



ARTIGO 262

ÁCIDO 2,6 – DIAMINOPIMÉLICO (DAPA) COMO INDICADOR MICROBIANO DE METABOLISMO ANIMAL

2,6 - Diaminopimelic (DAPA) as a microbial indicator of animal metabolism

Andressa Nathalie Nunes¹, Eloisa de Oliveira Simões Saliba², Andressa da Silva Formigoni¹, Ana Paula Liboreiro Brustolini¹

RESUMO: A busca por métodos de estimativa do valor nutricional tem sido alvo de inúmeras pesquisas na nutrição animal, uma vez que os ensaios são caros, laboriosos e relativamente longos. Os Indicadores são compostos de referência usados para monitorar aspectos químicos (como a hidrólise e síntese de compostos) e físicos da digestão (como a taxa de passagem), promovendo estimativas qualitativas ou quantitativas da fisiologia animal. A determinação da contribuição da síntese de proteína microbiana constitui uma importante área de estudo na nutrição animal, sendo que a estimativa desta no intestino está relacionada aos sistemas de avaliação de proteína. Um marcador microbiano pode ser usado para determinar a porção de nitrogênio (N) fecal que é de origem bacteriana, bem como o efeito da dieta sobre a síntese de (N) bacteriano nas fezes do animal e pode ter efeitos significativos sobre o teor de aminoácidos (AA).

Palavras-chave: aminoácido, digestibilidade, proteína microbiana

ABSTRACT: The search for methods to estimate the nutritional value has been the subject of numerous studies in animal nutrition since the tests are expensive, laborious and relatively long. The indicators are reference compounds used to monitor physical chemical aspects of digestion (as hydrolysis and synthesis of compounds) and (as the pass rate), providing qualitative or quantitative estimates of animal physiology. The determination of the contribution of microbial protein synthesis is an important area of study in animal nutrition, and that this estimate in the gut is related to systems for the evaluation of protein. A microbial marker can be used to determine the portion of nitrogen (N) is fecal bacterial origin as well as the effect of diet on the synthesis of (N) bacteria in the feces of the animal and can have significant effects on the amino acid content (AA).

Keywords: amino acid, digestibility, microbial protein

¹Doutoranda em Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. Email: natydressa2009@hotmail.com

²Professora do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG



INTRODUÇÃO

A determinação da contribuição da síntese de proteína microbiana constitui uma importante área de estudo na nutrição animal, sendo que a estimativa desta no intestino está relacionada aos sistemas de avaliação de proteína (Chen & Gomes, 1992). Pode-se usar um marcador microbiano para determinar a porção de nitrogênio (N) fecal que é de origem bacteriana, bem como o efeito da dieta sobre a síntese de (N) bacteriano nas fezes do animal.

A população microbiana do intestino grosso de animais não ruminantes pode ter efeitos significativos sobre o teor de aminoácidos (AA) e N das fezes (Low, 1980). Se um método adequado para quantificar a proteína microbiana nas fezes de animais é determinado, uma melhor avaliação da proteína e digestibilidade dos aminoácidos do alimento do animal pode ser realizada.

O ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) é um aminoácido que ocorre em concentrações variadas nas células bacterianas sendo sugerido como indicador por Synge (1953). Desde então, vem sendo utilizado em diversos experimentos para estimar a síntese de proteína microbiana em ruminantes. Segundo Hutton et al. (1971), a presença do DAPA nas células bacterianas e sua ausência em protozoários e plantas, determinaram seu uso como indicador da presença de nitrogênio (N) em ruminantes.

Estudos com suínos têm sido feitos para determinar o efeito do nível e da fonte de fibra oferecida à esses animais para avaliação da digestibilidade da proteína. Há uma escassez de informação sobre o efeito da fibra relacionada com a digestibilidade dos aminoácidos para esses animais.

Esta revisão de literatura tem como objetivo discorrer sobre o uso da proteína microbiana, bem como, sua determinação através do indicador ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) para animais.

REVISÃO DE LITERATURA

O uso do indicador ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) em estudos com animais ruminantes já é bem consolidado, assim vem sendo estudado a contribuição e presença deste indicador também para animais não ruminantes. Weller et al. (1958) mostraram que a razão ácido 2,6 - diaminopimélico, nitrogênio (DAPA:N) para amostras de mistura de bactérias ruminais, no regime de dieta fixa, é razoavelmente constante e Hutton et al. (1971), confirmaram essa observação. Pelo fato de sua relação frente ao N do conjunto de bactérias ruminais ser relativamente constante, o DAPA se tornou o indicador interno mais usado para estimar a síntese proteica microbiana.

Moumen et. al. (2008) estudaram indicadores ácido 2,6 - diaminopimélico DAPA e bases purinas, na estimativa do fluxo de N e dos aminoácidos microbianos. O ensaio foi realizado in vitro, com a utilização de culturas de microrganismos fermentadores incubadas em líquido ruminal de pequenos ruminantes alimentados com duas dietas diferentes. Uma vantagem na utilização desse método in vitro, de acordo com os autores, foi o desaparecimento dos protozoários do meio após certo tempo, evitando, assim, a interferência destes nas análises. Além da comparação de métodos (DAPA e bases purinas), um dos objetivos era determinar a melhor fração para o isolamento e a análise de microrganismos: bactérias associadas à fase sólida (BAS), bactérias associadas à fase líquida (BAL), ou o efluente bacteriano (EB), composto pelas culturas de microrganismos fermentadores in vitro e coletadas ao longo de 24 horas. Com BAS e BAL, ao utilizar a relação DAPA:N, não foi detectada nenhuma diferença entre as dietas, porém, ao utilizar a relação bases purinas:N, essa diferença foi detectada. Com EB detectou-se diferenças com ambos indicadores. Os pesquisadores concluíram que a concentração de DAPA nas bactérias



varia dependendo da dieta e do local de amostragem, BAS ou BAL, sendo que as primeiras tiveram sempre menor concentração do referido indicador. Além disso, concluíram que as estimativas de síntese proteica microbiana, baseadas no DAPA, chegaram a ser 35% menores que as obtidas com bases purinas. Quando se utilizou o EB, para o DAPA e bases purinas, os resultados foram semelhantes, sugerindo essa técnica de amostragem foi a mais adequada para os estudos da síntese proteica microbiana.

Jensen et al. (2006) avaliaram diferentes métodos utilizados na estimativa do suprimento de aminoácidos no duodeno de bovinos leiteiros, provenientes de microrganismos, de proteínas não degradáveis no rúmen e de proteínas endógenas. As bactérias ruminais foram separadas do material particulado e líquido por centrifugação diferencial. Protozoários foram separados também por centrifugação, mas após limpeza do líquido ruminal por floculação. O ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA), o ácido nucleico (RNA) e as bases purinas (totais e individuais) foram os métodos utilizados para a estimativa da concentração de nitrogênio aminoacídico (NAA) microbiano. O NAA da proteína não degradável no rúmen foi estimado por incubação *in situ*. As médias estimadas para o fluxo do NAA microbiano obtidas com o DAPA (0,388 kg/dia) foram muito altas e quase o dobro daquelas obtidas com RNA (0,165 kg/dia). Já as médias estimadas com as bases purinas, aqui representadas pela guanina (0,192 kg/dia), foram comparáveis àquelas obtidas com RNA. Nesse estudo, o DAPA não foi considerado útil como um método de referência na estimativa do fluxo microbiano.

Pan et al. (2003) avaliaram o efeito da infusão de ureia no rúmen sobre a atividade enzimática fibrolítica (endonucleases e xilanases), tanto na fase sólida como na fase líquida ruminal, em novilhas alimentadas com feno de baixa qualidade.

Os resultados encontrados indicaram aumento da atividade fibrolítica pela infusão de ureia, por estímulo ao crescimento de microrganismos celulolíticos. Esse aumento ocorreu logo após alimentação, no caso de microrganismos associados à fase líquida, e em um estágio mais avançado, no caso de microrganismos associados às partículas. Dentre os parâmetros observados, ficou evidenciada a diminuição da concentração do ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) na fração sólida, com a infusão de ureia, em amostras de digesta da região ventral do rúmen.

Broderick e Merchen (1992) publicaram uma extensa revisão sobre o uso de indicadores na determinação da síntese proteica microbiana no rúmen. Nesse trabalho os autores afirmaram que os indicadores microbianos mais usados são os indicadores internos, o ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) e os ácidos nucleicos (RNA, DNA, purinas individuais ou totais e pirimidinas), seguidos pelos indicadores externos isotópicos (os isótopos de nitrogênio e enxofre, principalmente).

Embora o ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) fosse quase que exclusivamente utilizado como indicador da síntese de proteína microbiana em animais ruminantes, a partir da década de 90, alguns pesquisadores também passaram a usar o DAPA com este fim em pesquisas com animais não ruminantes, encontrando sucesso na execução desta técnica.

Estudos com cães foram realizados por Karr - Lilienthal et al. (2004), na Universidade de Illinois, com o objetivo de testar a eficácia do DAPA e das bases purinas na estimativa da proporção do N bacteriano nas fezes destes animais. As estimativas obtidas com o ácido diaminopimélico foram menos variáveis que as obtidas com bases purinas. Sendo assim, os autores concluíram que o DAPA é um indicador adequado para a estimativa do N bacteriano em fezes de cães.



Rubio (2003) realizaram estudo que avaliou digestibilidade de carboidratos e excreção fecal de nitrogênio (N) em ratos alimentados com dietas à base de *Vicia fava* (fava) ou de *Cicer arietinum* (grão de bico). Encontraram nos estudos com leguminosas, apesar de alta digestibilidade proteica, a excreção de N fecal no grupo controle foi usualmente maior. Contudo, foi verificado que não apenas a proteína, mas também os carboidratos dietéticos, tiveram efeito sobre a digestibilidade e excreção do N. E concluíram que muito do N excretado em humanos e outros animais alimentados com dietas ricas em fibra é proveniente da fermentação bacteriana no intestino grosso. Nessas circunstâncias, se o N fecal não for corrigido para N bacteriano, a digestibilidade fecal da proteína dietética ficará subestimada.

Por outro lado, o N bacteriano fecal pode ser estimado pela dosagem do DAPA, segundo Goodlad & Mathers (1990) e Rubio (2003), ou por bases purinas (Surra et al., 1997), como indicadores indiretos do crescimento bacteriano. Rubio (2003), concluiu também que, 50 a 80% do N fecal em ratos alimentados com fava ou grão de bico foram provenientes de bactérias.

Em 1996, o DAPA foi utilizado com sucesso para a dosagem da proteína microbiana em fezes de coelhos por Bellier & Gidenne (1996). Nesse experimento foram avaliadas as consequências da redução da ingestão de fibra sobre a digestibilidade da mesma, sobre a taxa de passagem e sobre a atividade microbiana cecal. Nessa ocasião, foram encontrados maiores concentrações de DAPA nas fezes dos animais que ingeriram menor quantidade de fibra na dieta, associada a uma maior digestibilidade da fibra, sugerindo uma maior atividade microbiana nessa situação.

Sauer et al. (1991), realizaram um estudo onde foi avaliado, o efeito da fonte de fibra na digestibilidade dos aminoácidos ileal, fecal e excreção de nitrogênio

bacteriano em suínos em crescimento. Foram utilizados 6 suínos machos e duas fontes de fibra, sendo todas as dietas à base de amido de milho para conter 16% de PB do farelo de soja. A dieta 1 sem fibras adicionais, e as dietas 2 e 3 com 10% de celulose em pó e 10% de palha de cevada. Como resultado desse experimento, a inclusão de fibras não afetou ($P>0,05$) a digestibilidade ileal dos AA essenciais. A média dos coeficientes de digestibilidade ileal dos AA essenciais foram 85,3, 82,9, e 83,2% para as dietas 1, 2 e 3. A inclusão de fibras reduziu ($P<0,05$) a digestibilidade fecal de todos os AA essenciais. Esta redução resultou de um aumento ($P<0,05$) na excreção de N bacterianas, que foi medida utilizando ácido 2,6-diaminopimélico como um indicador (DAPA). Assim a inclusão de fibras teve pouco efeito sobre o fornecimento de aminoácidos digestíveis.

Em relação aos métodos de análise do DAPA, em 1971 existiam essencialmente três métodos: a colorimetria, com o reagente ninidrina ácida; a espectrofluorimetria e a cromatografia gasosa. O reagente ninidrina ácida não é inteiramente específico e pode resultar em produtos reativos coloridos quando aquecido com alguns outros aminoácidos. Todos os diaminoácidos investigados por Work & Dewey (1954) reagiram com essa substância, em uma extensão que depende do pH e do tempo de reação. Contudo, o espectro de absorção e a intensidade da coloração ocorreram de forma que as condições seriam ajustadas. Então, a estimativa seletiva do DAPA seria possível.

A aplicação com sucesso dessa técnica depende da presença de altas concentrações do DAPA em relação aos outros aminoácidos reagentes. No entanto, na digesta de ruminantes, na qual a concentração de DAPA é baixa, a interferência de outros aminoácidos é considerável, sendo essa técnica de valor limitado. Uma conclusão similar aplica-se



ao método espectrofluorimétrico. Neste, a glucosamina afeta seriamente a determinação do DAPA. Há também dúvidas sobre aspectos quantitativos do método. O que se tem de concreto é o fato de que, em digesta de ruminantes, alguma forma de separação cromatográfica do DAPA é necessária antes de medir a sua concentração.

O método da cromatografia gasosa, descrito por Stahl (1969), é atrativo, mas o número de passos para purificações faz com que não se adapte a análises rápidas de rotina. El-Shazly & Hungate (1966) descreveram o método com troca iônica para isolar e estimar o DAPA e Hutton et al. (1971) adaptaram esse método para um sistema automático, que poupa considerável tempo. O procedimento foi aplicado com sucesso para a determinação da contribuição do N bacteriano no N total na digesta duodenal. Segundo Rubio (2003), os métodos tradicionais, que indicam a cromatografia de troca iônica e detecção pelo reagente ninidrina, são factíveis, porém, além de demandarem um analisador de aminoácidos oneroso, consomem muito tempo. Já o método proposto por Czerkawski (1974) tende a ser menos dispendioso, mas ainda bastante laborioso e, como já dito anteriormente, susceptível a contaminações com prolina, além da necessidade de altas concentrações de DAPA quando se usa o reagente ninidrina.

A análise do DAPA por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) pode contornar muitas das limitações citadas anteriormente. Contudo, os métodos usados até então são baseados na derivatização do DAPA com o-phthalaldeído (OPA), que ainda impõe muitos problemas metodológicos. Pode-se afirmar que o método proposto por Webster et al. (1990) requer custosa purificação e o tempo gasto por amostra de DAPA é semelhante aos outros aminoácidos. Por outro lado, o método proposto por Puchala & Kusalesk (1992), apesar de mais rápido,

requer cromatogramas independentes para o DAPA e para outros aminoácidos, além do DAPA eluir em dois picos, correspondentes a dois estereoisômeros (L-DAPA e meso-DAPA), o que torna a quantificação difícil. Também, amostras de derivatização do OPA são instáveis, sendo crítico o tempo depois da derivatização. Sendo assim, Rubio (2003) realizou um estudo sobre a determinação do DAPA em fezes de ratos pela cromatografia líquida de alta performance (HPLC), de fase reversa, utilizando o método “Pico Tag”. As amostras foram dissolvidas em 150 µL do diluente Pico Tag, da Waters® (para análise de aminoácidos livres) e homogeneizadas. Por fim, 10 µL da solução foram injetados para análise por HPLC em coluna 3,9 x 300 mm Nova - Pak C18 da Waters®. Nesse estudo, o N bacteriano nas fezes foi dado pela equação de Ahrens & Kaufmann (1985), a saber:

$$\text{N bacteriano (mg)} = 19,45 \times \text{DAPA (mg)} + 0,297$$

Os valores médios de concentração fecal do DAPA variaram de 1,81 a 2,45 mg/g. A digestibilidade aparente do N fecal, corrigida para o N bacteriano, foi calculada pela subtração dos valores do N bacteriano dos valores do N fecal total. Ao final esse autor sugere o HPLC de fase reversa com método “Pico Tag” para dosagem do DAPA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da proteína microbiana e determinação do ácido 2,6 - diaminopimélico (DAPA) tem sua contribuição bem consolidada referente ao desempenho de animais ruminantes. Entretanto, é um assunto ainda pouco estudado para animais não ruminantes. Porém, pelo pouco que já se pesquisou, a proteína microbiana também pode contribuir para estes animais de forma positiva, otimizando o desempenho destes, mostrando o potencial da pesquisa na área.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, F.; KAUFMANN W. Messungen zur Fermentation im Dickdarm am Modell 1 Miniaturschwein unter besonderer Berücksichtigung der Eiweißumsetzungen. **Journal Animam Physiology Nutrition**, v.53, p.150-169, 1985.

BELLIER, R.; GIDENNE, T. Consequences of reduced fiber intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. **British Journal of Nutrition**, v.75, n.3, p.353-363, 1996.

BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal Dairy Science**, v.75, n.9, p.2618-2632, 1992.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details. **International Feed Reseach Unit**, Aberdeen, UK: Rowett Research Institute, 21p. (Ocasional publication), 1992.

CZERKAWSKI, J.W. Methods for determining 2-6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.25, n.1, p.45-55, 1974.

EL-SHAZLY, K.; HUNGATE, R. Method for measuring diaminopimelic acid in total rumen contents and its application to the estimation of bacterial growth. **Applied Microbiology**, v.14, n.1, p.27-30, 1966.

GOODLAD, J.S.; MATHERS, J.C. Large bowel fermentation in rats given diets containing raw peas (*Pisum sativum*). **British Journal of Nutrition**, v.64, n.2, p.569-587, 1990.

HUTTON. K.; BAILEY F.J.; ANNISON. E.F. Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. **British Journal of Nutrition**, v.25, n.1, p.165-173, 1971.

JENSEN, C.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Evaluation of methods for estimating the amino acid supply to the duodenum of microbial, endogenous and undegraded feed protein on maize silage diets fed to dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, n.1, p.1-24, 2006.

KARR-LILIENTHAL, L.K.; GRIESHOP, C.M.; SPEARS, J.K. et al. Estimation of the proportion of bacterial nitrogen in canine feces using diaminopimelic acid as an internal bacterial marker. **Journal of Animal Science**, v.82, n.6, p.1707-1712, 2004.

LOW, A. G. Nutrient absorption in pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.31, n.11, p.1087-1130, 1980.

MOUMEN, A.; YÁÑEZ - RUIZ, D.R.; MARTÍN - GARCÍA ,I. et al. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in



continuous fermenters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n.1, p.9-17, 2008.

PAN, J.; SUZUKI, T.; UEDA, K. et al. Diurnal changes in the distribution of ruminal bacteria attached to feed particles in sheep fed hay once daily. Asian-Austr. **Journal of Animal Science**, v.13, n.12, p.1708-1716, 2003.

PUCHALA, R.; KULASEK, G.W. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and excretion of purine derivatives. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, n.4, p.821-830, 1992.

RUBIO, L.A. Carbohydrates digestibility and fecal nitrogen excretion in rats fed raw or germinated faba bean (*Vicia faba*) - and chickpea (*Cicer arietinum*) - based diets. **British Journal of Nutrition**, v.90, n.2, p.301-309, 2003.

SAUER, W.C.; MOSENTHIN, R.; AHRENS, F. et al. The effect of source of fiber on ileal and fecal amino acid digestibility and bacterial nitrogen excretion in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.69, n.10, p.4070-4077, 1991.

SYNGE, R.L.M. Note on the occurrence of diaminopimelic acid in some intestinal micro-organisms from farm animal. **Journal of General Microbiology**, v.9, n.3, p.407-409, 1953.

STAHL, E. **THIN LAYER – chromatography**. New York. Spring – Verlag, p.873 – 874, 1969.

SURRA, J.C.; GUADA, J.A.; BALCELLS, J. et al. Effects of post-ruminal fermentation on the faecal and urinary excretion of purines. **Animal Science**, v.65, n.3, p.383–390, 1997.

WEBSTER, P.M.; HOOVER, W.H.; MILLER, T.K. Determination of 2,6 – diaminopimélico acid in biological materials using high performance liquid chromatographic. **Animal Feed Science and Technology**, v.30, p.11-20, 1990.

WELLER, R.A.; GRAY, F.V.; PILGRIM, A.F. The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, v.12, n.4, p.421-429, 1958.

WORK, E.; DEWEY, D.L. The distribution of alpha, epsilon-diaminopimelic acid among various micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v.9, n.3, p.394-406, 1954.