

**PAULO SERGIO DORNELAS SILVA**

**AVALIAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS DE CADEIAS  
RAMIFICADAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*, EM DIETA  
COM ALTO VOLUMOSO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Rogério de Paula Lana

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586a  
2022

Silva, Paulo Sergio Dornelas, 1992-  
Avaliação de aminoácidos e ácidos graxos voláteis de  
cadeias ramificadas sobre a fermentação ruminal *in vitro*, em  
dieta com alto volumoso / Paulo Sergio Dornelas Silva. –  
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (34 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Rogério de Paula Lana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Zootecnia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 31-34.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbtt.2022.316>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Nutrição. 2. Aminoácidos na nutrição animal.  
3. Digestibilidade. 4. Forragem. I. Lana, Rogério de Paula,  
1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 636.085

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

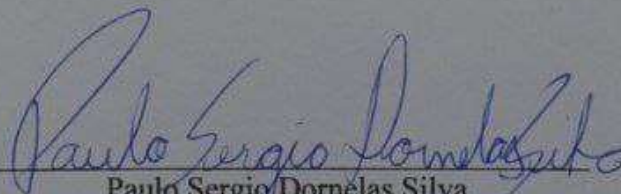
**PAULO SERGIO DORNELAS SILVA**

**AVALIAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS DE CADEIAS  
RAMIFICADAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*, EM DIETA  
COM ALTO VOLUMOSO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



---

Paulo Sergio Dornelas Silva

Autor



---

Rogério de Paula Lana

Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, onde tenho a oportunidade de estar sempre em desenvolvimento pessoal, emocional e espiritual.

Aos meus pais Anacleto e Neli, pelo amor, por estarem comigo em todos os momentos, apoiando e incentivando a minha caminhada acadêmica. A minha irmã Laís e demais familiares, pela torcida e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia (DZO) por tornar possível a realização dessa formação e por me permitir conhecer pessoas que foram de grande apoio durante essa etapa, ao LABNUR e ao LNA por todo o recurso para a execução desse trabalho.

Ao laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN) em especial a técnica Nívea Moreira Vieira e a Juliana Soares da Silva, pelo carinho, a atenção e o profissionalismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas.

As empresas Nutricattle e Suprikem, pelo suporte financeiro concedido à pesquisa, e à FACEV, por administrar o projeto por meio do convênio 264.

Ao professor Rogério de Paula Lana, pela confiança, oportunidades, ensinamentos e orientação durante o mestrado.

Aos docentes, Cláudia Batista Sampaio, Edenio Detmann e Marcos Inácio Marcondes por todo apoio e auxílio na conclusão desta dissertação.

Aos membros da banca, Eduardo Morostegan de Paula, João Paulo Pacheco e Marcos Inácio Marcondes pelo aceite de participar da banca e auxílio durante a correção desta dissertação.

Aos irmãos que o DZO me deu, Adailton Costa, Daiana Quirino, Dhones Rodrigues, Felipe Almeida, Jardeson Pinheiro, Nathália Trópia e Thamys Pollyne, pela amizade, paciência, conselhos e por terem me auxiliado durante o experimento.

Aos funcionários do DZO: por toda ajuda durante a execução deste projeto, em especial ao Mauro, Pinguim, Fernanda, Monteiro, Alda, Matheus e Sr. Mário.

Aos amigos que o DZO me possibilitou conhecer, Bruno Figueiredo, Cris Luana, Élfem Matos, Luiz Carlos, Heitor Carvalho, Pâmela Gracioli, Pedro Lourenço, Rafael Rusth, Raphaela Cenci, Rizi Reis, Robert Paixão e Saulo Carneiro.

Finalizando, meu muito obrigado a todos aqueles que participaram da minha JORNADA até aqui!

## RESUMO

SILVA, Paulo Sergio Dornelas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Avaliação de aminoácidos e ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas sobre a fermentação ruminal *in vitro*, em dieta com alto volumoso.** Orientador: Rogério de Paula Lana.

Objetivou-se avaliar a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas (AGVCR), em uma dieta com relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na matéria seca (MS), sobre os parâmetros de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da fibra em detergente neutro (DIVFDN), pH, nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>-N), ácidos graxos voláteis (AGV), proteína solúvel (PS) e proteína microbiana (Pmic). O estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento, avaliamos diferentes níveis de AACR a ser suplementado: controle (0,0% de AACR), 0,3%, 0,6%, 0,9% e 1,2% de AACR com base na MS da dieta. O experimento dois objetivou avaliar e comparar o efeito da suplementação com AACR (0,6% na MS) e AGVCR (1,3% na MS) sobre a DIVMS, DIVFDN e os parâmetros ruminais. As amostras do experimento 1 foram incubadas por 24h em frascos do tipo penicilina (60 mL) para posteriores análises da DIVMS e DIVFDN, de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), proteína solúvel (PS), proteína microbiana (Pmic) e ácidos graxos voláteis (AGV). As amostras do experimento 2 foram incubadas em frascos tipo penicilina (60 mL) e as medidas de DIVMS e DIVFDN foram realizadas em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h, enquanto o pH, a concentração de N-NH<sub>3</sub>, PS, Pmic e AGV foram avaliados em 6, 9, 12, 24 e 48 h. No experimento 1, todos os dados foram avaliados como um delineamento inteiramente casualizado pelo PROC MIXED do SAS e as médias foram comparadas por contrastes ortogonais (linear, quadrático e cúbico). No experimento 2, os resíduos de incubação obtidos através dos procedimentos *in vitro* em função do tempo foram estimados utilizando o PROC NLIN do SAS para obter os parâmetros das equações de regressão não lineares. Além disso, os dados de pH, N-NH<sub>3</sub>, PS, Pmic e AGVs foram analisados conforme um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, dois tratamentos e cinco time points pelo PROC MIXED do SAS. Para as comparações das médias foi utilizado o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% e probabilidade para o erro tipo I. Não houve efeito das suplementações na DIVMS e DIVFDN em ambos os experimentos. No experimento 1, houve efeito linear da suplementação com AACR no pH (P = 0,001), no N-NH<sub>3</sub> (mg/dL; P = 0,001) e na PS (µg/mL; P = 0,001). Para o experimento 2, a suplementação

com AACR e AGVCR tiveram efeito de tratamento para a concentração acetato, isobutirato, isovalerato (mmol/L;  $P < 0,05$ ) e proporção de butirato (%;  $P = 0,018$ ). O pH, PS, Pmic, acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato e a proporção de acetato, propionato e butirato foram afetados pelo tempo de incubação ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, os experimentos um e dois, suplementados com AACR e/ou AGVCR não maximizaram a DIVMS e DIVFDN da dieta, o aumento de Pmic e de AGV total. No entanto, aumentaram a concentração de  $\text{NH}_3\text{-N}$ .

Palavras-chave: Celulolíticas. Digestibilidade. Forragem tropical. Isoácidos.

## ABSTRACT

SILVA, Paulo Sergio Dornelas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Evaluation of amino acids and branched-chain volatile fatty acids on *in vitro* rumen fermentation in a high forage diet.** Adviser: Rogério de Paula Lana.

The objective was to evaluate the supplementation with branched-chain amino acids (BCAA) and branched-chain volatile fatty acids (BCVFA), in a diet with a roughage: concentrate ratio of 70:30 based on dry matter (DM), on the parameters of *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM), neutral detergent fiber (IVDADF), pH, ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N), volatile fatty acids (VFA), soluble protein (SP) and microbial protein (Mcp). The study was divided into two experiments. In the first experiment, we evaluated different levels of BCAA to be supplemented: control (0.0% of BCAA), 0.3%, 0.6%, 0.9% and 1.2% of BCAA based on the DM of the diet. Experiment two aimed to evaluate and compare the effect of supplementation with BCAA (0.6% in MS) and BCVFA (1.3% in MS) on IVDDM, IVDADF, and rumen parameters. The samples from experiment 1 were incubated for 24h in penicillin-type flasks (60 mL) for further analysis of IVDDM and IVDADF, pH, ammonia nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), soluble protein (SP), microbial protein (Mcp), and acids volatile fatty acids (VFA). The samples from experiment 2 were incubated in penicillin-type flasks (60 mL) and measurements of IVDDM and IVDADF were performed at 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 h, while pH, the concentration of N-NH<sub>3</sub>, SP, Mcp and VFA were evaluated at 6, 9, 12, 24 and 48 h. In experiment 1, all data were evaluated as a completely randomized design by the SAS PROC MIXED and the means were compared by orthogonal contrasts (linear, quadratic, and cubic). In experiment 2, the incubation residues obtained through the *in vitro* procedures as a function of time were estimated using the SAS PROC NLIN to obtain the parameters of the nonlinear regression equations. In addition, pH, N-NH<sub>3</sub>, SP, Mcp, and VFAs data were analyzed according to a completely randomized design in a 3 x 5 factorial scheme, two treatments, and five-time points by the PROC MIXED of the SAS. Tukey's test was used to compare the means, adopting a significance level of 5% and probability for type I error. There was no effect of supplementation on IVDDM and IVDADF in both experiments. In experiment 1, there was a linear effect of BCAA supplementation on pH (P = 0.001), N-NH<sub>3</sub> (mg/dL; P = 0.001) and SP (µg/mL; P = 0.001). For experiment 2, supplementation with BCAA and BCVFA had a treatment effect for acetate, isobutyrate, isovalerate concentration (mmol/L; P < 0.05) and butyrate proportion (%; P = 0.018). The pH, SP, Mcp, acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, and isovalerate and the proportion of acetate, propionate,

and butyrate were affected by the incubation time ( $P < 0.05$ ). In conclusion, experiments one and two, supplemented with BCAA and/or BCVFA, did not maximize dietary IVDMD and IVDNDF, increase in Micp, and total VFA. However, they increased the concentration of  $\text{NH}_3\text{-N}$ .

Keywords: Cellulolytics. Digestibility. Tropical fodder. isoacids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub> - mg/dL) em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. .... 29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dieta experimental formulada para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	16
<b>Tabela 2.</b> Análise bromatológica da dieta experimental para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.....	17
<b>Tabela 3.</b> Valores da digestibilidade da matéria seca e digestibilidade da fibra em detergente neutro em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	21
<b>Tabela 4.</b> Valores de pH, nitrogênio amoniacal, proteína solúvel e proteína microbiana em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	22
<b>Tabela 5.</b> Valores dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta e de cadeia ramificada em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	23
<b>Tabela 6.</b> Valores de degradação da matéria seca em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	24
<b>Tabela 7.</b> Valores de degradação da fibra em detergente neutro em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	25
<b>Tabela 8.</b> Valores de pH, proteína solúvel e proteína microbiana em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	28
<b>Tabela 9.</b> Valores dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta e de cadeia ramificada em sistema <i>in vitro</i> com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. ....	30

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
2.1. <i>Local</i> .....	13
2.2. <i>Animais</i> .....	13
2.3. <i>Tratamentos</i> .....	14
2.4. <i>Experimento 1</i> .....	14
2.5. <i>Experimento 2</i> .....	14
2.6. <i>Procedimentos in vitro</i> .....	15
2.7. <i>Análises estatísticas</i> .....	19
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
3.1. <i>Experimento 1</i> .....	20
3.2. <i>Experimento 2</i> .....	24
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31

## INTRODUÇÃO

O conhecimento do ambiente ruminal permite que modulações sejam realizadas no ecossistema e, através dessas alterações, é possível obter maior eficiência na fermentação da dieta e melhorar o desempenho produtivo dos ruminantes. Uma das formas de alterar esse ambiente é atendendo as exigências nutricionais dos microrganismos (Russell, 2002).

Nesse aspecto, os aminoácidos de cadeias ramificadas (AACR), valina, leucina e isoleucina, atuam no funcionamento das vias metabólicas dos microrganismos que compõem o ecossistema ruminal, podendo sua deficiência levar à menores taxas de crescimento microbiano (WANG et al., 2008). A principal fonte de AACR do ecossistema ruminal vem da proteína degradável no rúmen (PDR) oriunda da dieta (Fox and Tedeschi, 2009). Segundo Roman-Garcia et al. (2021), forrageiras tropicais apresentam baixas concentrações de AACR em sua composição, sendo assim, dietas com alta relação volumoso:concentrado podem gerar uma deficiência desses aminoácidos no ambiente ruminal, comprometendo o crescimento microbiano no rúmen.

No entanto, nem todos os microrganismos conseguem absorver diretamente esses aminoácidos e utilizá-los em suas vias metabólicas. Especificamente, a maioria das cepas das bactérias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*), responsáveis pela degradação dos carboidratos estruturais da parede celular vegetal, requerem ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas (AGVCR) como precursores para a biossíntese dos AACR, aldeídos e para incorporar em ácidos graxos de cadeia ímpar e ácidos graxos de cadeia longa e ramificada (Baldwin and Allison, 1983).

O isobutirato de quatro carbonos, e os isômeros de cinco carbonos, isovalerato (3-metilbutirato) e 2-metilbutirato, são produzidos pela descarboxilação da valina, leucina e isoleucina dietéticos, respectivamente, feito pelas bactérias não celulolíticas, e excretados ao ambiente ruminal (Allison, 1978). Esse catabolismo dos AACR leva à uma alimentação cruzada quando os AGVCR produzidos são liberados no ambiente ruminal e são utilizados por bactérias celulolíticas como precursores para biossíntese (Firkins, 2010).

Em seu estudo, Wang et al. (2008) observaram diminuição da proteína microbiana em quase 50%, quando os aminoácidos de cadeias ramificadas (AACR) foram removidos do meio de cultura em relação ao grupo que continha todos aminoácidos essenciais, mostrando que a presença dos AACR no ambiente ruminal é fundamental para o crescimento das populações microbianas. Sabendo das exigências por AACR e por AGVCR das populações de microrganismos ruminais, estudos surgiram buscando suplementar dietas com os essas

moléculas para estimular crescimento de microrganismos ruminais, principalmente os celulolíticos, hipotetizando a maximização da digestibilidade das frações fibrosas dos ingredientes e de dietas (Copelin et al., 2021; Firkins, 2021; Puastuti et al., 2018; Salinas Laura, 2021; Val Neto, 2009; Zhang et al., 2013). Entretanto, há poucas informações e muitas inconsistências na literatura a respeito dos efeitos da suplementação com aminoácidos ou isoácidos de cadeias ramificadas no rúmen (Roman-Garcia et al., 2021), principalmente em dietas balanceadas para vacas em lactação com alta relação volumoso:concentrado.

A hipótese deste estudo é que a suplementação com aminoácidos (experimento 1 e 2) ou isoácidos de cadeias ramificadas (experimento 2), em dietas com alto volumoso (70:30), poderá estimular o crescimento da população de bactérias celulolíticas no rúmen e, conseqüentemente, aumentar a digestibilidade da dieta, a produção de proteína microbiana e a produção total de ácidos graxos voláteis (AGVs). Portanto, o objetivo desta pesquisa foi analisar a digestibilidade, parâmetros ruminais em dieta com relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na MS, suplementada com aminoácidos e ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas.

## 1. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. Local

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, durante os meses de fevereiro a agosto de 2021. As análises químicas laboratoriais (alimentos e dieta) e os ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar os parâmetros digestivos da dieta utilizando dois suplementos, AACR e AGVCR (Isomix®). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da UFV (CEUAP-UFV; protocolo N° 09/2021).

### 2.2 Animais

O inóculo ruminal foi obtido de três bovinos, fistulados no rúmen. A dieta dos animais doadores foi composta por cana-de-açúcar e concentrado com 22% de proteína bruta, sendo a relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na MS. Antes das coletas de líquido ruminal, os animais foram submetidos a jejum de 12 h. Os animais tiveram acesso irrestrito à

água e mistura mineral completa (90 g/kg de fósforo). Os animais foram adaptados à dieta padrão por 14 dias antes do início das coletas.

### 2.3 Tratamentos

Foram conduzidos dois experimentos para avaliação da suplementação com aminoácidos de cadeias ramificadas e ácidos graxos de cadeias ramificadas. O experimento 1 consistiu em avaliar a digestibilidade *in vitro* de uma dieta para vacas leiteiras, com alto volumoso (70:30), suplementada com quatro concentrações de AACR. E, o experimento 2, em avaliar a digestibilidade das frações da mesma dieta, porém, suplementada com AACR e com o produto Isomix®, fonte de AGVCR.

### 2.4 Experimento 1

Foram utilizados 5 tratamentos, o controle (sem adição de aminoácidos de cadeia ramificada), e quatro com diferentes concentrações do *blend* de AACR (0,3; 0,6; 0,9 e 1,2 % na MS) em 500 mg na MS, da dieta experimental. O *blend* foi formulado com 33,3% de valina, 33,3% leucina e 33,3% de isoleucina. A fonte desses aminoácidos possui 96,5% de pureza e não são protegidos contra degradação ruminal.

Os tratamentos foram acondicionados em frascos de vidro e avaliados em 24 horas de fermentação *in vitro*, com seis repetições por tratamento, totalizando 30 unidades. Foram utilizadas seis amostras em branco (10 mL de inóculo ruminal + 40 mL de solução tampão de McDougall) para descontar os possíveis contaminantes oriundos do fluido ruminal, nos resultados de digestibilidade e nos parâmetros ruminais que foram analisados. Ao final, 36 frascos foram incubados.

### 2.5 Experimento 2

No experimento 2, foram utilizados três tratamentos, o controle (sem adição de aminoácidos ou ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada), o tratamento dois que consistiu em 0,6% do *blend* de AACR e o tratamento três com 1,3% de Isomix®, dosagem estipulada pelo fabricante por animal/dia. As concentrações de AACR e Isomix® foram calculadas em 500 mg na MS da dieta experimental. É importante destacar que o Isomix® é um produto comercial que contém AGVCR.

O tratamento com maior digestibilidade em 24 horas (experimento 1) seria utilizado no experimento 2. Em caso de ausência de diferença significativa no experimento 1 para

digestibilidade da FDN, a concentração do *blend* de AACR a ser utilizada no experimento 2 corresponderia a de 0,6% da MS. Essa concentração foi definida baseada no custo de utilização de aminoácidos por animal/dia. As concentrações de 0,9 e 1,2% de AACR, elevaria muito o custo por animal.

Os dois tratamentos e o controle foram avaliados em diferentes tempos de fermentação (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas) com quatro repetições. Além disso, foram realizadas quatro amostras em brancos (10 mL de inóculo ruminal + 40 mL de solução tampão de McDougall) por cada tempo de fermentação, para descontar os possíveis contaminantes oriundos do fluido ruminal nos resultados da digestibilidade e dos parâmetros ruminais que foram analisados.

Cada um dos tempos de fermentação (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas) contaram com 12 unidades experimentais (quatro unidades do controle, quatro do *blend* de AACR e quatro do Isomix®) e quatro brancos, totalizando no segundo experimento 160 frascos incubados.

Os ensaios foram divididos em quatro baterias com 40 frascos incubados por bateria. Essa divisão é necessária por causa da capacidade que a mesa giratória orbital comporta de frascos. E em cada bateria, foram incubados quatro frascos (Branco, Controle, *blend* de AACR e Isomix®) por tempo de fermentação.

## 2.6 Procedimentos *in vitro*

A dieta experimental que foi utilizada nos dois experimentos *in vitro* foi formulada para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite (Tabela 1), utilizando feno de tifton 85 como volumoso, e o concentrado foi formulado com fubá de milho, farelo de soja, ureia + S.A (9:1) e núcleo (minerais e vitaminas).

Antes da formulação da dieta experimental, foram realizadas análises bromatológicas dos alimentos para a caracterização química da dieta experimental. Posteriormente foram preparados 0,5 kg da dieta e, em seguida a mesma foi homogeneizada e processada em moinho de facas, com peneira de porosidade de 1 mm para o procedimento de digestibilidade *in vitro* e para as análises bromatológicas da dieta (Tabela 2).

As avaliações *in vitro* para o método proposto por Tilley E Terry (1963) seguiram as recomendações descritas pelos autores para o primeiro estágio (digestibilidade com inóculo ruminal), exceto o fato de utilizar frascos vedados e retirar os gases por agulhas ao invés de tubos de ensaio com válvulas de Bunsen.

**Tabela 1.** Dieta experimental formulada para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Ingredientes	%
Feno de Tifton 85	69,9
Fubá de milho	16,0
Farelo de soja	11,3
Ureia + SA <sup>A</sup>	0,7
Núcleo mineral	1,3
Calcário	0,4
Cloreto de sódio	0,3
Total	100

<sup>A</sup>Proporção ureia/sulfato de amônio (SA) de 9:1

Foram pesadas para cada tratamento aproximadamente 500 mg da dieta, sendo então adicionados 10 mL de líquido de rúmen e 40 mL de tampão (McDougall, 1947) em frasco de 60 mL de penicilina (relação 1:4 inóculo e solução tampão), segundo Silva (2016), realizando o processo de fermentação a 39°C em ambiente anaeróbico.

Nos dias anteriores aos procedimentos, foram preparadas a solução tampão de McDougall (1947) e esta foi acondicionada em uma sala climatizada a 39°C para a estabilização da temperatura. Antes de iniciar cada uma das incubações experimentais, foi coletada digesta (líquido e sólidos) de diferentes pontos da interface líquido-sólido do ambiente ruminal, sendo acondicionado em recipientes térmicos adequados para a manutenção da temperatura de 39°C (garrafas térmicas pré-aquecidas). Posteriormente, a digesta foi transferida para um liquidificador, em sala climatizada a 39°C, sendo homogeneizada por 30 segundos. O material homogeneizado foi filtrado com camadas de gaze em frascos Erlenmeyer de 2 L (Castro et al., 2021).

O espaço livre dos frascos foi imediatamente saturado com CO<sub>2</sub>, sendo fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos foram mantidos sob agitação numa mesa agitadora orbital (40 rpm) em sala climatizada (39 °C). Procedeu-se a retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas, com auxílio de agulhas. Após 24 horas de incubação no experimento 1 e em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas no experimento 2, os frascos foram retirados da sala climatizada e o pH foi medido usando um medidor de pH digital portátil (MB-10, Marte, Brasil), sendo o conteúdo transferido para cadinhos filtrantes

(porosidade grossa), com auxílio de água destilada (temperatura superior a 90 °C). Em seguida, os cadinhos foram secos (105 °C/24 horas) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da matéria seca.

**Tabela 2.** Análise bromatológica da dieta experimental para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Composição	
MS <sup>A</sup>	876,0
PB <sup>B</sup> g/kg de MS	163,4
PDR <sup>C</sup> g/kg de MS	119,8
PNDR <sup>D</sup> g/kg de MS	4,36
FDN <sup>E</sup> g/kg de MS	531,6
Amido g/kg de MS	169,1
EE <sup>F</sup> g/kg de MS	15,6
MM <sup>G</sup> g/kg de MS	64,7
AACR (%PB)	
Isoleucina	11,2
Leucina	25,2
Valina	13,17

<sup>A</sup>MS = matéria seca; <sup>B</sup>PB = proteína bruta; <sup>C</sup>PDR = proteína degradável no rúmen; <sup>D</sup>PNDR = proteína não degradável no rúmen; <sup>E</sup>FDN = fibra em detergente neutro; <sup>F</sup>EE = extrato etéreo; <sup>G</sup>MM = matéria mineral. os valores dos AACR são teóricos, retirados do NRC Nutrient Requirement of Dairy Cattle Program.

Para a avaliação da digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), os cadinhos contendo o resíduo de incubação foram introduzidos no interior de coletores universais autoclaváveis (120 mL), adicionando-se 80 mL de solução de detergente neutro, produzida segundo Mertens et al. (2002) com a omissão de sulfito de sódio, e 250 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X). Os coletores com os cadinhos acondicionados no interior foram fechados com as respectivas tampas e autoclavados (105 °C/1 h) segundo método descrito por Detmann, et al. (2012; INCT-CA F-002/1). Após retirados da autoclave, os cadinhos foram novamente lavados com água destilada quente e, ao fim, com 30 mL de acetona, sendo secos (105 °C/24 h) e pesados para obtenção do resíduo de FDN.

Para todos os métodos, a DIVMS e a DIVFDN (D, g/kg) foram calculadas como:

$$D = \frac{M - (R - B)}{M} \times 1000$$

Em que: M = massa de MS ou FDN incubada (g); R = resíduo de MS ou FDN da incubação (g); B = resíduo de MS ou FDN obtido nos “brancos” (g).

No experimento 2, os resíduos de MS e FDN foram submetidos ao ajuste pelo modelo logístico não linear descrito por Milgen et al. (1991) através do algoritmo de Gauss-Newton implementado no PROC NLIN do SAS:

$$Rt = \text{FDNpd} \times (1 + \lambda \times t) \times \exp(-\lambda \times t) + \text{FDNi96}$$

onde Rt é o resíduo de FDN não degradado no tempo “t” (g/100 g de FDN); FDNpd é a fração de FDN potencialmente digerível (g/100 g FDN); FDNi96 é o FDN indigerível (g/100g FDN);  $\lambda$  é a taxa fracionária combinada de defasagem e degradação de FDNpd ( $\text{h}^{-1}$ ); e t é o tempo (h).

Dado que o parâmetro  $\lambda$  representa as taxas de atraso e degradação, a taxa fracionária da taxa de degradação de FDNpd ( $\text{kd}, \text{h}^{-1}$ ) foi estimada a partir de  $\lambda$  usando as propriedades de distribuição gama-2 (Ellis et al., 1994):

$$Kd = 0,59635 \times \lambda$$

A priori a medição do pH e a filtragem dos resíduos, foi coletado 6 ml de líquido de cada frascos do experimento 1 e nos tempos 6, 9, 12, 24 e 48 horas do experimento 2 e armazenados em tubos *ependorfs* em triplicata por tratamento para a realização das análises de amônia (N-NH<sub>3</sub>), proteína solúvel (PS), proteína microbiana (Pmic) e os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVs) e de cadeia ramificada (AGVCRs).

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras dos líquidos coletados (1,5 mL) foram centrifugadas (10000 x g, 10 min) para remoção das células, e o sobrenadante livre de células foi processado conforme descrito por Siegfried, R., Ruckemann, H., & Stumpf (1984). As amostras foram separadas em coluna Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm, mantida a 45 °C, utilizando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101, mantido a 45°C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5,0 mM, com fluxo de 0,7

mL/min. A curva de calibração foi feita utilizando os seguintes ácidos orgânicos como padrões externos: ácido propiônico (60 mM), ácido acético (60 mM), ácido butírico (20 mM), ácido isovalérico (5 mM) e ácido isobutírico (10 mM). Os padrões externos foram analisados nas concentrações descritas acima e nas diluições 1:2, 1:4, 1:16 e 1:32. Ácido crotônico (12,5 mM) foi utilizado como padrão interno nas amostras e curva de calibração. A concentração de ácidos orgânicos foi normalizada pelo fator de resposta e expressa como fração do total de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos (mol/100 mol).

A concentração de amônia nas amostras de líquido ruminal foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney & Marbach (1962). A absorbância foi medida a 630 nm, em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) e cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) foi utilizado como padrão.

A concentração de proteína solúvel foi determinada no sobrenadante livre de células, após centrifugação das amostras (*Eppendorf 5417C*, Hamburg, Germany) por 10 min (10.600 x g). A quantificação de proteína foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

A concentração de proteína microbiana foi determinada após a centrifugação de 1 mL de amostra por 10 min (10.600 x g), em centrífuga de microtubos (*Eppendorf 5417C*, Hamburg, Germany). O sobrenadante foi descartado e o pellet digerido com NaOH (0,2 N) por 5 min a 100 °C. A concentração de proteína microbiana foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

## 2.7 Análises estatísticas

O experimento foi analisado utilizando o programa estatístico do SAS – Statistical Analysis System (2001), adotando-se 0,05 como nível de probabilidade para o erro tipo I.

No experimento 1, todos os dados foram avaliados como um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados usando PROC MIXED do SAS (SAS Inst., Cary, 2013) com o tratamento como efeito fixo e suas médias foram comparadas por contrastes ortogonais (linear, quadrático e cúbico).

No experimento 2, os resíduos de incubação obtidos através dos procedimentos *in vitro* em função do tempo foram estimados através do modelo assintótico de primeira ordem descrito por Ørskov & McDonald (1979):

$$\text{Deg}(t)=a+b \times (1-e^{-k_d t}),$$

em que: Deg (t) = fração da MS ou FDN degradada no tempo “t” (%); a = fração solúvel (%); b = fração insolúvel, mas potencialmente degradável no rúmen (%);  $k_d$  = taxa de degradação da fração b ( $\%h^{-1}$ ); t = tempo de incubação (h).

As análises dos resíduos de incubação foram realizadas utilizando o procedimento NLIN do SAS (SAS Inst., Cary, 2013), a partir do algoritmo Marquardt para obter os parâmetros das equações de regressão não lineares. Os dados de pH, N-NH<sub>3</sub>, PS, Pmic e AGVs foram analisados conforme um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, dois tratamentos e cinco tempos de incubação. As rodadas foram bloqueadas e adicionadas ao modelo como efeito aleatório. Os graus de liberdade foram ajustados pelo método Kenwardroger de primeira ordem.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. Experimento 1

A suplementação com AACR não afetou a DIVMS e DIVFDN ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3). Esperava-se que os AACR, ao serem desaminados e descarboxilados em AGVCR, estimulasse o crescimento de bactérias fibrolíticas mais rapidamente, e maximizasse a digestibilidade da MS e da FDN da dieta com alto volumoso, a exemplo de Puastuti et al. (2018), que obtiveram maior digestibilidade da MS e do FDN do sabugo de milho amonizado, suplementado com 5% de melaço e com AACR (0,2% de valina, 0,2% de leucina e 0,1% de isoleucina na MS), *in vitro*.

A composição da dieta pode ter sido um dos fatores que tenha influenciado no resultado de digestibilidade da MS e da FDN nesse estudo. A presença de proteína verdadeira compondo a PDR (Tabela 1) pode ter atendido as exigências de AACR e AGVCR dos microrganismos ruminais. Já no estudo de Puastuti et al. (2018), a fonte de PDR era em grande proporção composto por nitrogênio não proteico, aumentando a demanda de AGVCR pelos microrganismos ruminais e permitindo melhor respostas da suplementação com os AACR. Roman-Garcia et al. (2021) também não observaram aumento da taxa de degradação da FDN em duas dietas (feno de capim + milho e feno alfafa + milho), com relação volumoso:concentrado de 50:50 *in vitro*, suplementada com 15,4 mg AACR. A presença de

proteína verdadeira na PDR no estudo de Roman-Garcia et al. (2021) pode ter afetado o efeito da suplementação com os AACR como nesse estudo.

**Tabela 3.** Valores da digestibilidade da matéria seca e digestibilidade da fibra em detergente neutro em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos (% AACR)					EQM	P-valor		
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2		LIN	QUA	CUB
DIVMS <sup>A</sup> (g/kg)	686,51	697,74	680,32	708,41	693,69	8,506	0,369	0,843	0,599
DIVFDN <sup>B</sup> (g/kg)	555,59	553,83	534,81	567,77	553,59	9,015	0,734	0,431	0,299

<sup>A</sup>DIVMS = digestibilidade da matéria seca; <sup>B</sup> DIVFDN = digestibilidade da fibra em detergente neutro; EQM = erro quadrático médio; LIN = efeito linear; QUA = efeito quadrático; CUB = efeito cúbico.

Os 4 tratamentos suplementados com os AACR diferiram ( $P < 0,05$ ) para pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub> mg/dL), proteína solúvel (PS) e proteína microbiana (Pmic) em relação ao controle (Tabela 4). O pH teve um comportamento linear ( $P = 0,001$ ) crescente à medida que a concentração de AACR foi aumentando. Esse mesmo comportamento foi observado nas variáveis N-NH<sub>3</sub> e PS, exceto para Pmic, onde foi observado um comportamento linear ( $P = 0,002$ ) decrescente.

Segundo Lana et al. (1998), microrganismos ruminais alimentados com dietas com alta relação volumoso:concentrado apresentam maior taxa de degradação da proteína degradável no rúmen (PDR) e desaminação dos aminoácidos, liberando amônia no ambiente ruminal. Segundo Firkins (2021), a suplementação com AACR pode estimular a abundância de grupos proteolíticos. Neste estudo, observa-se que dois fatores podem ter influenciado a degradação da proteína e a desaminação de aminoácidos no rúmen, a relação volumoso:concentrado e a suplementação com AACR.

Uma maior degradação da PDR da dieta pode ser comprovada pela maior concentração de PS e N-NH<sub>3</sub> encontrada (Lana et al., 2000a). O aumento na concentração de N-NH<sub>3</sub> influenciou no aumento do pH por causa do seu feito alcalinizante (Zinn et al., 2003). Segundo Lana et al. (2000b) a acidificação do meio exerce papel fundamental na diminuição da atividade proteolítica e desaminadora no rúmen e no metabolismo do nitrogênio, incluindo produção de amônia e crescimento microbiano. O resultado encontrado ao suplementar com

AACR esse perfil dietético, levou a um resultado oposto ao discutido por Lana et al. (2000b), a medida que no presente trabalho houve uma alcalinização do meio pelo acúmulo do N-NH<sub>3</sub> no sistema, que diminuiu a Pmic.

**Tabela 4.** Valores de pH, nitrogênio amoniacal, proteína solúvel e proteína microbiana em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos (% AACR)					EPM	P-valor		
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2		LIN	QUA	CUB
pH	6,70	6,87	6,76	6,97	6,96	0,033	0,001	0,824	0,508
N-NH <sub>3</sub> <sup>A</sup> (mg/dL)	1,91	3,15	4,51	5,48	7,39	0,202	0,001	0,228	0,218
PS <sup>B</sup> (µg/mL)	111,56	113,03	134,97	115,57	134,94	2,875	0,001	0,614	0,062
Pmic <sup>C</sup> (µg/mL)	112,33	103,73	102,32	107,81	69,657	6,93	0,002	0,059	0,051

<sup>A</sup>N-NH<sub>3</sub> = nitrogênio amoniacal; <sup>B</sup>PS = proteína solúvel; <sup>C</sup>Pmic = proteína microbiana; EPM = erro padrão médio; LIN = efeito linear; QUA = efeito quadrático; CUB = efeito cúbico.

Uma possível explicação para o aumento do pH, é que em sistema fechado de incubação *in vitro*, não há absorção da amônia produzida e nem taxa de passagem como ocorre no rúmen (Brandao et al., 2020), causando um impacto mais relevante no pH do meio, fato esse que seria minimizado em condições de digestibilidade *in situ* e *in vivo*, podendo gerar resultados diferentes do encontrado nesse estudo.

A produção de AGV total e propionato não foi afetada ( $P > 0,05$ ) pela adição de AACR em relação ao controle (Tabela 5). No entanto, foi observado efeitos quadráticos ( $P = 0,017$ ) para o acetato e um efeito cúbico ( $P = 0,005$ ) para butirato. E as concentrações de isobutirato e isovalerato obtiveram efeitos quadrático ( $P < 0,05$ ). Ao suplementar com AACR, os AGVCR (isobutirato e isovalerato) apresentaram um comportamento crescente em relação ao controle. Era esperado maior produção de AGV total e alteração na relação acetato:propionato, que não foi observado ( $P > 0,05$ ), ao utilizar os suplementos com AACR em uma dieta com alta inclusão de volumoso. Em seu estudo, Roman-Garcia et al. (2021) também não obtiveram diferenças significativas na produção total de AGV e na relação

acetato:propionato, ao suplementar com AACR dietas com relação volumoso: concentrado de 50:50.

**Tabela 5.** Valores dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta e de cadeia ramificada em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos (% AACR)					EPM	P-valor		
	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2		LIN	QUA	CUB
	mmol/L								
AGV totais <sup>A</sup>	47,19	47,76	48,68	45,45	44,46	1,608	0,146	0,244	0,715
Acetato	34,38	33,89	35,28	32,82	31,35	0,579	0,001	0,017	0,633
Propionato	6,10	7,46	6,52	5,79	6,33	1,350	0,780	0,784	0,417
Butirato	5,52	5,17	5,40	5,32	5,18	0,063	0,023	0,636	0,005
Isobutirato	0,30	0,46	0,53	0,54	0,54	0,037	0,001	0,016	0,512
Isovalerato	0,62	0,79	0,95	0,98	1,04	0,038	0,001	0,025	0,697
A:P <sup>B</sup>	7,26	5,69	5,43	5,69	5,07	1,119	0,235	0,568	0,544
	Proporção, %								
Acetato	73,13	71,47	72,47	72,21	70,57	1,897	0,476	0,864	0,510
Propionato	12,61	14,99	13,38	12,73	14,17	2,268	0,905	0,913	0,410
Butirato	12,30	10,90	11,10	11,71	11,69	0,383	0,725	0,043	0,085

<sup>A</sup>AGV total = ácidos graxos voláteis totais; <sup>B</sup>A:P = relação acetato:propionato; EPM = erro padrão médio; LIN = efeito linear; QUA = efeito quadrático; CUB = efeito cúbico.

O aumento nas concentrações de AGVCR e N-NH<sub>3</sub> no meio ruminal é um indicativo que o grau de desaminação superou o grau de assimilação bacteriana desses compostos (Apajalahti et al., 2019). A suplementação de AACR levou a um estímulo de populações proteolíticas, que são as grandes responsáveis por utilizar da proteína verdadeira da PDR dietética, como fonte de energia e excretar AGVCR e N-NH<sub>3</sub> no meio.

O estímulo a populações proteolíticas e não as populações aminolíticas e principalmente celulolíticas, e o aumento do pH (Firkins, 2021; Lana et al., 2000b, 1998), tiveram efeito negativo sobre o crescimento microbiano ruminal, observado pelo decréscimo da quantidade de Pmic, não permitindo que maiores taxa de fermentação da dieta ocorresse e, com isso, não houve efeito na produção total de AGV, como na relação acetato:propionato, indicativo de eficiência do ponto de vista energético no ambiente ruminal.

## 2.2. Experimento 2

Não foi observado efeito das suplementações de AACR e AGVCR ( $P > 0,05$ ) sobre a digestibilidade das frações A e B<sub>1</sub> da MS da dieta, bem como para a digestibilidade das frações B<sub>2</sub> e I da FDN (Tabela 6 e 7). Na Tabela 6, observa-se que a suplementação com os AACR e com AGVCR não maximizou o desaparecimento da fração solúvel (fração A) e nem da fração insolúvel potencialmente degradável (fração B<sub>1</sub>) da dieta. Esses resultados são devidos as duas frações serem muito fermentáveis e a rápida fermentação delas no meio se tornar um estímulo muito eficiente para que os microrganismos não celulolíticos tenham crescimento ótimo, independente da suplementação com AACR e AGVCR.

No entanto, era esperado que a suplementação com AACR e AGVCR estimulasse maior crescimento da população celulolítica e, como consequência, maior digestibilidade da fração B<sub>2</sub> (fração insolúvel potencialmente degradável), entretanto, este comportamento não foi observado nesse estudo (Tabela 7). Segundo Copelin et al. (2021), as condições dietéticas influenciam o mecanismo AGVCR. Se a PDR dietética está atendendo às necessidades dos microrganismos ruminais para AACR ou AGVCR derivados dele, então uma resposta de suplementação com AACR e AGVCR na digestibilidade da FDN é minimizado ou até anulado.

**Tabela 6.** Valores de degradação da matéria seca em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Parâmetros	Tratamentos			EPM	P-valor
	C <sup>A</sup>	AACR <sup>B</sup>	AGVCR <sup>C</sup>		
A <sup>D</sup> (g/kg)	223,40	212,40	212,70	5,390	0,240
B <sub>1</sub> <sup>E</sup> (g/kg)	557,40	576,00	571,80	6,730	0,112
$\lambda^F$ (h <sup>-1</sup> )	0,10	0,10	0,10	0,003	0,986

<sup>A</sup>C = controle; <sup>B</sup>AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; <sup>C</sup>AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada; <sup>D</sup>A = fração solúvel; <sup>E</sup>B<sub>1</sub>= fração insolúvel, mas potencialmente degradável; <sup>F</sup> $\lambda$  = taxa fracionária combinada de degradação da matéria seca potencialmente degradável; EPM = erro padrão médio; LIN = efeito linear; QUA = efeito quadrático; CUB = efeito cúbico.

Puastuti et al. (2018) obtiveram maior digestibilidade da MS e do FDN do sabugo de milho amonizado, suplementado com 5% de melaço e com AACR (0,2% de valina, 0,2% de leucina e 0,1% de isoleucina na MS), *in vitro*. Dieta essa que não atenderia as exigências em

macronutrientes de vacas em lactação, como é o caso do nosso estudo. Castro et al. (2021) ao tentarem estimular a digestibilidade de dietas balanceada para animais em condições de pastejo contínuo, contendo feno de forrageira tropical e suplementação proteica e energética, também não conseguiram maximizar o desaparecimento da fração B<sub>2</sub> pelos microrganismos celulolíticos *in vitro*, assim como no nosso estudo. No entanto, Roman-Garcia et al. (2021) encontraram maior digestibilidade em feno de grama de pomar + milho moído, suplementados com AGVCR em incubação *in vitro* de 24 horas.

**Tabela 7.** Valores de degradação da fibra em detergente neutro em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Parâmetros	Tratamentos			EPM	P-valor
	C <sup>A</sup>	AACR <sup>B</sup>	AGVCR <sup>C</sup>		
B <sub>2</sub> <sup>D</sup> (g/kg)	721,40	732,50	729,60	9,130	0,135
I <sup>E</sup> (g/kg)	278,60	267,50	270,40	7,619	0,763
λ <sup>F</sup> (h <sup>-1</sup> )	0,09	0,09	0,09	0,003	0,876

<sup>A</sup>C = controle; <sup>B</sup>AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; <sup>C</sup>AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada; <sup>D</sup>B<sub>2</sub>= fração insolúvel, mas potencialmente degradável; <sup>E</sup>I = fração indigestível; <sup>F</sup>λ = taxa fracionária combinada de degradação da matéria seca potencialmente degradável; EPM = erro padrão médio; LIN = efeito linear; QUA = efeito quadrático; CUB = efeito cúbico.

Diferente da dieta utilizada por Roman-Garcia et al. (2021), a dieta utilizada nesse estudo tem inclusão de 11,3% de farelo de soja (Tabela 1), fonte de AACR degradável no rúmen, que podem ter fornecido a quantidade exigida de AGVCR pelas bactérias celulolíticas. Segundo Copelin et al. (2021), as dietas devem atender as exigências de amido e de FDN adequadamente, para maximizar o benefício da adição de AACR e AGVCR. A dieta experimental foi formulada para atender as exigências de NDT maximizando o uso de forragem, e isso gerou um déficit de 43,62% de amido em relação ao estabelecido pelo NRC (2001), que foi de 30% da matéria seca. Desta forma, o déficit de amido limitou a quantidade de carboidrato de fermentação mais rápida, podendo ter gerado um déficit energético a nível ruminal.

Não foram observados efeitos de tratamento, mas houve efeito de tempo sobre o pH, PS e Pmic (Tabela 8; P ≤ 0,002). À medida que a dieta vai sendo fermentada a população microbiana tende a crescer e produz maiores concentração de AGV, que levam a uma queda no pH do meio ruminal. Além disso, a degradação da PDR da dieta pelas bactérias

proteolíticas vai aumentando a concentração de proteína solúvel. Castro et al. (2021) e Dijkstra et al. (2012) observaram o mesmo comportamento para o pH ao longo dos tempos de fermentação, associado as maiores produções dos AGV pelo crescimento das populações microbianas.

A concentração de N-NH<sub>3</sub> teve um efeito de interação ( $P = 0,027$ ; Figura 1). Até as 12h de incubação, a concentração de N-NH<sub>3</sub> foi aumentada em todos os tratamentos, evidenciando que não houve efeito dos suplementos. No entanto, em 24 e 48 horas os AACR e o AGVCR tiveram concentrações maiores de N-NH<sub>3</sub> quando comparados ao controle. O aumento de N-NH<sub>3</sub> indica que a suplementação estimulou a degradação de PDR e a desaminação dos aminoácidos em relação ao controle a partir de 24 horas. Acredito que esse resultado tenha ocorrido pelo estímulo a diferentes populações proteolíticas ruminais quando o meio foi suplementado com os AACR e o AGVCR. À medida que a concentração de energia disponível no sistema diminui ao longo do tempo de fermentação, um estímulo da utilização de proteínas como fonte de energia pode ter sido gerado nas populações proteolíticas, aumentando a concentração de N-NH<sub>3</sub> após a desaminação dos aminoácidos dietéticos (Russell, 2002).

Acetato, propionato, isobutirato, isovalerato foram influenciados pelo o tratamento ( $P < 0,05$ ) e butirato teve uma tendência ( $P = 0,085$ ). Além disso, a concentração total de AGV e suas concentrações individuais e a proporção de propionato foram aumentados ao longo do tempo ( $P = 0,001$ ; Tabela 9). No entanto, houve uma redução na relação acetato:propionato de 24 para 48 horas ( $P = 0,001$ ), e na proporção de acetato e butirato ( $P = 0,001$ ) produzido.

Apesar dos efeitos encontrados para acetato, propionato, isobutirato, isovalerato e a tendencia de butirato, a produção total de AGV não foi alterada pelas suplementações, como também a relação acetato:propionato, que são parâmetros mais concretos para avaliarmos as condições de eficiência da fermentação no rúmen. Roman-Garcia et al. (2021) também não obtiveram efeito para a concentração total de AGV e para a relação acetato:propionato quando suplementou o meio com AACR, AGVCR e diferentes combinações entre os AGVCR em duas dietas com relação volumoso:concentrado de 50:50, mesmo com efeito para a DIVFDN em uma das suplementações com AGVCR. No entanto, Zhang et al. (2013) observaram aumento de 28,23% na produção total de AGV ao suplementar com 2 mmol/L de valina, 16,50% com 2 mmol/L de leucina e 9,34% com 2 mmol/L com isoleucina, palhada de trigo mesmo sem efeito para DIVMS e DIVFDN.

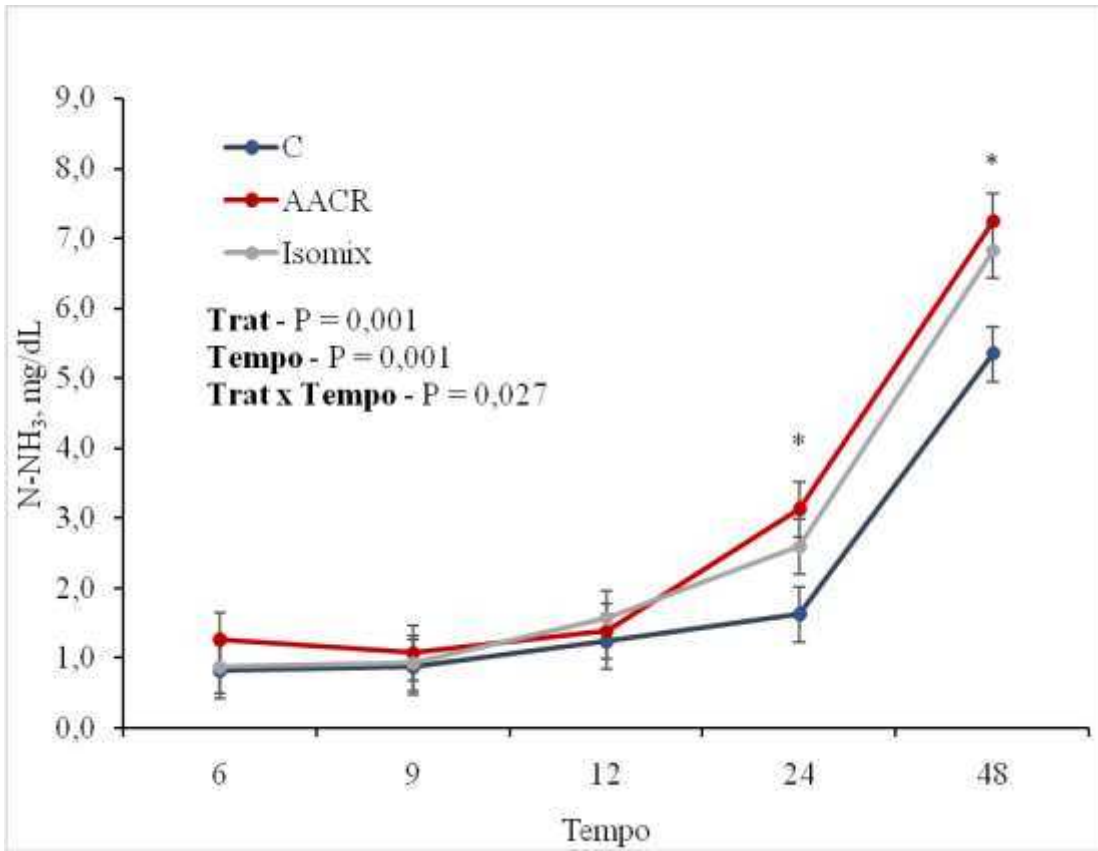
A produção de AGV está diretamente ligada a fermentação dos carboidratos pelos microrganismos ruminais. Tanto a produção total quando as proporções dos AGVs variam de acordo com as populações microbianas que estão sendo favorecidas pelo pH, substrato encontrado na dieta, etc. Acredito que os estímulos gerados nas populações proteolíticas pelas suplementações de AACR e AGVCR e a alta relação volumoso:concentrado da dieta (Firkins, 2021; Lana et al., 1998), e a quantidade deficiente de amido que foi gerada nesse estudo (Copelin et al., 2021), geraram maior degradação da proteína verdadeira da PDR como fonte de energia por essas populações (Russell, 2002) e competindo com as celulolíticas pelos AGVCR suplementado. Assim, não possibilitando um aumento na DIVFDN e na produção de AGV totais, além de alteração na relação acetato:propionato.

De maneira geral, as suplementações com concentrações crescente de AACR (experimento 1), e AACR e AGVCR (experimento 2) não apresentaram efeitos na DIVMS e na DIVFDN, na produção de AGV total e na relação entre acetato:propionato. No entanto, ambos os ensaios *in vitro* tiveram efeito sobre a concentração de N-NH<sub>3</sub> para os diferentes tratamentos nesse estudo.

**Tabela 8.** Valores de pH, proteína solúvel e proteína microbiana em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos			Tempo (horas)					EPM	P-valor		
	C <sup>A</sup>	AACR <sup>B</sup>	AGVCR <sup>C</sup>	6	9	12	24	48		TRAT	TEMPO	INT
pH	6,95	6,99	7,01	7,10 a	6,98 bc	6,88 c	7,01 ab	6,96 bc	0,037	0,377	0,002	0,314
PS <sup>D</sup> (µg/mL)	62,60	63,89	60,36	48,80 cd	46,33 d	62,19 bc	80,44 a	73,66 ab	6,431	0,816	0,001	0,573
Pmic <sup>E</sup> (µg/mL)	120,73	110,43	112,01	82,52 c	92,93 bc	117,84 ab	140,44 a	138,21 a	9,541	0,578	0,001	0,714

<sup>A</sup>C = controle; <sup>B</sup>AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; <sup>C</sup>AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada; <sup>D</sup>PS = proteína solúvel; <sup>E</sup>Pmic = proteína microbiana; EPM = erro padrão médio; TRAT = efeito de tratamento; TEMPO = efeito de tempo; INT = efeito de interação tratamento por tempo.



**Figura 1.** Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub> - mg/dL) em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. C = controle; AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada.

**Tabela 9.** Valores dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta e de cadeia ramificada em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos			Tempo					EPM	P-valor		
	C <sup>A</sup>	AACR <sup>B</sup>	AGVCR <sup>C</sup>	6	9	12	24	48		TRAT	TEMPO	INT
	mmol/L											
AGV totais <sup>D</sup>	31,33	29,21	29,05	17,57 d	20,48 cd	23,47 c	39,24 b	48,55 a	2,350	0,153	0,001	0,495
Acetato	24,18 a	22,11 b	22,04 b	14,68 e	16,88 d	19,47 c	28,74 b	34,12 a	1,728	0,019	0,001	0,334
Propionato	2,56 a	1,89 b	2,22 ab	0,08 c	0,18 c	0,12 c	3,50 b	7,22 a	0,388	0,037	0,001	0,261
Butirato	3,92	3,71	3,46	2,23 d	2,78 c	3,26 c	4,83 b	5,40 a	0,379	0,085	0,001	0,829
Isobutirato	0,22 b	0,24 b	0,39 a	0,19 c	0,21 bc	0,20 bc	0,28 b	0,55 a	0,033	0,001	0,001	0,674
Isovalerato	0,46 b	0,56 b	0,93 a	0,40 c	0,43 c	0,42 c	0,75 b	1,26 a	0,067	0,001	0,001	0,824
A:P <sup>E</sup>	6,07	6,19	6,44				7,68 a	4,79 b	0,257	0,624	0,001	0,639
	proporção, %											
Acetato	79,47	79,69	78,21	83,68 a	82,55 a	82,95 a	76,02 b	70,41 c	0,805	0,089	0,001	0,819
Propionato	5,59	4,68	5,14	0,54 c	0,76 c	0,49 c	9,03 b	14,86 a	0,648	0,365	0,001	0,586
Butirato	12,99 a	12,96 a	12,40 b	13,25 b	13,53 ab	13,84 a	12,29 c	11,01 d	0,403	0,018	0,001	0,466

<sup>A</sup>C = controle; <sup>B</sup>AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; <sup>C</sup>AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada; <sup>D</sup>AGV totais = ácidos graxos voláteis totais; <sup>E</sup>A:P = relação acetato:propionato; EPM = erro padrão médio; TRAT = efeito de tratamento; TEMPO = efeito de tempo; INT = efeito de interação tratamento por tempo.

### 3. CONCLUSÃO

A suplementação de AACR em níveis crescentes de até 1,2% da MS reduziu a massa proteica microbiana e não maximizou a digestibilidade da MS, FDN e a produção total de AGV. No entanto, gerou maior degradação da PDR, aumentando a proteína solúvel e o nitrogênio amoniacal.

A suplementação com AACR e AGVCR não estimulou o crescimento da proteína microbiana, de AGV total e a degradação das frações A, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da dieta. No entanto, aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal.

Dessa forma, diminuir a PDR da dieta com relação volumoso:concentrado na proporção de 70:30, pode levar a deficiência de AGVCR e melhorar a utilização da suplementação de AACR e AGVCR.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, M.J., 1978. Production of branched chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 872–877. <https://doi.org/10.1128/aem.35.5.872-877.1978>
- Apajalahti, J., Vienola, K., Raatikainen, K., Holder, V., Moran, C.A., 2019. Conversion of Branched-Chain Amino Acids to Corresponding Isoacids - An in vitro Tool for Estimating Ruminant Protein Degradability. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00311>
- Baldwin, R.L., Allison, M.J., 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57 Suppl 2, 461–477. <https://doi.org/10.2527/jas1987.652557x>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 254, 248–254.
- Brandao, V.L.N., Marcondes, M.I., Faciola, A.P., 2020. Comparison of microbial fermentation data from dual-flow continuous culture system and omasal sampling technique: A meta-analytical approach. *J. Dairy Sci.* 103, 2347–2362. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17107>
- Castro, M.M.D., Cardoso, M.A., Detmann, E., Fonseca, M.A., Sampaio, C.B., Marcondes, M.I., 2021. In vitro ruminal fermentation and enteric methane production of tropical forage added nitrogen or nitrogen plus starch. *Anim. Feed Sci. Technol.* 275, 114878. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114878>
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130–132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- Copelin, J. E., Firkins, J. L., Socha, M. T., and Lee, C., 2021. Effects of diet fermentability

- and supplementation of 2-hydroxy- 4- ( methylthio ) -butanoic acid and isoacids on milk fat depression : 1 . Production , milk fatty acid profile , and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 104, 1591–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18949>
- Detmann, E.; Souza, M.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.; Cabral, L.; Pina, L.; Ladeira, M.; Azevedo, J., 2012. Métodos para Análise de Alimentos. Visconde do Rio Branco.
- Dijkstra, J., Ellis, J.L., Kebreab, E., Strathe, A.B., López, S., France, J., Bannink, A., 2012. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH  $\mathcal{C}$ . *Anim. Feed Sci. Technol.* 172, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.005>
- Ellis, W. C., Matis, J. H., Hill, T. M., and Murphy, M.R., 1994. Methodology for Estimating Digestion and Passage Kinetics of Forages. <https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c17>
- Firkins, J.L., 2021. INVITED REVIEW: Advances in rumen efficiency\*. *Appl. Anim. Sci.* 37, 388–403. <https://doi.org/10.15232/aas.2021-02163>
- Firkins, J.L., 2010. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 445–457. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300049>
- Fox, D.G.& T.L.O., 2009. Predicting Dietary Amino Acid Adequacy for Ruminants, in: *Amino Acids in Animal Nutrition*. Ithaca, New York, USA, pp. 402–423. <https://doi.org/10.1079/9780851996547.0237>
- Lana, R.D.P., Da Cunha, L.T., Borges, A.C., 2000a. Efeito da Monensina na Fermentação da Proteína de Algumas Fontes de Alimentos. *Rev. Bras. Zootec.* 29, 1868–1875. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982000000600036>
- Lana, R.D.P., Tavares, L., Borges, A.C., 2000b. Efeito da Acidez no Controle da Produção de Amônia e Crescimento Microbiano 1 Acidity Effect ( pH ) in Regulating Ammonia Production and Microbial Growth. *Rev. Bras. Zootec.* 29, 1876–1882.
- Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The Role of pH in Regulating Ruminant Methane and Ammonia Production. *J. Anim. Sci.* 76, 2190–2196. <https://doi.org/10.2527/1998.7682190x>
- McDougall, E.I., 1947. THE COMPOSITION AND OUTPUT OF SHEEP'S SALIVA. *Biochem. JOURNAL*, 43, 104–108.
- Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217–1240. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>
- Milgen, J. Van, Murphy, M.R., Berger, L.L., 1991. A Compartmental Model to Analyze Ruminant Digestion. *J. Dairy Sci.* 74, 2515–2529. <https://doi.org/10.3168/jds.S0022->

0302(91)78429-4

- NRC, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, National Academies Press. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch9>
- Ørskov, E. R., & McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92, 499–503.
- Puastuti, W., Yulistiani, D., Handiwirawan, E., 2018. Supplementation of molasses and branched-chain amino acid to increase in vitro digestibility of ammoniated corn cob in ruminants feed. *J. Ilmu Ternak dan Vet.* 22, 179. <https://doi.org/10.14334/jitv.v22i4.1664>
- Rodriguez, R.N., 2011. *Sas. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 1–11. <https://doi.org/10.1002/wics.131>
- Roman-Garcia, Y., Denton, B.L., Mitchell, K.E., Lee, C., Socha, M.T., Firkins, J.L., 2021. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. I: Comparison with branched-chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures. *J. Dairy Sci.* 104, 6739–6755. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20054>
- Russell, J.B., 2002. *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*, 1<sup>a</sup>. ed. Ithaca, NY.
- Salinas Laura, S.A., 2021. Isomix e virginiamicina sobre a fermentação ruminal in vitro. Locus UFV. Universidade Federal de Viçosa.
- Siegfried, R., Ruckemann, H., & Stumpf, G., 1984. Method for the determination of organic-acids in silage by high-performance liquid-chromatography..pdf. *Landwirtsch. Forsch.* 37, 298–304.
- Silva, T.E., 2016. Avaliação de métodos in vitro e modelos matemáticos para mensuração da digestibilidade da matéria seca e da fibra em alimentos para bovinos. Locus UFV. Universidade Federal de Viçosa.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. a Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Val Neto, E.R., 2009. Ácidos Graxos Voláteis De Cadeia Ramificada Na Nutrição De Bovinos. Universidade Federal de Viçosa.
- Wang, M. zhi, WANG, H. rong, CAO, H. chun, LI, G. xiang, ZHANG, J., 2008. Effects of Limiting Amino Acids on Rumen Fermentation and Microbial Community In vitro. *Agric. Sci. China* 7, 1524–1531. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60412-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60412-5)
- Zhang, H.L., Chen, Y., Xu, X.L., Yang, Y.X., 2013. Effects of Branched-chain Amino Acids on In vitro Ruminal Fermentation of Wheat Straw. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 26, 523–528. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12539>
- Zinn, R.A., Barrajas, R., Montano, M., Ware, R.A., 2003. Influence of dietary urea level on

digestive function and growth performance of cattle fed steam-flaked barley-based finishing diets. *J. Anim. Sci.* 81, 2383–2389. <https://doi.org/10.2527/2003.81102383x>