes. Segundo Lavezzo et al. (1996), a relação entre o nitrogênio excretado via fezes e urina varia em função do teor de N da dieta. Estes autores observaram maior excreção de N via urinária em relação à excreção fecal (52,3% vs 24,4% do NI), ao fornecer fontes de N proteico (farelo de soja) e N não-proteico (ureia) em rações com 15,4% de proteína bruta (PB) para ovinos. Da mesma forma, Zeoula et al. (2006) avaliando o balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas contendo 14,7% de PB e níveis crescentes de proteína degradável no rúmen e ureia verificaram que a excreção do N via urinária foi superior à excreção nas fezes (35,70 vs 20,36% do NI).

Segundo Van Soest (1994), a quantidade de N-urinário está relacionada com o teor de PB da dieta, podendo ocorrer maior excreção de ureia na urina, quando ocorre aumento na ingestão de nitrogênio, uma vez que esse comportamento está associado a uma maior produção de ureia no fígado, enquanto a baixa ingestão de N conduz a uma redução na excreção de ureia na urina para manutenção do pool de ureia plasmático, que está sob controle fisiológico homeostático. As dietas utilizadas nesta pesquisa foram isoproteicas e não influenciaram o consumo de N, isso explica a não-variação da quantidade de N perdido via urina.

Avaliando dietas isoproteicas, Zeoula et al. (2003, 2006) não observaram diferença nas perdas de N pela urina. No presente trabalho, o nitrogênio perdido na urina em % do N-ingerido (37,65%) foi superior ao encontrado por Zeoula et al. (2003), de 30,9%, diferença que pode ser explicada pelo maior teor de PB na dieta 12,3% versus 10,9%, respectivamente. Cavalcante et al. (2006) observaram efeito linear crescente para o consumo de N e perdas de N pela urina em bovinos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de PB. Contudo, Zeoula et al. (2003) forneceram a ovinos rações com 10,9% de PB contendo diferentes teores de farinha de varredura de mandioca em substituição ao milho e farelo de soja como fonte de proteína e verificaram menor excreção de N via urinária (30,9% do NI) em relação à excreção fecal (35,2% do NI).

A inclusão de ureia na dieta não influenciou ( $p > 0,05$ ) o balanço de nitrogênio (BN), com média de 8,74 g dia<sup>-1</sup>, correspondente a 32,63% do N-ingerido e 0,58 g kg<sup>-0,75</sup>. Segundo Kolb (1984), a determinação do BN é útil para avaliar se o animal se encontra em equilíbrio nitrogenado e se, sob determinadas condições alimentares, ocorre ganho ou perda de N. No presente trabalho observou-se que todos os tratamentos apresentaram BN positivo,

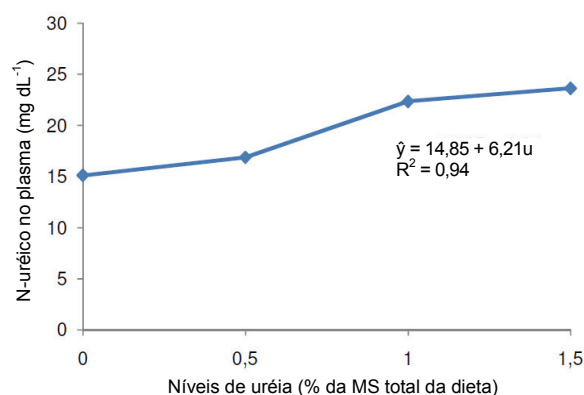
indicando que os animais estavam em condições alimentares de ganho de N.

O balanço de nitrogênio (BN) está correlacionado com a eficiência de utilização do N pelos microrganismos ruminais, sendo esta influenciada pelas fontes utilizadas de carboidratos e nitrogênio. No *Cornell Net Carbohydrate And Protein System (CNCPS)* é enfatizada a necessidade da sincronização na degradação de nitrogênio e carboidratos no rúmen, para que se obtenha a máxima eficiência de síntese de proteína microbiana, bem como a redução das perdas energéticas e nitrogenadas decorrentes da fermentação ruminal (SNIFFEN et al., 1992). Neste trabalho, uma das fontes de energia utilizada, o farelo de vagem de algaroba, rico em sacarose, classificados no CNCPS (SNIFFEN et al., 1992) como fonte de açúcar solúvel com energia prontamente disponível no rúmen pode ter levado a um certo tipo de interação com o nitrogênio não-proteico proveniente da ureia, evitando dessa forma aumento nas perdas de N via urinária com a inclusão desse último ingrediente.

As concentrações de nitrogênio ureico no plasma (NUP) (Tabela 3) aumentaram ( $p < 0,05$ ) de forma linear (Figura 1) em função dos níveis crescentes de ureia na dieta, sendo que para cada unidade percentual de ureia acrescentada na dieta poderá ocorrer um aumento de 6,21 mg de N-ureico  $\text{dL}^{-1}$  de plasma sanguíneo. Da mesma forma, Oliveira et al. (2001) verificaram efeito linear crescente nas concentrações de NUP (16,43 para 23,08  $\text{mg dL}^{-1}$ ), quando aumentaram os níveis de ureia na dieta. Todavia, Soares Cruz et al. (2006), avaliando os efeitos dos níveis crescentes de ureia no metabolismo de nitrogênio, não verificaram diferença nas concentrações de nitrogênio ureico no plasma ( $\hat{Y} = 14,62$ ).

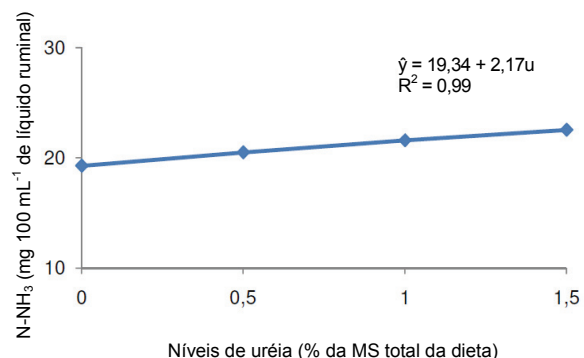
Aumento nas concentrações de nitrogênio ureico no plasma ocorreram paralelamente ao aumento da concentração de amônia no ambiente ruminal (Figura 2), pois quando em excesso não é aproveitada de forma eficiente pelos microrganismos ruminais, sendo absorvida pela parede do rúmen (NOLAN, 1993) e transportada através da corrente sanguínea até o fígado, onde entra no ciclo da ureia (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979; VISEK, 1979).

O nitrogênio ureico plasmático (NUP) não é bom indicador de consumo de nitrogênio, mas pode ser bom indicador do nitrogênio não utilizado, principalmente quando é de rápida liberação ruminal, como é o caso da ureia (STAPLES et al., 1993 apud OLIVEIRA JUNIOR et al., 2004). Isso reforça a hipótese de que os animais não estavam sendo capazes de utilizar boa parte do nitrogênio consumido, uma vez que os valores de NUP foram altos (maiores que 15  $\text{mg dL}^{-1}$ ; Tabela 3).



**Figura 1.** Concentrações médias de N-ureico no plasma ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) em função dos níveis de ureia na MS da dieta.

Comportamento semelhante foi observado por Oliveira et al. (2001), ao avaliarem a inclusão de níveis crescentes de ureia (0,0; 0,7; 1,4 e 2,1%) no concentrado, utilizado na proporção de 40% em dietas isoproteicas para vacas lactantes. Do mesmo modo, Rennó et al. (2008), avaliando dietas com níveis crescentes de ureia (0; 0,65; 1,30 e 1,95%), observaram que a concentração de N-ureico plasmático aumentou linearmente em função dos níveis de ureia. A explicação para tal comportamento é que, o aumento de nitrogênio não-proteico (NNP) em dietas isoproteicas parece diminuir a eficiência da utilização de amônia no rúmen, resultando em aumento da concentração de N-ureico no plasma.



**Figura 2.** Concentrações médias de nitrogênio amoniacal ( $\text{mg 100 mL}^{-1}$  de líquido ruminal) em função dos níveis de ureia na MS da dieta.

Valadares et al. (1997), utilizando novilhos zebus alimentados com rações contendo 45% de concentrado e teores de proteína bruta (PB) variando de 7,0 a 14,5%, verificaram, por meio de análise de regressão, que a faixa de concentração de N-ureico no plasma de 13,52 a 15,15  $\text{mg dL}^{-1}$  correspondeu à máxima eficiência microbiana, relatando que, provavelmente, representaria o limite a partir do qual estaria ocorrendo perda de

nitrogênio para esses animais. Percebe-se que os valores obtidos nas dietas com 0,5% (16,90 mg dL<sup>-1</sup>), 1% (22,37 mg dL<sup>-1</sup>) e 1,5% de ureia (23,65 mg dL<sup>-1</sup>) foram superiores aos citados, entretanto não foi observado diferença nas perdas de nitrogênio em relação ao tratamento controle, o qual se encontra na faixa indicada.

Na Tabela 4, encontram-se os valores da concentração de nitrogênio amoniacal observados em função do tempo e dos níveis de ureia na matéria seca (MS) da dieta. Verificou-se que os resultados obtidos para as concentrações de nitrogênio amoniacal do líquido de rúmen, mantiveram-se acima da concentração observada por Satter e Roffler (1975) que foi de 5 mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal, para que a mesma não limite o crescimento microbiano.

A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) do líquido de rúmen aumentou de forma linear (Figura 2) em função da inclusão de ureia na dieta, fato que pode ser explicado por dois fatores: 1º - grande quantidade de N liberada em pouco tempo, visto que a maior parte foi liberada 2h após a alimentação, impedindo que os microrganismos ruminais utilizassem esse N de forma eficiente, deixando escapar moléculas do elemento, resultando na formação de amônia; 2º - a velocidade da liberação de energia no rúmen não foi compatível com a liberação do nitrogênio (N), não havendo sincronização entre os mesmos.

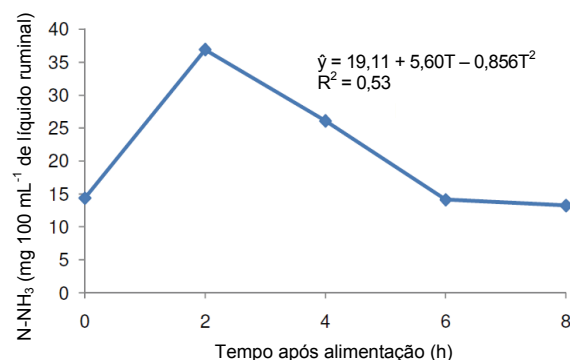
**Tabela 4.** Concentração de nitrogênio amoniacal – NNH<sub>3</sub> (mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal), em função do tempo após a alimentação e dos níveis de ureia na MS da dieta.

T (horas)	Níveis de ureia na MS da dieta (%)				Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	
0	16,77	12,77	13,68	14,34	14,39
2	25,98	36,30	42,10	43,31	36,92
4	24,92	26,61	26,35	26,56	26,11
6	12,76	15,07	14,23	14,51	14,14
8	15,96	11,70	11,55	13,92	13,28
Média	19,28	20,49	21,58	22,53	20,97

Coefficiente de variação (CV) = 17,46%.

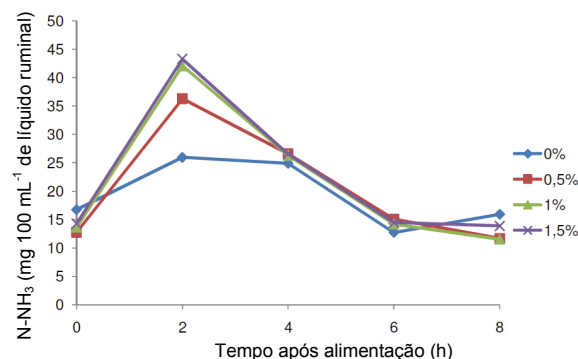
As concentrações média de N-NH<sub>3</sub> do líquido ruminal se comportaram de forma quadrática (Figura 3) em função do tempo após a alimentação, para todas as rações experimentais. A equação de regressão para a concentração N-NH<sub>3</sub>, em função do tempo (T), foi:  $N-NH_3 = 19,11 - 5,60T - 0,856T^2$ . A maior concentração de N-NH<sub>3</sub> foi de 36,92 mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal no tempo 2h após a alimentação, e a concentração mínima foi de 13,28 mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal às 8h após a alimentação, quantidade que não limita o desenvolvimento microbiano.

Verifica-se que estes resultados mostraram comportamento semelhante ao padrão observado na literatura (ASSIS et al., 2004; CALDAS NETO et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2006; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2004), que é quadrático, porém com as concentrações de máxima no tempo de 2h após a alimentação.



**Figura 3.** Concentrações médias de nitrogênio amoniacal (mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal) em função do tempo após a alimentação.

Na Figura 4, pode ser observado que a variação nas concentrações de N-NH<sub>3</sub> para os diferentes tratamentos ocorre apenas no tempo de 2h, mostrando-se bastante próximos nos demais tempos. Resultados semelhantes foram observados por Caldas Neto et al. (2008), avaliando níveis de proteína degradável no rúmen (PDR) com teores crescentes de ureia (0; 0,1; 0,3 e 0,9% na MS total da dieta) na alimentação de bovinos.



**Figura 4.** Concentrações de nitrogênio amoniacal (mg 100 mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal) em função do tempo após a alimentação e dos níveis de ureia na matéria seca (MS) da dieta.

Os valores de pH do líquido ruminal observados não diferiram ( $p > 0,05$ ) para os diferentes níveis de inclusão de ureia na dieta (0; 0,5; 1; e 1,5%), como mostra a Tabela 5. Comportamento semelhante ( $p > 0,05$ ) também foi observado para os valores de pH em relação aos diferentes tempos de coleta. O valor mínimo de pH (5,8) foi encontrado no



tempo de 2h após a alimentação e no tratamento sem ureia enquanto que o valor máximo foi 6h após a alimentação no nível de 1% de ureia. Segundo McCarthy Jr. et al. (1989), o pH abaixo de 6,2 prejudica a degradação da fibra.

**Tabela 5.** Valores de pH ruminal em função do tempo após a alimentação e dos níveis de ureia na MS total da dieta.

T (horas)	Níveis de ureia na MS da dieta (%)				Média
	0,0	0,5	1,0	1,5	
0	5,96	5,95	6,21	6,14	6,06
2	5,80	6,00	6,00	6,18	6,00
4	6,01	6,01	6,15	6,11	6,07
6	5,99	6,11	6,19	6,13	6,11
8	6,00	6,08	6,11	6,03	6,06
Média	5,95	6,03	6,13	6,12	6,06

Não foi observado diferença ( $p > 0,05$ ) no pH ruminal para os níveis de ureia (0, 0,5, 1 e 1,5%) e para os tempos de 0 a 8h. Coeficiente de variação (CV) = 3,33%.

Fatores nutricionais como os teores de fibra e carboidratos (principalmente amido) da dieta são os principais influenciadores do pH ruminal, uma vez que podem resultar na variação do tempo de ruminação (produção de saliva, tamponante que eleva o pH ruminal) e nos produtos resultantes da fermentação ruminal (ácidos graxos voláteis). Como neste trabalho, esses valores foram semelhantes, pode justificar a não-alteração do pH em função das diferentes dietas.

Em relação ao tempo, geralmente, valores mínimos são encontrados logo após a alimentação e valores máximos nos tempos mais distantes. Zeoula et al. (2003) observaram pH máximo antes da alimentação (0 hora, que é um tempo distante da alimentação) e mínimo entre 2 e 4h após à alimentação. Do mesmo modo, Assis et al. (2004) relataram pH máximo no tempo 0 hora e mínimo 4h após a alimentação.

## Conclusão

A inclusão de ureia até o nível de 1,5% da matéria seca da dieta, utilizando farelo da vagem de algaroba e milho como fonte de energia, aumenta de forma linear as concentrações de N-amoniaco no líquido ruminal e N-ureico no plasma; entretanto, não altera o balanço de nitrogênio, o qual foi positivo para todas as dietas testadas nessa pesquisa.

## Referências

ASSIS, A. J.; CAMPOS, J. M. S.; QUEIROZ, A. C.; VALADARES FILHO, S. C.; EUCLYDES, R. F.; LANA, R. P.; MAGALHÃES, A. L. R.; MENDES NETO, J.; MENDONÇA, S. S. Polpa cítrica em dietas de vacas em lactação. 2. digestibilidade dos nutrientes em dois períodos de coleta de fezes, pH e nitrogênio amoniacal do líquido ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 251-257, 2004.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical of animal and nutrition factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.

CALDAS NETO, S. F.; ZEOULA, L. M.; KAZAMA, R.; PRADO, I. N.; GERON, L. J. V.; OLIVEIRA, F. C. L.; PRADO, O. P. P. Proteína degradável no rúmen associada a fontes de amido de alta ou baixa degradabilidade: digestibilidade *in vitro* e desempenho de novilhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 452-460, 2007.

CALDAS NETO, S. F.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N.; BRANCO, A. F.; KAZAMA, R.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; FERRELI, F. Proteína degradável no rúmen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1094-1102, 2008.

CAVALCANTE, M. A. B.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; RIBEIRO, K. G.; PACHECO, L. B. B.; ARAÚJO, D.; LEMOS, V. M. C. Níveis de proteína bruta em dietas para bovinos de corte: parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 203-210, 2006.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. L. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livrocercos, 1979.

FREGADOLLI, F. L.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N.; BRANCO, A. F.; CALDAS NETO, S. F.; KASSIES, M. P.; DALPONTE, A. O. Efeito das fontes de amido e nitrogênio de diferentes degradabilidades ruminais. 1. Digestibilidades parcial e total. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 858-869, 2001.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates**. Nutritional relevance and analysis. Gainesville: University of Florida, 2000.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984.

LAVEZZO, O. E. N.; LAVEZZO, W.; BURINI, R. C. Efeitos nutricionais da substituição parcial do farelo de soja, em dietas de ovinos. Comparação da digestibilidade aparente e balanço de nitrogênio com a cinética do metabolismo da n-glicina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 2, p. 282-297, 1996.

MCCARTHY JR., R. D.; KLUSMEYER, T. H.; VICINI, J. L.; CLARK, J. H. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 8, p. 2002-2016, 1989.

MOURO, G. F.; BRANCO, A. F.; HARMON, D. L.; RIGOLON, L. P.; CONEGLIAN, S. M. Fontes de carboidratos e porcentagem de volumosos em dietas para ovinos: balanço de nitrogênio, digestibilidade e fluxo portal de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 489-498, 2007.

NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 2, p. 227-246, 1993.

- OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; RENNÓ, L. N.; QUEIROZ, A. C.; CHIZZOTTI, M. L. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629, 2001.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. C.; PIRES, A. V.; FERNANDES, J. J. R.; SUSIN, I.; SANTOS, F. A. P.; ARAÚJO, R. C. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a amônia ruminal, os parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 738-748, 2004.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; CALDAS NETO, S. F.; GERON, J. V.; FERRELI, F.; MAEDA, E.; OLIVEIRA, F. C. L.; KAZAMA, R. Digestibilidade dos nutrientes de rações com diferentes níveis de proteína degradável no rúmen e fonte de amido de alta degradabilidade ruminal em ovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 521-527, 2004.
- RENNÓ, L. N.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; LEÃO, M. I.; VALADARES, R. F. D.; RENNÓ, F. P.; PAIXÃO, M. L. Níveis de uréia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 556-562, 2008.
- RIBEIRO JUNIOR, J. I. **Análises Estatísticas no SAEG** (Sistema para Análises Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, 2001.
- RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.
- SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. 1. Development of a model for predicting nonprotein nitrogen utilization by cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 12, p. 1880-1888, 1975.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos** (Métodos químicos e biológicos). 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002.
- SOARES CRUZ, M. C.; VÉRAS, A. S. C.; FERREIRA, M. A.; BATISTA, A. M. V.; SANTOS, D. C.; COELHO, M. I. S. Balanço de nitrogênio e estimativas de perdas endógenas em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo palma forrageira e teores crescentes de ureia e mandioca. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 1, p. 47-56, 2006.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSEL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, 1992.
- VALADARES, R. F. D.; GONÇALVES, L. C.; SAMPAIO, I. B.; RODRIGUEZ, N. M.; COELHO DA SILVA, J. F. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 2. Consumo, digestibilidade e balanço de compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p. 1259-1263, 1997.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.
- VISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assessment. **Nutrition Reviews**, v. 37, n. 9, p. 273-282, 1979.
- ZEOULA, L. M.; CALDAS NETO, S. F.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; PRADO, I. N.; DIAN, P. H. M.; JORGE, J. R. V.; MARQUES, J. A. Substituição do milho pela farinha de varredura de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em rações de ovinos: consumo, digestibilidade, balanços de nitrogênio e energia e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 491-502, 2003.
- ZEOULA, L. M.; FERRELI, F.; PRADO, I. N.; GERON, L. J. V.; CALDAS NETO, S. F.; PRADO, O. P. P.; MAEDA, E. M. Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2179-2186, 2006.

Received on March 14, 2011.

Accepted on June 13, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.