

DIEGO MAURICIO PAEZ BERNAL

**DINÂMICA DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA FIBRA EM DETERGENTE
NEUTRO DE CAPIM-BRAQUIÁRIA EM FUNÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO
COM DIFERENTES FONTES DE COMPOSTOS NITROGENADOS E
CARBOIDRATOS**

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS –BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P127d
2007

Paez Bernal Diego, Mauricio, 1979-

Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos / Diego Mauricio Paez Bernal – Viçosa, MG, 2007.

ix, 41f. : il. ; 29cm.

Orientador: Augusto César de Queiroz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de corte - Nutrição. 2. Suplementos dietéticos. 3. Fibras na nutrição animal. 4. Proteínas na nutrição animal. 5. Carboidratos na nutrição animal. 6. Pastagens. I. Universidade federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2085

DIEGO MAURICIO PAEZ BERNAL

**DINÂMICA DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA FIBRA EM DETERGENTE
NEUTRO DE CAPIM-BRAQUIÁRIA EM FUNÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO COM
DIFERENTES FONTES DE COMPOSTOS NITROGENADOS E
CARBOIDRATOS**

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: 20 de julho de 2007.

Prof. Edenio Detmann
Co-Orientador

Prof. Mário Fonseca Paulino
Co-Orientador

Prof. Rogério de Paula Lana

Dra. Lara Toledo Henriques

Prof. Augusto César de Queiroz
Orientador

A Deus.

Aos meus pais Luis e Cielo.

Aos meus irmãos Luis e Gustavo.

À minha amada noiva Claillene.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e todas as suas bençãos.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus pais Luis e Cielo, pela confiança, pelo apoio moral e econômico e, sobretudo, pelo carinho e pelo amor incondicional.

A “meu amore” Claillene, pelo amor, pela esperança que representa em minha vida e pelos gratos momentos que já vivemos e os que viveremos até que a morte nos separe.

Ao professor Edenio Detmann, pela paciência e dedicação e por todas as horas dedicadas a este trabalho.

Ao professor Augusto César de Queiroz, pela orientação e pela agradável convivência.

Aos professores Mário Paulino e Rogério Lana e a Lara Toledo, por estarem sempre dispostos a colaborar, pelos ensinamentos e pela valiosa participação na banca.

À colega Viviane Costa, pelas orientações básicas para a realização deste estudo.

Aos funcionários do laboratório, pelas orientações e colaboração prestadas.

Aos meus irmãos Luis, pela agradável convivência, pela companhia e pelo apoio nos anos vividos em Viçosa, e Gustavo, por cuidar de casa enquanto nós estivemos fora.

À turma dos Colombianos em Viçosa, pelos gratos momentos, em especial aos amigos Juan Felipe, Alejandro, Omar, Gloria, Pilar Ximena e Carolina.

Ao colega Bruno Ramalho Vieira, “Brunão”, pela confiança, pelo apoio e por lembrar de mim para estudar e para tomar “uma”... pela amizade.

A Karina, Juliana, Nívea, Anderson, Márcia, Marjorrie, Dawson, Marinaldo, Edson, André, Jobsom, Charles e demais colegas da Pós-Graduação, pela boa acolhida, pela paciência com meu “portunhol” e pelas orientações, ajudas, conversas e gratos momentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DIEGO MAURICIO PAEZ BERNAL, filho de Luis Asdrubal Paez e Cielo Bernal de Paez, nasceu em Bogotá, Colômbia, no dia 23 de setembro de 1979. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade La Salle em 1997, obtendo o título de Zootecnista em 2003. Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2007.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	Vi
ABSTRACT.....	Viii
Introdução Geral.....	1
Referências.....	4
Capítulo 1 - Dinâmica de degradação <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de nitrogênio e carboidratos	
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	14
Conclusão.....	20
Literatura Citada.....	21
Capítulo 2 - Dinâmica de degradação <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com nitrogênio não-protéico e proteína verdadeira	
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	32
Conclusão.....	37
Literatura Citada.....	37
CONCLUSÕES GERAIS.....	41

RESUMO

PAEZ BERNAL, Diego Mauricio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.

Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos. Orientador: Augusto Cesar de Queiroz. Co-Orientadores: Edenio Detmann e Mário Fonseca Paulino.

Efetuarão-se dois experimentos com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação protéica e/ou energética sobre a utilização dos carboidratos fibrosos de forragem de alta qualidade pelos microrganismos ruminais. No experimento 1, objetivou-se estudar a dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) de alta qualidade em função de suplementação com diferentes fontes de carboidratos (amido ou pectina) e/ou diferentes fontes de compostos nitrogenados (caseína ou uréia). O experimento simulou a suplementação para bovinos em terminação sob pastejo durante o período das águas (70% de forragem e 30% de concentrado, com base na MS). O concentrado referente ao tratamento base foi formulado de modo que apresentasse 30% de PB, utilizando-se amido, como componente energético, e caseína, como componente protéico. Os outros tratamentos foram construídos a partir da omissão do fornecimento das fontes protéica e/ou energética do suplemento, associando-se ainda a substituição total do amido por pectina e da PB oriunda da caseína por PB oriunda da mistura uréia:sulfato de amônio (9:1). Dessa forma, nove foram os tratamentos avaliados: 1: forragem; 2: forragem + amido; 3: forragem + pectina; 4: forragem + caseína; 5: forragem + caseína + amido (tratamento referência); 6: forragem + caseína + pectina; 7: forragem + uréia; 8: forragem + uréia + amido; e 9: forragem + uréia + pectina. Os tratamentos foram avaliados em ambiente ruminal simulado por incubação *in vitro*, sendo submetidos a diferentes tempos de incubação: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. O procedimento foi repetido quatro vezes, perfazendo o total de quatro avaliações por tempo de incubação para cada tratamento. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de FDN e interpretados por intermédio de modelo logístico não-linear. Verificou-se que a suplementação exclusiva com carboidratos produziu efeito inibitório sobre a taxa de degradação (kFDNpd) e sobre o crescimento dos microrganismos sobre a FDN potencialmente degradável (FDNpd) em comparação ao tratamento basal (forragem), sendo verificadas reduções de 6,9 e 13,6% e 2,7 e 4,8% para a suplementação exclusiva com amido e pectina, respectivamente. A adição isolada de caseína ao meio de incubação reduziu a kFDNpd em 13,6%. A adição de caseína propiciou pH similar ao

obtido somente com forragem e incrementou a disponibilidade de nitrogênio amoniacal. Assim, o efeito negativo da caseína sobre kFDNpd pôde ser atribuído a interações amensais entre espécies microbianas, sendo denominado “efeito proteína”. A suplementação conjunta com caseína e amido ou pectina permitiu a manutenção de kFDNpd em patamares superiores aos observados com a suplementação isolada com esses compostos, embora ainda inferiores ao observado no tratamento basal. A adição de uréia elevou a kFDNpd em 8,2%, em razão da melhor adequação físico-química do ambiente de fermentação e da possível ausência de relações amensais entre espécies microbianas. No experimento 2, visou-se estudar a dinâmica da degradação *in vitro* da FDN de capim-braquiária de alta qualidade em função de suplementação com duas diferentes fontes de carboidratos (amido ou pectina) e diferentes relações proteína verdadeira: nitrogênio não-protéico (NNP). Os procedimentos de avaliação, em termos da relação forragem: concentrado e composição do concentrado base, foram similares aos do experimento 1. Os tratamentos foram construídos a partir da substituição fracional (0, 1/3, 2/3 e 1) da PB do suplemento oriunda da caseína por PB fornecida pela mistura uréia:sulfato de amônia (9:1) (U:SA), associando-se ainda a substituição total do amido por pectina. Dessa forma, oito foram os tratamentos avaliados: A: forragem + caseína + amido; B: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + amido; C: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + amido; D: forragem + U:SA + amido; E: forragem + caseína + pectina; F: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + pectina; G: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + pectina; e H: forragem + U:SA + pectina. Observou-se que a suplementação com uréia elevou em 21,7 e 17,0% as estimativas de kFDNpd obtidas em relação à suplementação com caseína, considerando-se o amido e a pectina como fontes de carboidratos, respectivamente. Contudo, a avaliação do perfil de substituição gradativa permitiu evidenciar valores máximos de taxas de degradação na razão 2/3 U:SA:1/3 caseína. Assim, o equilíbrio entre fontes nitrogenadas nos suplementos pode ampliar a utilização da FDNpd de forragens tropicais de boa qualidade, ao prover a minimização do efeito proteína e permitir o suprimento de peptídeos degradáveis no rúmen para que as exigências das bactérias não-fibrolíticas sejam satisfeitas e para que, a partir de interações positivas entre espécies microbianas, sejam fornecidos substratos essenciais ao crescimento das bactérias fibrolíticas.

ABSTRACT

PAEZ BERNAL, Diego Mauricio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. ***In vitro* degradation dynamics of neutral detergent fiber of signal grass according to supplementation with different sources of nitrogenous compounds and carbohydrates.** Adviser: Augusto Cesar de Queiroz. Co-Advisers: Edenio Detmann and Mário Fonseca Paulino.

Two experiments were carried out to evaluate the utilization of fibrous carbohydrates from high quality grass by ruminal microorganisms. In the first experiment, it was studied the degradation dynamics of neutral detergent fiber (NDF) from high quality signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) according to supplementation with different sources of carbohydrates (starch or pectin) and (or) different sources of nitrogenous compounds (casein or urea). It was simulated the diet of fattening steers feeding at the raining season, including 30% of concentrate supplementation and 70% of forage. The concentrate was formulated to have 30 % of crude protein (CP) by using starch as energetic source and casein as protein source. Other treatments were constructed by suppressing the energetic or the protein sources in the concentrate and replacing starch by pectin and the crude protein (CP) from casein by CP from the mixture of urea and ammonium sulfate (9:1). Therefore, nine treatments were evaluated: 1. forage; 2. forage + starch; 3. forage+ pectin; 4. forage + casein; 5. forage + casein + starch (reference treatment); 6. forage + casein + pectin; 7. forage + urea; 8. forage + urea + starch; and 9. forage + urea + pectin. These treatments were evaluated into ruminal environment simulated by *in vitro* incubation procedure, being submitted to ten different incubation periods: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 hours. The incubation procedure was repeated four times, so there were four evaluations for each incubation period for each treatment. The residual from incubation were analyzed for NDF content, and interpreted by the logistic nonlinear model. It was verified that supplementation including only carbohydrates produced inhibitory effects on degradation rate (kpdNDF). and microorganism growth on potentially degradable NDF (pdNDF) when compared to control treatment (forage). There were reductions of 6.9% and 13.6%; and 2.7% and 4.8% on estimates of these parameters with starch and pectin supplementation, respectively. The isolated addition of casein to the incubation medium reduced kNDFpd 13.6%. Casein addition resulted on a similar pH compared to the observed for the forage

treatment. However, it increased the ammonia nitrogen availability. Moreover, the negative effect of casein on kpdNDF can be attributed to amensalistic interactions among microbial species, denominates “protein effect”. The supplementation including casein and starch or pectin kept the kpdNDF higher than the observed for isolated supplementation with these compounds, even still lower than the kpdNDF from only forage treatment. Urea addition increases kpdNDF 8.2% as a result of the better physical and chemical adequacy of the fermentation environment and the possible absence of amensalistic interactions among microbial species. At the second experiment, it was evaluated the degradation dynamics of NDF from high quality *Brachiaria decumbens* Stapf *in vitro* under supplementation with two sources of carbohydrates (starch or pectin) and different true protein:non-protein nitrogen rates .The experimental materials and procedures were such as in the first experiment. Treatments were constructed from fractional substitution of CP from casein by CP from the urea: ammonium sulfate mixture (9:1) and the substitution of starch by pectin. Therefore, eight treatments were evaluated : A: forage + casein + starch; B: forage + 2/3 CP casein + 1/3 CP U:AS + starch; C: forage + 1/3 CP casein + 2/3 CP U:AS + starch; D: forage + U:AS + starch; E: forage + casein + pectin; F: forage + 2/3 CP casein + 1/3 CP U:AS + pectin; G: forage + 1/3 P casein + 2/3 CB U:AS + pectin; H: forage + U:AS + pectin. Urea supplementation increased 21.7% and 17.0% kpdFDN when compared to casein supplementation for starch and pectin as carbohydrates sources, respectively. Maximum values for kNDFpd were observed for 2/3 U:AS:1/3 casein rate. Therefore, the equilibrium within protein sources into supplements can increase the pdNDF utilization. This behavior would be attributed to lower “protein effect”, higher availability of degradable peptides into the rumen to supply non-fibrolytic bacterium requirements, and occurrence of positive interactions between microbial species which increase the availability of essential substrates for fibrolytic species.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui rebanho bovino de aproximadamente 180 milhões de animais, manejados principalmente a pasto, o qual, por seu baixo custo, permite que o país seja líder mundial em exportação de carne. As forragens tropicais apresentam alto conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN), que oscila, aproximadamente, entre 40 e 75% da matéria seca total, tornando preponderante o estudo de estratégias que otimizem a utilização da fibra pelos bovinos.

O aproveitamento das forragens pelos bovinos está diretamente relacionado à atividade microbiana ruminal, notadamente sobre os compostos fibrosos, a qual dependente do nível de nitrogênio presente no meio (Hafley et al., 1993). Segundo Paulino et al. (2002), a elevada porção de compostos nitrogenados insolúveis em detergente neutro observada em gramíneas tropicais, considerados de lenta e incompleta degradação (Sniffen et al., 1992), pode implicar carência de compostos nitrogenados para que os microrganismos ruminais apresentem bons níveis de produção de proteína microbiana, o que, conseqüentemente, limita o ganho de peso dos animais

De acordo com Russell et al. (1992), se for fornecida fonte de proteína degradável no rúmen (PDR) ou fonte de compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) que atendam às necessidades das bactérias fibrolíticas nas situações nas quais há limitação de nitrogênio, a atividade dessa população aumenta significativamente, pois esta requer amônia como principal fonte de nitrogênio, liberado a partir da degradação ruminal da PDR e do NNP.

Nesse contexto, o aumento do consumo de matéria seca poderá ser provocado pela ampliação na velocidade de degradação dos carboidratos fibrosos potencialmente degradáveis (Lazzarini, 2007). Assim, o incremento no desempenho animal em função da suplementação protéica pode não ser devido apenas ao maior consumo de matéria seca, mas também decorrente de mudanças na digestibilidade ou na eficiência de utilização dos nutrientes.

A ampliação da taxa de degradação da FDN implica redução do tempo necessário para que a partícula fibrosa alcance a faixa de gravidade específica que a habilite a ser retirada do ambiente ruminal (Allen, 1996). Dessa forma, amplia-se a taxa de *turnover* ruminal relativa à fração que efetivamente demanda espaço residente (FDN) (Mertens,

1994), tendo como consequência direta o aumento no consumo e a degradação da FDN oriunda do pasto (Costa, 2006).

Em pastagens tropicais, na época das águas, quando as forrageiras oferecem níveis adequados de proteína, não se esperariam respostas positivas à suplementação com fontes de NNP, pois dentro do marco teórico tradicional vislumbra-se que esses tipos de suplementos causariam excesso de nitrogênio no rúmen, implicando alto custo energético para ser eliminado na forma de uréia (NRC, 1988; Poppi & McLennan, 1995). Em adição, devido à baixa fixação dos compostos nitrogenados em proteína microbiana no período das águas, excesso de compostos cetogênicos poderia ser verificado no metabolismo animal (Leng, 1990). Dessa forma, sem adequado suprimento de energia metabolizável, o excesso de compostos energéticos deve ser eliminado, ampliando a produção de calor corporal e reduzindo o consumo de alimento.

Assim, em teoria, a suplementação com proteína verdadeira não-degradável no rúmen seria estratégia lógica para procurar melhores desempenhos em animais alimentados a pasto na época das águas, pois incrementaria o suprimento de proteína metabolizável ao animal (Poppi & McLennan, 1995). Se isso não for viável, a alternativa proposta seria o fornecimento de fontes energéticas de rápida disponibilidade no rúmen, as quais ampliariam a assimilação de nitrogênio oriundo dos compostos nitrogenados de alta degradabilidade da forragem (Van Vuuren et al., 1990; Poppi & McLennan, 1995; Detmann et al., 2005). Contudo, resultados de estudos recentes conduzidos em condições tropicais têm permitido evidenciar incrementos na produção animal a partir da suplementação com fontes de NNP durante o período favorável ao crescimento da forragem (Balsalobre et al., 1999; Paulino et al., 2002; 2005; Porto, 2005; e Moraes et al., 2005), o que contraria os pressupostos teóricos apresentados anteriormente.

Tendo em vista o exposto, constitui desafio a predição do impacto da suplementação sobre o desempenho animal, uma vez que poucas informações estão disponíveis na literatura nacional a respeito da real influência da suplementação com compostos nitrogenados sobre a dinâmica ruminal dos componentes fibrosos de forragens tropicais de boa qualidade.

A sincronia entre a degradação da proteína e os carboidratos tem sido apontada como a base para o maior aproveitamento dos suplementos nutricionais fornecidos à bovinos em pastejo e confinamento (Russell, 2002). O baixo teor de carboidratos não-fibrosos nas gramíneas tropicais faz com que os carboidratos disponíveis nas forrageiras sejam de lenta degradação. Em adição, na época das águas, a proteína da forragem é

altamente degradável, gerando desbalanço metabólico, que limita o desempenho animal (Santos et al., 2007).

O amido constitui a maior parte dos carboidratos não-fibrosos encontrados nos grãos de cereais. Embora possa proporcionar a quantidade extra de energia requerida para que os microrganismos tenham a possibilidade de assimilar os compostos nitrogenados liberados pela degradação da proteína, tem-se determinado há muito tempo que o amido reduz a degradação da fibra (El-Shazly, 1961; Mertens & Loften, 1980; e Mould et al., 1983).

A queda na degradação ruminal da fibra com a suplementação com carboidratos não-fibrosos pode ser atribuída a dois efeitos distintos, denominados efeito pH e efeito concentrado ou efeito carboidrato (Mould et al., 1983; Arroquy et al., 2005).

No caso do efeito pH, reduções significativas no pH ruminal podem ser responsáveis pela inibição parcial da degradação fibrosa, por comprometerem a condição ideal de meio para o crescimento dos microrganismos fibrolíticos (Mould et al., 1983; Hoover, 1986; Van Soest, 1994). No caso de animais suplementados a pasto, são muitas as pesquisas (Detmann et al., 2001; 2005; Moraes, 2006) em que se verificou que mesmo altos níveis de suplementação não ocasionam queda de pH abaixo dos limites propícios para a atividade celulolítica. A ausência de queda no pH ruminal em animais em pastejo que recebem suplementos ricos em amido parece ser reflexo da alta efetividade física de fibras longas características de forragens sob pastejo, as quais atuam de forma intensa na estimulação do tamponamento ruminal via atividade mastigatória e liberação de saliva.

Por sua vez, o efeito carboidrato parece envolver a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas, em especial entre microrganismos fibrolíticos e aqueles que degradam carboidratos não-fibrosos, resultando em maior proliferação dos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961; Coelho da Silva & Leão, 1979; Mould et al., 1983), o qual se pronuncia em meios deficientes em compostos nitrogenados (El-Shazly et al., 1961). Essa competição conduziria à preferência inicial pela utilização do amido como substrato energético no ambiente ruminal como um todo (El-Shazly et al., 1961), com a transformação gradativa dos carboidratos fibrosos em substratos energéticos predominantes à medida que se reduz a disponibilidade de amido (El-Shazly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; e Arroquy et al., 2005), podendo envolver, concomitantemente, mecanismos de regulação catabólica (Russell & Baldwin, 1978). Por outro lado, alguns autores têm reportado a inibição da atividade de enzimas fibrolíticas em função da presença de amido no meio (Hiltne & Dehority, 1983, citados por

Arroquy et al., 2005; Piwonka & Firkins, 1993), fato que parece estar associado à liberação de compostos inibidores pelos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961), os quais parecem ser de natureza protéica (bacteriocinas) (Piwonka & Finkins, 1993; Kalmokoff et al., 1996).

No entanto, de forma recente, tem-se estabelecido que o efeito carboidrato pode se comportar de forma diferenciada em função da origem química dos carboidratos presentes no suplemento (Arroquy et al., 2005). Dessa maneira, faz-se premente a investigação dos efeitos de carboidratos não fibrosos suplementares de diferentes formas químicas sobre a dinâmica ruminal dos carboidratos fibrosos da forragem, o que permitiria delinear com maior exatidão estratégias de suplementação para a otimização no uso dos substratos energéticos basais, de menor custo (Costa, 2006).

Assim, objetivou-se estudar a dinâmica da degradação *in vitro* da FDN de capim-braquiaria (*brachiaria decumbens* stapf) de alta qualidade em função de suplementação com diferentes fontes de carboidratos (amido ou pectina) e/ou diferentes fontes de compostos nitrogenados (caseína ou uréia).

Referências

- ALLEN, M.S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, p.3063-3075, 1996.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN, R.C.; NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C.; JOHNSON, D.E. Effect of types of non-fiber carbohydrate on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science Technology**, v.120, p.93-106, 2005.
- BALSALOBRE, M.A.A.; SANTOS, P.M.; CORSI, M.; MEDEIROS, S.R.; BANIN R.L. Desempenho de novilhos em crescimento recebendo suplementação a pasto durante o verão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.246
- COELHO da SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocetes, 1979. 380p.
- COSTA, V.A.C.; **Dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragens tropicais em função de suplementação protéica e/ou energética**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, 52p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; LANA, R.P.; QUEIROZ, D.S. Suplementação de novilhos mestiços durante a época das águas: Paramentos ingestivos e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1340-1349, 2001.

- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; ZERVOUDAKIS, J.T; CABRAL L.S; VALADARES, R.F.D . Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante o período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1380-1391, 2005.
- EL-SHAZLY, K; DEHORITY, B.A.; JOHSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.20, p.268-273, 1961.
- HAFLEY, J.L.; ANDERSIN, B.E; KLOPFENSTEIN, T.J. Supplementation of growing cattle grazing warm-season grass with proteins of various ruminal degradabilities. **Journal of Animal Science**, v.71, p.522-529, 1993.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2755-2766, 1986
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? **Journal of Animal Science**, v.79, p.2297-2306, 1996.
- LAZZARINI, I. **Consumo, digestibilidade e dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, 52p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Review**, v.3, p.277-303, 1990.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY J.R., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy, 1994, p.450-493.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p1437-1446, 1980.
- MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R., MANNS, O. Associative effects of mixed feeds I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-30, 1983.
- MORAES,E.H.B.K. **Desempenho, características nutricionais e exigências de bovinos de corte em pastejo, submetidos a diferentes estratégias de suplementação**. Viçosa:UFV, 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- MORAES E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; FIGUEIREDO, D.M; VALADARES FILHO, S.C; DETMANN, E; SALES M.F.L; PORTO, M.O.;LAZZARIN, I.; SOUZA, M.G.; COUTO,V.M.; MORAES K.A.K. Desempenho de novilhos de corte submetidos a diferentes frequências de suplementação no período das águas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais**..Goiânia. Sociedade Brasileira de Zootecnia 2005 (CD ROM).
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6. ed. Washington, DC: Academic Press, 1988. 158p.,

- PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., 2002, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: SIMCORTE, p.153-196, 2002.
- PAULINO, M.F.; MOARES, E.H.B.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ALEXANDRINO, E.; FIGUEIREDO, D.M. Fontes de energia em suplementos múltiplos de auto-regulação de consumo na recria de novilhos mestiços em pastagem de *Brachiaria decumbens* durante período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.3, p. 957-962, 2005.
- PIWONKA, E.J.; FIRKINS, J.L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2196-2206, 1993.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- PORTO, M.O. **Suplementos múltiplos para terminação de bovinos a pasto**. Viçosa: UFV, 2005, 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, 2002.119p.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G., VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN,C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- RUSSELL, J.B.; BALDWIN, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.319-329, 1978.
- SANTOS, F.A.P.; COREIA, P.S.; COSA, D.F.A. Sistemas intensivos de recria de bovinos com suplementação em pastagens e terminação em confinamento. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 6., 2007, Piracicaba; **Anais...** Piracicaba,SP: FEALQ , p.163-181, 2007.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994, p.476 .
- Van VUUREN, A.M.; TAMMINGA, S.; KETELAAR, R.S. Ruminal availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, v.38, p.499-512, 1990.

Capítulo 1

Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com compostos nitrogenados e/ou carboidratos

Introdução

O grau de aproveitamento das forrageiras pelos bovinos está diretamente relacionado à atividade microbiana ruminal, notadamente sobre os compostos fibrosos, a qual é dependente do nível de nitrogênio presente no meio (Hafley et al., 1993). Segundo Paulino et al. (2002), a elevada porção de compostos nitrogenados insolúveis em detergente neutro em forragens tropicais de alta qualidade pode implicar carência de compostos nitrogenados para que os microrganismos ruminais apresentem bons níveis de produção de proteína microbiana, o que limita o ganho de peso dos animais. Esse quadro implicaria respostas positivas à suplementação com compostos nitrogenados mesmo no período das águas (Balsalobre et al., 1999; Paulino et al., 2002; 2005; Porto, 2005; e Moraes et al., 2005).

De acordo com Russell et al. (1992), se fornecida fonte de proteína degradável no rúmen (PDR) ou fonte de compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) que atendam às necessidades das bactérias fibrolíticas, a atividade dessa população aumenta significativamente, pois esta requer como principal fonte de nitrogênio a amônia, liberada a partir da degradação da PDR ou do NNP. Nesse contexto, o aumento do consumo de matéria seca (MS) poderá ser acarretado pela ampliação na velocidade de degradação dos carboidratos fibrosos potencialmente degradáveis (Lazzarini, 2007), o que implica redução do tempo necessário para que a partícula fibrosa alcance a faixa de gravidade específica que a habilite a ser retirada do ambiente ruminal (Allen, 1996). Dessa forma, amplia-se o *turnover* ruminal em relação à fração que efetivamente demanda espaço residente (FDN), tendo como consequência direta o aumento no consumo de pasto (Costa, 2006).

A sincronia entre a degradação da proteína e os carboidratos tem sido apontada como a base para o maior aproveitamento dos suplementos fornecidos a bovinos em pastejo e confinamento (Russell, 2002). O baixo teor de carboidratos não-fibrosos (CNF)

nas gramíneas tropicais faz com que os carboidratos disponíveis nas forrageiras sejam de lenta degradação. Além disso, na época das águas, a proteína da forragem é altamente degradável, gerando desbalanço metabólico que limita o desempenho animal (Santos et al., 2007). A suplementação com CNF pode proporcionar a energia requerida para que os microrganismos consigam assimilar os compostos nitrogenados liberados pela degradação da proteína, mas tem sido demonstrado que esta reduz a degradação ruminal da fibra (El-Shazly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; e Mould et al., 1983). Isso pode ser atribuído a dois efeitos distintos, denominados efeito pH e efeito concentrado ou efeito carboidrato (Mould et al., 1983; Arroquy et al., 2005).

No caso do efeito pH, reduções significativas no pH ruminal podem ser responsáveis pela inibição parcial de degradação fibrosa, por comprometerem a condição ideal de meio para o crescimento dos microrganismos fibrolíticos (Mould et al., 1983; Hoover, 1986; e Van Soest, 1994). Por sua vez, o efeito carboidrato parece envolver a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas, em especial entre microrganismos fibrolíticos e aqueles que degradam CNF, resultando em maior proliferação dos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961; Coelho da Silva e Leão, 1979; Mould et al., 1983), o qual se pronunciaria em meios deficientes em compostos nitrogenados (El-Shazly et al., 1961), podendo envolver, concomitantemente, mecanismos de regulação catabólica (Russell & Baldwin, 1978).

No entanto, de forma recente, tem-se estabelecido que o efeito carboidrato pode se comportar de forma diferenciada em função da origem química dos carboidratos presentes no suplemento (Arroquy et al., 2005). Portanto, faz-se premente a investigação dos efeitos de CNF suplementares de diferentes formas químicas sobre a dinâmica ruminal dos carboidratos fibrosos da forragem, o que permitiria delinear, com maior exatidão, estratégias de suplementação para a otimização no uso dos substratos energéticos basais, de menor custo (Costa, 2006).

Dessa forma, objetivou-se estudar a dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) de capim-braquiaria (*Brachiaria decumbens* Stapf.) de alta qualidade em função de suplementação com diferentes fontes de carboidratos (amido ou pectina) e/ou diferentes fontes de compostos nitrogenados (caseína ou uréia).

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. A forragem utilizada nos procedimentos de avaliação *in vitro* foi proveniente de amostra de *Brachiaria decumbens* colhida no início da estação chuvosa, por intermédio de simulação manual de pastejo em piquete do Setor Experimental de Gado de Corte do Departamento de Zootecnia da UFV.

A amostra, após seca sob ventilação forçada (60°C/72 h), foi processada em moinho de facas (1 mm). Posteriormente, procedeu-se à quantificação dos teores de MS, matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina por solubilização da celulose por ácido sulfúrico (72% p/p), segundo métodos descritos em Silva & Queiroz (2002). As avaliações quanto aos teores de FDN foram conduzidas segundo recomendações de Mertens (2002). Os teores de FDN e FDA foram também expressos nas formas corrigidas para cinzas e compostos nitrogenados, sendo os procedimentos de correção conduzidos segundo métodos descritos por Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química da forragem e dos componentes dos suplementos

Item ¹	Forragem	Componente			
		Amido	Pectina	Caseína	Uréia:SA(9:1)
MS ²	213,4	880,5	854,4	901,3	982,1
MO ³	907,4	989,1	967,4	978,7	997,6
PB ³	146,2	0,0	36,8	878,9	2610,0
PB _{NNP} ⁴	746,1	-	-	-	-
EE ³	23,1	1,2	3,7	5,6	-
CT ³	738,2	987,9	926,9	94,2	-
FDN ³	586,7	-	-	-	-
FDNcp ³	497,5	-	-	-	-
PIDN ⁴	204,7	-	-	-	-
CNF ³	240,7	987,9	926,9	94,2	-
FDA ³	240,2	-	-	-	-
FDAcp ³	208,1	-	-	-	-
PIDA ⁴	22,7	-	-	-	-
Lignina ³	19,9	-	-	-	-

¹/MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; PB_{NNP} = PB oriunda de compostos nitrogenados não-protéticos; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDA = fibra em detergente ácido; FDAcp = fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido. ²/ g/kg de matéria natural. ³/ g/kg de MS. ⁴/ g/kg de PB.

Procedeu-se, ainda, à quantificação dos compostos nitrogenados não-protéicos na forragem, segundo método do ácido tricloroacético (Licitra et al., 1996) (Tabela 1).

O tratamento considerado como referência à implementação dos demais foi construído de modo que simulasse situação de suplementação para bovinos em terminação sob pastejo durante o período das águas (70% de forragem e 30% de concentrado, com base na MS). O concentrado referente a este tratamento foi formulado para apresentar 30% de PB, utilizando-se amido, como componente energético, e caseína, como componente protéico. Todos os componentes usados nos procedimentos de incubação foram avaliados de forma similar aos métodos utilizados para as amostras de forragem (Tabela 1).

Os demais tratamentos foram construídos a partir da omissão do fornecimento das fontes protéica e/ou energética do suplemento, associando-se, ainda, a substituição total do amido por pectina e da PB oriunda da caseína por PB oriunda da mistura uréia:sulfato de amônio (9:1). Dessa forma, nove foram os tratamentos avaliados: 1: Forragem; 2: Forragem + Amido; 3: Forragem + Pectina; 4: Forragem + Caseína; 5: Forragem + Caseína + Amido (tratamento referência); 6: Forragem + Caseína + Pectina; 7: Forragem + Uréia; 8: Forragem + Uréia + Amido; e 9: Forragem + Uréia + Pectina.

A escolha dos componentes utilizados na constituição dos suplementos se deu com base em dois critérios: pureza da fonte protéica ou energética e ausência de FDN, o que permitiu avaliar de forma exclusiva a degradação da fração fibrosa insolúvel da forragem. As seguintes fontes foram utilizadas: caseína oriunda do leite bovino (Sigma C-7078), pectina cítrica (Sigma P-9135), amido solúvel (Merck 101252), uréia PA (Merck 108487) e sulfato de amônio PA (Merck 101217).

Alíquotas de forragem (245 mg de MS) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Em seguida, acondicionou-se a fonte protéica e/ou energética segundo a estrutura dos tratamentos anteriormente descritos, perfazendo o total de 350 mg de MS por frasco para os tratamentos que envolveram suplementação energética e protéica a partir de caseína (Tabela 2). Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução-tampão de McDougall (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 por intermédio de aspersão com CO₂. Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C), para hidratação das amostras.

Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de um bovino doador, fistulado no rúmen, mantido nas proximidades da sala de incubação. O animal doador foi alimentado com capim–elefante *in natura* fornecido *ad libitum* e suplementado com 1 kg/dia de farelo de soja, não sendo submetido a jejum de alimentos

anteriormente à coleta. A dieta do animal doador, em conjunto com a ausência do período de jejum, visou à obtenção de inóculo ruminal com características similares a animais mantidos em pastos tropicais durante o período das águas, sem suplementação. O animal teve disponibilidade irrestrita a água e mistura mineral.

Tabela 2 - Descrição dos componentes adicionados ao sistema *in vitro*, de acordo com os diferentes tratamentos

Componente ²	Tratamentos ¹								
	F	FA	FP	FC	FCA	FCP	FU	FUA	FUP
FORAGEM (mg)	245	245	245	245	245	245	245	245	245
Amido (mg)	-	65	-	-	65	-	-	65	-
Pectina (mg)	-	-	65	-	-	65	-	-	65
Caseína (mg)	-	-	-	40	40	40	-	-	-
Uréia:SA (9:1)	-	-	-	-	-	-	12	12	12
Inóculo Ruminal (mL)	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Tampão de McDougall (mL)	28	28	28	28	28	28	28	28	28

¹/F = forragem; FA = forragem mais amido; FP = forragem mais pectina; FC = forragem mais caseína; FCA = forragem mais caseína e amido; FCP = forragem mais caseína e pectina; FU = forragem mais uréia; FUA = forragem mais uréia e amido; FUP = forragem mais uréia e pectina. ²/ Com base na matéria seca.

O líquido foi coletado na região de interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtrado por uma camada tripla de gaze, acondicionado em recipiente térmico e imediatamente transportado à sala de incubação.

Foram adicionados 7 mL de inóculo ruminal por frasco, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de incubação com CO₂ e à vedação dos frascos. A relação final, para os tratamentos com a adição de suplemento protéico (caseína) e energético, foi de 100 mg de MS/10 mL de solução final e 1 mL de inóculo ruminal/4 mL de solução-tampão (Tilley & Terry, 1963). Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm). Procedeu-se à retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas, com o auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. O procedimento de incubação foi repetido quatro vezes, perfazendo o total de quatro avaliações por tempo de incubação para cada tratamento.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidos à mensuração do pH com potenciômetro digital, sendo o conteúdo filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes. A fração líquida foi reservada em recipientes plásticos, nos quais foi acrescentado 1 mL de solução de H₂SO₄ (1:1), sendo armazenados a -20 °C para posterior análise da concentração de nitrogênio amoniacal (NA) no meio, mediante

destilação com hidróxido de potássio (2N), após a centrifugação a 1.500 x g por 15 minutos e sem submeter as amostras a digestão com ácido.

Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais se adicionaram 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Após vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de modo que fossem extraídos todos os componentes solúveis em detergente neutro (método de microextração; Pell & Schofield, 1993). Após esse tratamento, procedeu-se novamente à filtração sob vácuo e lavagem seqüencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não-ventilada (105°C/16 horas).

Os resíduos de FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram submetidos, por intermédio do algoritmo de Gauss-Newton, ao ajustamento do modelo logístico não-linear descrito por Van Milgen et al. (1991):

$$Rt = U \times \frac{[c \times \exp(-p \times t) - p \times \exp(-c \times t)]}{(c - p)} + I \quad (1);$$

em que: Rt = resíduo não-degradado de FDN no tempo “t” (%); U = fração potencialmente degradável da FDN (FDNpd) (%); I = fração não-degradável da FDN (%); c = taxa fracional de degradação da fração potencialmente degradável da FDN (h⁻¹); p = taxa fracional de latência (h⁻¹); e t = tempo (h).

A função descrita em (1) é simétrica em relação às taxas fracionais c e p, sendo comumente assumido que os menores valores estão associados a c (Vieira et al., 1997). Contudo, para os casos em que c e p tendem à mesma estimativa, indeterminação matemática será observada. Assim, para os casos em que isso foi observado, o modelo foi reparametrizado, segundo a regra de L’Hôspital (Van Milgen et al., 1991):

$$Rt = U \times (1 + \lambda \times t) \times \exp(-\lambda \times t) + I \quad (2);$$

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h⁻¹), sendo os demais termos definidos anteriormente.

Para este caso, em virtude de o parâmetro λ representar conjuntamente as taxas de latência e degradação, estimou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ , utilizando-se as propriedades da distribuição gama-2 (Ellis et al., 1994):

$$c' = 0,59635\lambda \quad (3);$$

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDNpd (h⁻¹), para os casos em que o modelo reparametrizado for utilizado (Equação 2).

As estimativas de latência discreta foram obtidas segundo derivações de Vieira et al. (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(t_i)}{R'(t_i)} + t_i \quad (4);$$

em que: L = latência discreta (h); R(0) = resíduo de FDN não-degradado em t = 0 (%); R(t_i) = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de degradação (%); R'(t_i) = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h⁻¹); e t_i = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de t_i foram obtidos conforme as descrições de Van Milgen et al. (1991) e Vieira et al. (1997), segundo as equações a seguir, aplicadas, respectivamente, aos modelos descritos em (1) e (2):

$$t_i = \frac{\ln(c) - \ln(p)}{(c - p)} \quad (5);$$

$$t_i = \frac{1}{\lambda} \quad (6);$$

A taxa específica de crescimento microbiano sobre a FDNpd foi estimada segundo proposições de Beuvink & Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{R'(t_i)}{U} \quad (7);$$

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h⁻¹).

A partir das estimativas de Sgr, obtiveram-se as eficiências de crescimento microbiano sobre a FDNpd, segundo proposições de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{Sgr} + \frac{1}{Y_m} \quad (8);$$

em que: Y = eficiência microbiana (g células · g⁻¹ carboidrato degradado); m = exigência de manutenção das bactérias (g carboidrato · g⁻¹ célula · h⁻¹); e Y_m = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato (g células · g⁻¹ carboidratos).

Adotou-se como referência ao parâmetro Y_m o valor de 0,4 g célula · g⁻¹ carboidrato degradado e, para m, o valor de 0,05 g carboidrato · g⁻¹ célula · h⁻¹, conforme especificações de Russell et al. (1992).

Ressalta-se que as estimativas para o parâmetro Sgr foram obtidas com base nos valores médios gerais das frações U (77,00±4,18) e I (23,57±1,90), sob o pressuposto de estas serem características únicas e exclusivas do substrato (forragem) (Ørskov, 2000).

Os modelos ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes tratamentos foram comparados de forma descritiva. Por sua vez, os valores de pH e concentração NA obtidos para os diferentes tempos de incubação foram avaliados segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando-se cada partida de incubação como bloco, em esquema fatorial 3 x 3 x 10 (três fontes de compostos nitrogenados, três fontes de carboidratos e dez tempos de incubação). Todos os procedimentos estatísticos, tanto lineares como não-lineares, foram conduzidos por intermédio do programa SAS (*Statistical Analysis System*), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

As estimativas dos parâmetros da dinâmica de degradação da FDN da forragem são apresentadas na Tabela 3. Antecipa-se que as diferenças observadas quanto à latência discreta foram consideradas de pequena magnitude, independentemente do esquema de suplementação adotado, sendo, portanto, omitidas da discussão.

Verificou-se que a suplementação exclusiva com carboidratos produziu efeito inibitório sobre a taxa de degradação da FDN_{pd} em comparação ao tratamento basal (forragem), sendo observadas reduções de 6,9 e 13,6% para a suplementação exclusiva com amido e pectina, respectivamente (Tabela 3).

A queda na degradação ruminal da fibra decorrente da suplementação com CNF pode ser atribuída a dois efeitos distintos: efeito pH e efeito concentrado ou efeito carboidrato (Mould et al., 1983; Arroquy et al., 2005). No primeiro caso, reduções significativas no pH ruminal são responsáveis pela inibição parcial de degradação fibrosa, por comprometerem a condição ideal do meio para crescimento dos microrganismos fibrolíticos (Mould et al., 1983; Hoover, 1986; e Van Soest, 1994).

A avaliação do pH do meio de incubação somente permitiu a verificação de efeitos ($P > 0,05$) relativos à suplementação com compostos nitrogenados e quanto ao tempo de incubação (Tabela 4; Figura 1). Dessa forma, a suplementação com carboidratos não causou diferenças no pH do meio em relação à não-suplementação (tratamento basal) ($P > 0,05$), não sendo, ainda, observados valores médios de pH considerados danosos à atividade microbiana sobre os carboidratos fibrosos da forragem (Mould et al., 1983; Hoover, 1986). Assim, em virtude desse comportamento, o efeito carboidrato parece ter

predominado sobre o comportamento da taxa de degradação da FDNpd na presença de amido e pectina (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativas da taxa fracional de degradação (c), taxa de latência (p), taxa fracional comum para latência e degradação (λ) e taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ (c'), valor relativo da taxa de degradação (VRTD) e tempo de latência discreta (L) para a degradação ruminal da fibra em detergente neutro potencialmente degradável e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função da suplementação protéica e/ou com carboidratos

Parâmetro	Fonte de Carboidrato		
	Sem Carboidrato	Amido	Pectina
	Sem Proteína		
c (h ⁻¹)	0,0853±0,0216	---	---
p (h ⁻¹)	0,3476±0,2215	---	---
λ (h ⁻¹)	---	0,1332±0,0064	0,1236±0,0082
c' (h ⁻¹) ¹	---	0,0794±0,0038	0,0737±0,0048
VRTD (%) ²	100,0	93,1	86,4
L (h)	1,44	2,12	2,28
DPA	5,96	4,05	5,14
	Caseína		
c (h ⁻¹)	0,0737±0,0447	0,0802±0,0140	---
p (h ⁻¹)	0,3161±0,1588	0,3268±0,1448	---
λ (h ⁻¹)	---	---	0,1412±0,0093
c' (h ⁻¹) ¹	---	---	0,0842±0,0055
VRTD (%) ²	86,4	94,0	98,7
L (h)	1,61	1,54	1,69
DPA	5,01	4,42	5,69
	Uréia:SA (9:1)		
c (h ⁻¹)	---	0,0902±0,0208	0,0878±0,0182
p (h ⁻¹)	---	0,3903±0,2352	0,3034±0,1413
λ (h ⁻¹)	0,1548±0,0109	---	---
c' (h ⁻¹) ¹	0,0923±0,0065	---	---
VRTD (%) ²	108,2	105,7	102,9
L (h)	1,07	1,31	1,57
DPA	5,97	5,36	4,26

^{1/} Estimado segundo propriedades da distribuição Gama-2: $c' = 0,59635\lambda$. ^{2/} Estimado em relação ao tratamento basal (sem suplementação).

O efeito carboidrato com a adição de amido parece envolver a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas, resultando em maior proliferação dos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961; Coelho da Silva & Leão, 1979; e Mould et al., 1983). Essa competição conduziria à preferência inicial pela utilização do amido como substrato energético no ambiente ruminal como um todo

(El-Shazly et al., 1961), com a transformação gradativa dos carboidratos fibrosos em substratos energéticos predominantes à medida que se reduz a disponibilidade de amido (El-Sahzly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; e Arroquy et al., 2005), podendo envolver, concomitantemente, mecanismos de regulação catabólica (Russell & Baldwin, 1978).

Tabela 4 - Médias de mínimos quadrados para o pH e a concreção de nitrogênio amoniacal (NA) do meio em função das fontes protéicas e dos carboidratos suplementares

Item	Fonte	pH ¹	NA (mg/dL) ¹
Carboidrato	Sem Carboidrato	7,05a	15,91a
	Amido	7,02a	12,01b
	Pectina	7,00a	11,95b
Proteína	Sem Proteína	6,98b	8,44c
	Caseína	6,98b	14,21b
	U:AS (9:1)	7,11a	17,20a
CV (%)		5,4	48,4

^{1/} Médias na coluna, dentro de fontes de carboidratos ou proteína, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05).

Por sua vez, alguns autores têm reportado a inibição da atividade de enzimas fibrolíticas em função da presença de amido no meio (Hiltne & Dehority, 1983, citados por Arroquy et al., 2005; Piwonka & Firkins, 1993), fato que parece estar associado à liberação de compostos inibidores pelos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961), os quais parecem ser de natureza protéica (bacteriocinas) (Piwonka & Finkins, 1993; Kalmokoff et al., 1996).

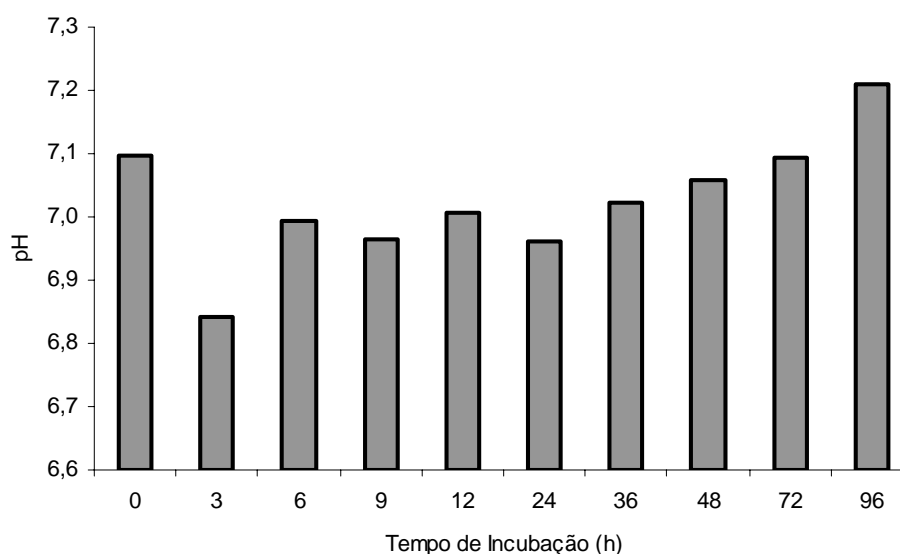


Figura 1 - Comportamento descritivo médio do pH do meio em função do tempo de incubação.

Diversos autores (Horn et al., 1995; Bowman & Sanson, 1996; Caton & Dhuyvetter, 1997; e Costa, 2006) têm buscado avaliar fontes energéticas alternativas ao amido, sobretudo fontes de fibra de alta digestibilidade ou fontes de polissacarídeos não-amiláceos, como a pectina. As pesquisas apresentam como meta central evitar ou reduzir o efeito carboidrato do amido sobre a utilização da FDN. Contudo, os resultados obtidos são variáveis.

Segundo Arroquy et al. (2005), outras formas de carboidratos não-fibrosos agiriam similarmente ao amido sobre a degradação da FDN no rúmen. Costa (2006) verificou, em estudo *in vitro*, que em condições de forragem de alta qualidade a utilização de pectina resultou em efeitos negativos sobre a degradação da FDNpd de forma similar ao amido. Esse autor concluiu que a presença de pectina incorria em eventos de competição microbiana similares aos observados com amido.

O comprometimento do crescimento microbiano com o uso de ambas as fontes de carboidratos pode ser reforçado pelas estimativas de eficiência microbiana. Verificou-se que a suplementação exclusiva com amido ou pectina reduziu em 2,7 e 4,8%, respectivamente, em comparação ao tratamento basal (forragem), o crescimento dos microrganismos sobre a FDNpd (Tabela 5).

Tabela 5 - Máxima taxa de degradação ($\mu - h^{-1}$), taxa de crescimento específico de microrganismos ($Sgr - h^{-1}$) e eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd da forragem (EFM - g MS microbiana/kg de carboidrato degradado) em função da suplementação protéica e/ou com carboidratos

Fonte Protéica	Fonte de Carboidrato		
	Sem Carboidrato	Amido	Pectina
	μ		
Sem Proteína	4,1596	3,7733	3,5014
Caseína	3,6452	3,9108	3,7733
Uréia:SA (9:1)	3,7733	4,4720	4,0804
	Sgr		
Sem Proteína	0,0540	0,0490	0,0455
Caseína	0,0473	0,0508	0,0490
Uréia:SA (9:1)	0,0490	0,0581	0,0530
	EFM		
Sem Proteína	291,9	284,1	277,8
Caseína	281,2	287,0	284,1
Uréia:SA (9:1)	284,1	297,5	290,4

A presença de competição entre grupos de espécies microbianas (fibrolíticas e não-fibrolíticas) pode ser indiretamente observada pelo comportamento médio da concentração

de nitrogênio amoniacal (NA) entre fontes de carboidratos (Tabela 4; Figura 2). Verificaram-se, tanto para o amido como para a pectina, estimativas de NA inferiores ao uso exclusivo de forragem ($P < 0,05$), o que indica, possivelmente, captação de compostos nitrogenados amoniacais pelos microrganismos que degradam carboidratos não-fibrosos, reduzindo a disponibilidade deste substrato para os microrganismos fibrolíticos. Ressalta-se que a concentração de NA foi afetada somente pelos efeitos principais (carboidratos, proteína e tempo) ($P < 0,05$), não sendo observados efeitos de interação ($P > 0,05$).

Verificou-se que a adição isolada de caseína ao meio de incubação reduziu em 13,6%, ao passo que a adição de uréia elevou em 8,2% a taxa de degradação da FDNpd (Tabela 3).

Efeitos inibitórios da adição de proteína verdadeira, como a caseína, sobre a degradação ruminal de carboidratos têm sido relatados. Cone & Van Gelder (1999) constataram redução na taxa de produção de gases por unidade de matéria orgânica *in vitro* à medida que caseína foi adicionada ao meio. Em estudo similar *in vitro*, Oliveira et al. (2005) observaram redução proporcional à adição de caseína ao meio sobre a taxa de produção de gases a partir de celulose. Em adição, Costa (2006) verificou redução de 19,1% na taxa de degradação da FDNpd de forragem tropical de alta qualidade com a adição de caseína ao meio de incubação *in vitro*.

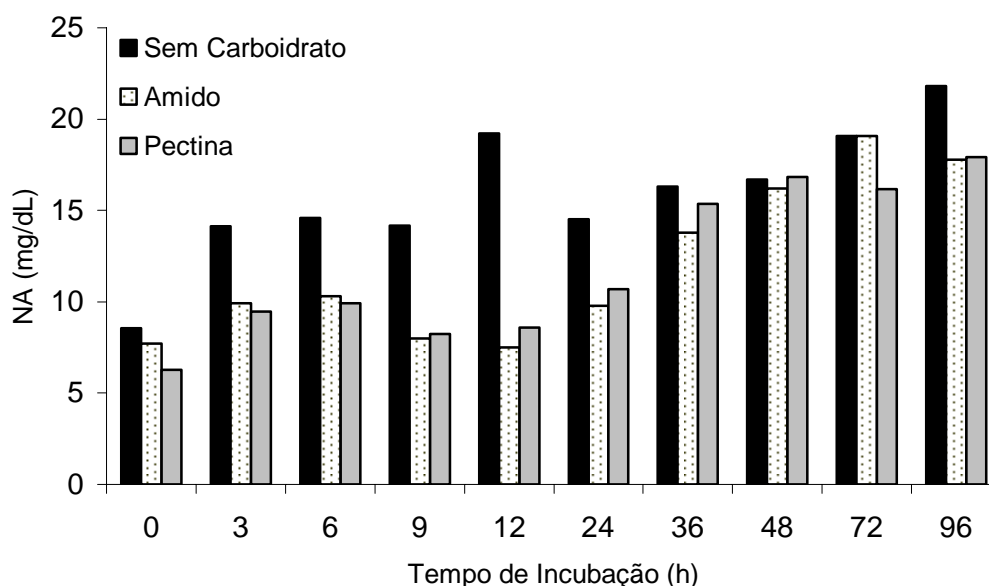


Figura 2 - Comportamento descritivo para a concentração de nitrogênio amoniacal (NA) no meio de incubação em função do tempo de incubação e da fonte de carboidrato.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a adição de caseína não implicou alterações físico-químicas deletérias à atividade fibrolítica, uma vez que propiciou pH similar ao obtido somente com forragem ($P>0,05$) e incrementou a disponibilidade de NA ($P<0,05$) (Tabela 4; Figura 3).

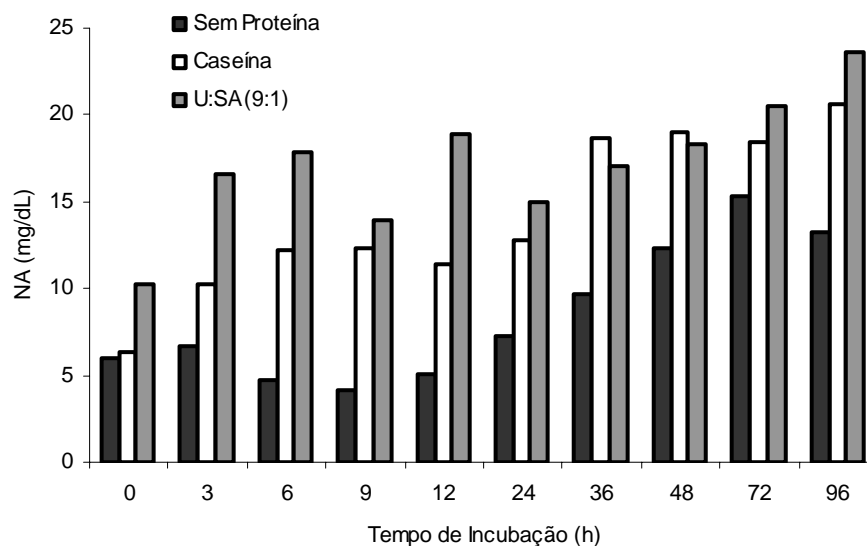


Figura 3 - Comportamento descritivo para a concentração de nitrogênio amoniacal (NA) no meio de incubação em função do tempo de incubação e da fonte de compostos nitrogenados.

O efeito negativo da caseína sobre a degradação da FDNpd (Tabela 3), o qual poderia ser denominado “efeito proteína”, pode ser atribuído a interações amensais, ou seja, à inibição do crescimento de uma ou mais espécies microbianas em função da produção de compostos inibidores por outras espécies. A ação de bacteriocinas pode implicar redução da atividade celulolítica no rúmen (Wolin et al., 1997). Como pode ser observado na Tabela 5, a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd foi reduzida em 3,7% com a adição de caseína ao meio.

Resultados obtidos *in vitro* indicam que a ampliação no fornecimento de aminoácidos provoca incremento na produção de bacteriocinas (De Vuyst & Vandamme, 1993; Kim et al., 1997; Parente & Ricciardi, 1999; Aasen et al., 2000; e Mantovani & Russell, 2003), o que poderia confirmar os resultados obtidos neste estudo.

Efeitos deletérios similares, portanto, não seriam obtidos com a suplementação com uréia, devido ao fato de não se adicionarem aminoácidos ao meio. Por sua vez, os efeitos benéficos da suplementação com uréia poderiam ser atribuídos à melhor disponibilidade de NA no meio (Tabela 4). Segundo Leng (1990) e Lazzarini (2007), níveis mínimos de 10

mg de NA/dL seriam necessários para maximizar a atividade microbiana sobre os carboidratos fibrosos da forragem, valores estes obtidos em todos os momentos de avaliação (incluindo-se o tempo “0”) para os casos em que se utilizou a uréia como fonte de compostos nitrogenados (Figura 3).

Segundo os resultados expressos nas Tabelas 3 e 5, a suplementação conjunta com caseína e amido ou pectina permitiu a manutenção da degradação da FDNpd em patamares superiores aos observados com a suplementação isolada com estes compostos, embora ainda inferiores ao observado no tratamento basal.

Esse comportamento parece refletir esquema de regulação cruzada dos efeitos deletérios entre caseína e carboidratos. A produção de bacteriocinas no meio de fermentação é reduzida devido à ampliação da disponibilidade de glicose (Aasen et al., 2000), indicando a possibilidade de haver mecanismo de regulação catabólica por intermédio da elevação na disponibilidade de carboidratos no meio (Mantovani & Russell, 2003). Por outro lado, a elevação na disponibilidade de NA propiciada pela suplementação com caseína (Tabela 4) pode indicar redução do efeito carboidrato, no sentido de se reduzirem as competições por substratos essenciais entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas.

Esse último argumento poderia ser utilizado para suportar o comportamento observado no tocante à utilização da FDNpd com a suplementação simultânea com uréia e carboidratos (Tabelas 3, 4 e 5), fato que, associado à ausência de estímulos à produção de bacteriocinas, com descrito anteriormente, conduziu a taxas de degradação superiores à observada no tratamento basal (forragem).

Conclusões

A suplementação isolada com proteína verdadeira e carboidratos causou efeitos deletérios sobre a utilização da fibra em detergente neutro em função de interações negativas entre espécies microbianas fibrolíticas e não-fibrolíticas. Esses efeitos, contudo, apresentaram comportamento de regulação cruzada, sendo amenizados com a suplementação simultânea com esses compostos.

A suplementação com uréia incrementou a degradação da fibra em detergente neutro em razão da melhor adequação físico-química do ambiente de fermentação e da possível ausência de relações amensais entre espécies microbianas.

Literatura Citada

- AASEN, I.M.; MØRETRØ, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRØ, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.159-166. 2000.
- ALLEN, M.S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, p.3063-3075, 1996.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN, R.C.; NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C.; JOHNSON, D.E. Effect of types of non-fiber carbohydrate on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.93-106, 2005.
- BALSALOBRE, M.A.A.; SANTOS, P.M.; CORSI, M.; MEDEIROS, S.R.; BANIN R.L. Desempenho de novilhos em crescimento recebendo suplementação a pasto durante o verão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.246
- BEUVINK, J.M.W.; KOGUT, J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated in ruminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1041-1046, 1993.
- BOWMAN, J.G.P.; SANSON, D.W. Starch or fiber based energy supplements of grazing ruminants. **Proceedings of Western Section, American Society of Animal Science**, v.47 (suppl. 1), p118-135, 1996.
- CATON, J.S.; DHUYVETTER, D.V. Influence of energy supplementation on grazing ruminants: Requirements and responses. **Journal of Animal Science**, v.75. p.533-542, 1997.
- COELHO da SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocere, 1979. 380p.
- CONE, J.W.; Van GELDER, A.H. Influence of protein fermentation on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.251-264, 1999.
- COSTA, V.A.C. **Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragens tropicais em função de suplementação protéica e/ou energética**. 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- De VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* batch fermentations using complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.17-22. 1993.
- ELLIS, W.C., MATIS, J.H., HILL, T.M.; MURPHY, M.R. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy, 1994. p.682-756.
- EL-SHAZLY, K; DEHORITY, B.A.; JOHNSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.20, p.268-273, 1961.

- HAFLEY, J.L.; ANDERSIN, B.E.; KLOPFENSTEIN, T.J. Supplementation of growing cattle grazing warm-season grass with proteins of various ruminal degradability. **Journal of Animal Science** v.71, p.522-529, 1993.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2755-2766, 1986.
- HORN, G. W.; CRAVEY, M.D.; MCCOLLUM, F.T.; STRASIA, C.A; KRENZER, E.G; CLAYPOOL, P.L. Influence of high-starch vs high-fiber energy supplements on performance of stocker cattle grazing wheat pasture and subsequent feedlot performance. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 45-54, 1995.
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? **Journal of Animal Science**, v.79, p.2297-2306, 1996.
- KIM, W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.449-453, 1997.
- LAZZARINI, I. **Consumo, digestibilidade dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados**. 2007. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Review**, v.3, p.277-303, 1990.
- LICITRA, G.; HERNANDES, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardizations of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. Factors affecting the antibacterial activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* HC5. **Current Microbiology**, v.46, p.18-23, 2003.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217–1240, 2002.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p 1437-1446, 1980.
- MORAES E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; FIGUEIREDO, D.M.; VALADARES FILHO, S.C; DETMANN, E; SALES M.F.L; PORTO, M.O.;LAZZARIN, I.; SOUZA, M.G.; COUTO,V.M.; MORAES K.A.K. Desempenho de novilhos de corte submetidos a diferentes frequências de suplementação no período das águas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD ROM).

- MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R., MANNS, O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-30, 1983.
- OLIVEIRA, A.L.F.; CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T. Efeito da fermentação de proteínas na cinética de produção de gases *in vitro*. In: ZOOTEC'2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- ØRSKOV, E. R. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. (Eds). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.175-188.
- PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., 2002, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: SIMCORTE, 2002. p.153-196.
- PAULINO, M.F.; MOARES, E.H.B.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ALEXANDRINO, E.; FIGUEIREDO, D.M. Fontes de energia em suplementos múltiplos de auto-regulação de consumo na recria de novilhos mestiços em pastagem de *Brachiaria decumbens* durante período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.3, p. 957-962, 2005.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.52, p.628-638, 1999.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073.
- PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society**, Series B, v.163, p.224-231, 1965.
- PIWONKA, E.J.; FIRKINS, J.L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2196-2206, 1993.
- PORTO, M.O. **Suplementos múltiplos para terminação de bovinos a pasto**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- RUSSELL, J.B.; **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, 2002. 119p.
- RUSSELL, J.B.; BALDWIN, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.319-329, 1978.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G., Van SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SANTOS, F.A.P.; COREIA, P.S.; COSA, D.F.A. Sistemas intensivos de recria de bovinos com suplementação em pastagens e terminação em confinamento. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 6., 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba.: FEALQ 2007. , p. 163-181.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235 p.

- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal Animal Science**, v. 70, p.3551-3561, 1992.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 2515-2529, 1991.
- Van SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P. A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephant grass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.
- WOLIN, M.J.; MILLER, T.L.; STEWARD, C.S. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P.N; STEWART, C.S (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed.: London: Chapman Hall, 1997. p.467-491.

Capítulo 2

Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com nitrogênio não-protéico e proteína verdadeira

Introdução

O grau de aproveitamento das forragens pelos bovinos está diretamente relacionado à atividade microbiana ruminal, notadamente sobre os compostos fibrosos, a qual é dependente do nível de nitrogênio presente no meio (Hafley et al., 1993). De acordo com Russell et al. (1992), se for fornecida fonte de proteína degradável no rúmen (PDR) ou fonte de compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) que atendam às necessidades das bactérias fibrolíticas, a atividade dessa população aumenta significativamente, pois esta requer amônia como principal fonte de nitrogênio, liberada pela degradação da PDR ou do NNP. Nesse contexto, o aumento do consumo de matéria seca (MS) poderá ser provocado pela ampliação na velocidade de degradação dos carboidratos fibrosos potencialmente degradáveis (Lazzarini, 2007).

O baixo teor de carboidratos não-fibrosos (CNF) nas gramíneas tropicais faz com que os carboidratos disponíveis nas forragens sejam de lenta degradação. Além disso, na época das águas, a proteína da forragem é altamente degradável, gerando desbalanço metabólico que limita o desempenho animal (Santos et al., 2007). A suplementação com CNF pode proporcionar a energia requerida pelos microrganismos para assimilar os compostos nitrogenados liberados pela degradação da proteína, mas reduz a degradação ruminal da fibra (El-Shazly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; e Mould et al., 1983).

Alguns autores têm reportado a inibição da atividade de enzimas fibrolíticas em função da presença de amido no meio (Hiltne & Dehority, 1983, citados por Arroquy et al., 2005; Piwonka & Firkins, 1993), fato que parece estar associado à liberação de compostos inibidores pelos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961), os quais parecem ser de natureza protéica (bacteriocinas) (Piwonka & Finkins, 1993; Kalmokoff et al., 1996).

Por sua vez, Costa (2006) e Paez-Bernal et al. (s.d.) relataram que a suplementação isolada com proteína verdadeira causa efeitos deletérios sobre a utilização da fibra em

detergente neutro (FDN), em razão de interações negativas entre espécies microbianas fibrolíticas e não-fibrolíticas. Esses efeitos, contudo, apresentariam comportamento de regulação cruzada em relação aos efeitos deletérios dos carboidratos, sendo amenizados com a suplementação simultânea com esses compostos. Segundo Paez-Bernal et al. (s.d.), a suplementação com uréia incrementa a degradação da FDN, em função da melhor adequação físico-química do ambiente de fermentação e da possível ausência de relações amensais entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas. Esse quadro poderia dar suporte aos resultados positivos sobre a produção de bovinos em pastejo obtidos a partir da suplementação com fontes de NNP durante a época das águas (Balsalobre et al., 1999; Paulino et al., 2002; 2005; Porto, 2005; e Moraes et al., 2005), período no qual as forragens possuem conteúdo de proteína adequado e teoricamente a suplementação com NNP não seria conveniente (Poppi & McLennan, 1995).

Russell et al. (1992) relevaram a necessidade do fornecimento de proteína verdadeira degradável para garantir a disponibilidade de aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos de cadeia ramificada que são requeridos por algumas bactérias e não podem ser sintetizados a partir do NNP. Contudo, na literatura nacional não foram encontrados estudos em que se tenha determinado a relação ideal entre proteína verdadeira degradável e NNP em suplementos para animais em pastejo na época das águas.

Assim, objetivou-se estudar a dinâmica da degradação *in vitro* da FDN de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) de alta qualidade em função da suplementação com duas diferentes fontes de carboidratos (amido ou pectina) e diferentes relações proteína verdadeira:NNP.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. A forragem utilizada nos procedimentos de avaliação *in vitro* foi proveniente de amostra de *Brachiaria decumbens* colhida no início da estação chuvosa, por intermédio de pastejo simulado em piquete do Setor Experimental de Gado de Corte do Departamento de Zootecnia da UFV.

A amostra, após seca sob ventilação forçada (60°C/72 h), foi processada em moinho de facas (1 mm). Posteriormente, procedeu-se à quantificação dos teores de MS, matéria

orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina por solubilização da celulose por ácido sulfúrico (72% p/p), segundo métodos descritos em Silva & Queiroz (2002). As avaliações quanto aos teores de FDN foram conduzidas segundo recomendações de Mertens (2002). Os teores de FDN e FDA foram também expressos nas formas corrigidas para cinzas e compostos nitrogenados, sendo os procedimentos de correção conduzidos segundo métodos descritos por Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente. Procedeu-se, ainda, à quantificação do total de compostos nitrogenados não-protéicos na forragem, segundo método do ácido tricloroacético (Licitra et al., 1996) (Tabela 1).

O tratamento considerado como referência à implementação dos demais foi construído de modo que simulasse situação de suplementação para bovinos em terminação sob pastejo durante o período das águas (70% de forragem e 30% de concentrado, com base na matéria seca).

Tabela 1 - Composição química da forragem e dos componentes dos suplementos

Item ¹	Forragem	Componente			
		Amido	Pectina	Caseína	Uréia:SA(9:1)
MS ²	213,4	880,5	854,4	901,3	982,1
MO ³	907,39	989,1	967,4	978,7	997,6
PB ³	146,2	0,0	36,8	878,9	2610,0
PB _{NNP} ⁴	746,1	-	-	-	-
EE ³	23,08	1,2	3,7	5,6	-
CT ³	738,17	987,9	926,9	94,2	-
FDN ³	586,68	-	-	-	-
FDNcp ³	497,52	-	-	-	-
PIDN ⁴	204,7	-	-	-	-
CNF ³	240,65	987,9	926,9	94,2	-
FDA ³	240,21	-	-	-	-
FDAcp ³	208,09	-	-	-	-
PIDA ⁴	22,67	-	-	-	-
Lignina ³	19,89	-	-	-	-

¹/MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; PB_{NNP} = PB oriunda de compostos nitrogenados não-protéicos; EE = extrato etéreo; CT = carboidratos totais; FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDA = fibra em detergente ácido; FDAcp = fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido. ²/ g/kg de matéria natural. ³/ g/kg de MS. ⁴/ g/kg de PB.

O concentrado referente ao tratamento referência foi formulado de forma a apresentar 30% de PB, utilizando-se amido, como componente energético, e caseína, como componente protéico. Os demais tratamentos foram construídos a partir da substituição fracional (0, 1/3, 2/3 e 1) da PB do suplemento oriunda da caseína por PB fornecida pela mistura uréia:sulfato de amônia (9:1) (U:SA), associando-se ainda a substituição total do

amido por pectina. Dessa forma, oito foram os tratamentos avaliados: A: forragem + caseína + amido; B: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + amido; C: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + amido; D: forragem + U:SA + amido; E: forragem + caseína + pectina; F: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + pectina; G: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + pectina; e H: forragem + U:SA + pectina.

A escolha dos componentes utilizados na constituição dos suplementos se deu com base em dois critérios: pureza da fonte protéica ou energética e ausência de fibra em detergente neutro, o que permitiu avaliar de forma exclusiva a degradação da fração fibrosa insolúvel da forragem. As seguintes fontes foram utilizadas: caseína oriunda do leite bovino (Sigma C-7078), pectina cítrica (Sigma P-9135), amido solúvel (Merck 101252), uréia PA (Merck 108487) e sulfato de amônio PA (Merck 101217).

Alíquotas de forragem (245 mg de MS) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Em seguida, acondicionou-se a fonte protéica e/ou energética segundo a estrutura dos tratamentos anteriormente descritos, perfazendo o total de 350 mg de MS por frasco para os tratamentos que envolveram suplementação energética e protéica a partir de caseína (Tabela 2). Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução-tampão de McDougall (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 por intermédio de aspersão com CO₂. Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C), para hidratação das amostras.

Tabela 2 - Descrição dos componentes adicionados ao sistema *in vitro* de acordo com os diferentes tratamentos

Componente ²	Tratamentos ¹							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Forragem (mg)	245	245	245	245	245	245	245	245
Amido (mg)	65	65	65	65	-	-	-	-
Pectina (mg)	-	-	-	-	65	65	65	65
Caseína (mg)	40	26,66	13,33	-	40	26,66	13,33	-
Uréia:SA (9:1)	-	4,12	8,24	12	-	4,12	8,24	12
Inóculo Ruminal (mL)	7	7	7	7	7	7	7	7
Tampão de McDougall (mL)	28	28	28	28	28	28	28	28

^{1/} A: forragem + caseína + amido; B: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + amido; C: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + amido; D: forragem + U:SA + amido; E: forragem + caseína + pectina; F: forragem + 2/3 PB caseína + 1/3 PB U:SA + pectina; G: forragem + 1/3 PB caseína + 2/3 PB U:SA + pectina; H: forragem + U:SA + pectina. ^{2/} Com base na matéria seca.

Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de um bovino doador, fistulado no rúmen, mantido nas proximidades da sala de incubação. O animal doador foi alimentado com capim-elefante *in natura* fornecido *ad libitum* e

suplementado com 1 kg/dia de farelo de soja, não sendo submetido a jejum de alimentos anteriormente à coleta. A dieta do animal doador, em conjunto com a ausência do período de jejum, visou à obtenção de inóculo ruminal com características similares a animais mantidos em pastos tropicais durante o período das águas, sem suplementação. O animal teve disponibilidade irrestrita a água e mistura mineral.

O líquido foi coletado na região de interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtrado por uma camada tripla de gaze, acondicionado em recipiente térmico e imediatamente transportado à sala de incubação.

Foram adicionados 7 mL de inóculo ruminal por frasco, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de incubação com CO₂ e à vedação dos frascos. A relação final, para os tratamentos com a adição de suplementos protéico (caseína) e energético, foi de 100 mg de MS/10 mL de solução final e 1 mL de inóculo ruminal/4 mL de solução-tampão (Tilley & Terry, 1963). Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm). Procedeu-se à retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas, com o auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. O procedimento de incubação foi repetido três vezes, perfazendo o total de três avaliações por tempo de incubação para cada tratamento.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidos à mensuração do pH com potenciômetro digital, sendo o conteúdo filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes. A fração líquida foi reservada em recipientes plásticos, nos quais foi acrescentado 1 mL de solução de H₂SO₄ (1:1), sendo armazenados a -20 °C para posterior análise da concentração de nitrogênio amoniacal (NA) no meio, mediante destilação com hidróxido de potássio 2N, após centrifugação a 1.500 x g por 15 minutos e sem submeter as amostras à digestão com ácido.

Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais se adicionaram 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Após vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de modo que se extraíssem todos os componentes solúveis em detergente neutro (método de micro-extração; Pell & Schofield, 1993). Após esse tratamento, procedeu-se novamente à filtração sob vácuo e lavagem sequencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não-ventilada (105°C/16 horas).

Os resíduos de FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram submetidos, por intermédio do algoritmo de Gauss-Newton, ao ajustamento do modelo logístico descrito por Van Milgen et al. (1991):

$$R_t = U \times \frac{[c \times \exp(-p \times t) - p \times \exp(-c \times t)]}{(c - p)} + I \quad (1);$$

em que: R_t = resíduo não-degradado de FDN no tempo “t” (%); U = fração potencialmente degradável da FDN (FDNpd) (%); I = fração não-degradável da FDN (%); c = taxa fracional de degradação da fração potencialmente degradável da FDN (h^{-1}); p = taxa fracional de latência (h^{-1}); e t = tempo (h).

A função descrita em (1) é simétrica em relação às taxas fracionais c e p , sendo comumente assumido que os menores valores estão associados a c (Vieira et al., 1997). Contudo, para os casos em que c e p tendem à mesma estimativa, indeterminação matemática será observada. Assim, para os casos em que isso foi observado, o modelo foi reparametrizado segundo a regra de L’Hôpital (Van Milgen et al., 1991):

$$R_t = U \times (1 + \lambda \times t) \times \exp(-\lambda \times t) + I \quad (2);$$

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h^{-1}), sendo os demais termos definidos anteriormente.

Para esse caso, em virtude de o parâmetro λ representar conjuntamente as taxas de latência e degradação, estimou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ , utilizando-se as propriedades da distribuição gama-2 (Ellis et al., 1994):

$$c' = 0,59635\lambda \quad (3);$$

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDNpd (h^{-1}), para os casos em que o modelo reparametrizado for utilizado (Equação 2).

As estimativas de latência discreta foram obtidas segundo derivações de Vieira et al. (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(t_i)}{R'(t_i)} + t_i \quad (4);$$

em que: L = latência discreta (h); $R(0)$ = resíduo de FDN não-degradado em $t = 0$ (%); $R(t_i)$ = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de degradação (%); $R'(t_i)$ = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h^{-1}); e t_i = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de t_i foram obtidos segundo as descrições de Van Milgen et al. (1991) e Vieira et al. (1997), de acordo com as equações a seguir, aplicadas, respectivamente, aos modelos descritos em (1) e (2):

$$t_i = \frac{\ln(c) - \ln(p)}{(c - p)} \quad (5);$$

$$t_i = \frac{1}{\lambda} \quad (6);$$

A taxa específica de crescimento microbiano sobre a fração potencialmente degradável da FDN foi estimada segundo proposições de Beuvink & Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{R'(t_i)}{U} \quad (7);$$

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1}).

A partir das estimativas de Sgr, obtiveram-se as eficiências de crescimento microbiano, conforme proposições de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{Sgr} + \frac{1}{Y_m} \quad (8);$$

em que: Y = eficiência microbiana ($g \text{ células} \cdot g^{-1} \text{ carboidrato degradado}$); m = exigência de manutenção das bactérias ($g \text{ carboidrato} \cdot g^{-1} \text{ célula} \cdot h^{-1}$); e Y_m = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato ($g \text{ células} \cdot g^{-1} \text{ carboidratos}$).

Adotou-se como referência ao parâmetro Y_m o valor de $0,4 g \text{ célula} \cdot g^{-1} \text{ carboidrato degradado}$ e, para m, o valor de $0,05 g \text{ carboidrato} \cdot g^{-1} \cdot \text{célula} \cdot h^{-1}$, conforme especificações de Russell et al. (1992).

Ressalta-se que as estimativas para o parâmetro Sgr foram obtidas com base nos valores médios gerais das frações U ($77,81 \pm 2,34$) e I ($22,95 \pm 2,98$), sob o pressuposto de estas serem características únicas e exclusivas do substrato (forragem) (Ørskov, 2000).

Os modelos ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes tratamentos foram comparados de forma descritiva. Por sua vez, os valores de pH e concentração de NA obtidos para os diferentes tempos de incubação foram avaliados segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando-se cada partida de incubação como bloco, em esquema fatorial $2 \times 4 \times 10$ (duas fontes de carboidratos, quatro diferentes relações proteína verdadeira:NNP e dez tempos de incubação). Todos os procedimentos estatísticos, tanto lineares como não-lineares, foram conduzidos por intermédio do programa SAS (*Statistical Analysis System*), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

As estimativas dos parâmetros da dinâmica de degradação da FDNpd da forragem são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Estimativas da taxa fracional de degradação (c), taxa de latência (p), taxa fracional comum para latência e degradação (λ), taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ (c') e tempo de latência discreta (L) para a degradação ruminal da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (FDNpd) e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função das relações protéicas e das fontes de carboidratos

Fonte Protéica	Relação Protéica			
	1	2/3	1/3	0
Caseína	1	2/3	1/3	0
Uréia	0	1/3	2/3	1
Amido				
c (h ⁻¹)	0,0715±0,0176	0,0785±0,0221	0,1061±0,0317	--
p (h ⁻¹)	0,2922±0,1705	0,2755±0,1678	0,2206±0,1039	--
λ (h ⁻¹)	--	--	--	0,1458±0,0072
c' (h ⁻¹) ¹	--	--	--	0,0870±0,0042
L (h)	1,72	1,73	1,78	1,93
DPA	5,14	5,48	3,54	3,72
Pectina				
c (h ⁻¹)	0,0766±0,0076	--	0,1055±0,0218	0,0896±0,0153
p (h ⁻¹)	0,3344±0,0865	--	0,2238±0,0707	0,2906±0,1031
λ (h ⁻¹)	--	0,1566±0,0099	--	--
c' (h ⁻¹) ¹	--	0,0934±0,0053	--	--
L (h)	1,53	1,80	1,77	1,60
DPA	2,33	4,58	2,13	3,02

^{1/} Estimado segundo propriedades da distribuição gama-2: $c' = 0,59635\lambda$.

Contrastando os extremos do perfil da taxa de degradação da FDNpd expressos na Figura 1, observou-se que a suplementação exclusiva com uréia elevou em 21,7 e 17,0% as estimativas obtidas em relação à suplementação exclusiva com caseína, considerando-se o amido e a pectina como fontes de carboidratos, respectivamente (Tabela 3). Esse comportamento implicou elevação de 5,0 e 2,0% na eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd, na ordem descrita anteriormente (Tabela 4).

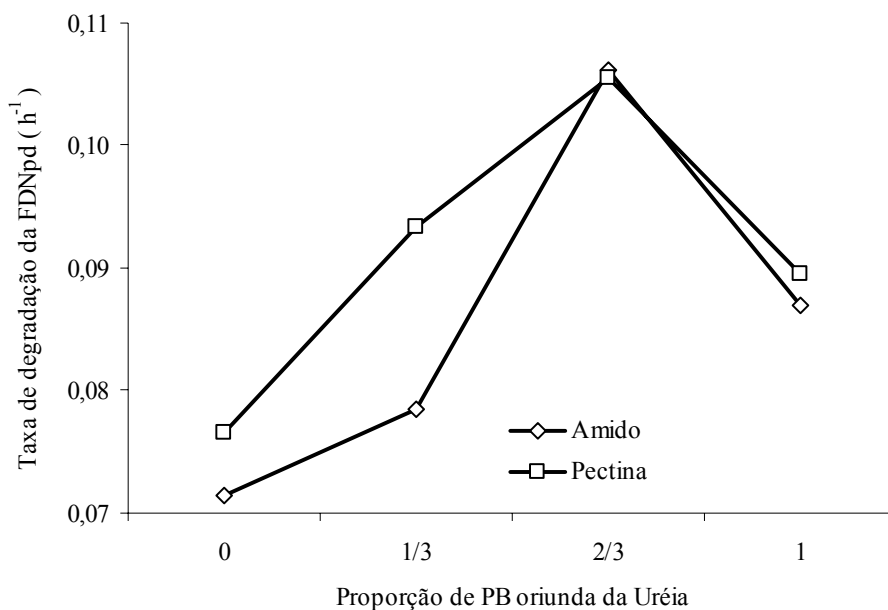


Figura 1 - Taxa fracional de degradação da FDNpd em função do nível de proteína oriundo da uréia.

Ressalta-se que ambas as fontes protéicas, quando fornecidas exclusivamente, não foram capazes de causar alterações significativas no pH ($P > 0,05$) e, embora havendo diferença significativa no tocante à concentração de NA ($P < 0,05$), os valores médios observados para essas fontes (Tabela 5) encontram-se acima do mínimo de 10 mg/dL exigido para a degradação ruminal eficiente dos carboidratos fibrosos (Leng, 1990; Lazzarini, 2007). Não foram verificados efeitos de interação sobre o pH e a concentração de NA ($P > 0,05$). O efeito do tempo sobre estas variáveis é apresentado na Figura 2.

Tabela 4 - Máxima taxa de degradação ($\mu - h^{-1}$), taxa de crescimento específico de microrganismos ($Sgr - h^{-1}$) e eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd da forragem (EFM - g MS microbiana/kg de carboidrato degradado no rúmen) em função das relações protéicas e das fontes de carboidratos

Fonte Protéica	Relação Protéica			
	1	2/3	1/3	0
Caseína	1	2/3	1/3	0
Uréia	0	1/3	2/3	1
Amido				
μ	3,5080	3,6849	4,1684	4,1523
Sgr	0,0453	0,0476	0,0538	0,0536
EFM	277,5	281,7	291,7	291,4
Pectina				
μ	3,8272	4,4599	4,1675	4,1053
Sgr	0,0494	0,0576	0,0539	0,0530
EFM	284,8	296,9	291,8	290,5

O efeito negativo da suplementação com proteína verdadeira sobre a degradação ruminal de carboidratos, sobretudo oriundos de forragens de alta qualidade, têm sido relatado por diversos autores (Cone & Van Gelder, 1999; Arroquy et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Costa, 2006; e Paez-Bernal et al., s.d.). Segundo Paez-Bernal et al. (s.d.), esse fenômeno seria denominado “efeito proteína” e pode ser atribuído ao amensalismo entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas no meio ruminal por intermédio da produção de compostos inibidores.

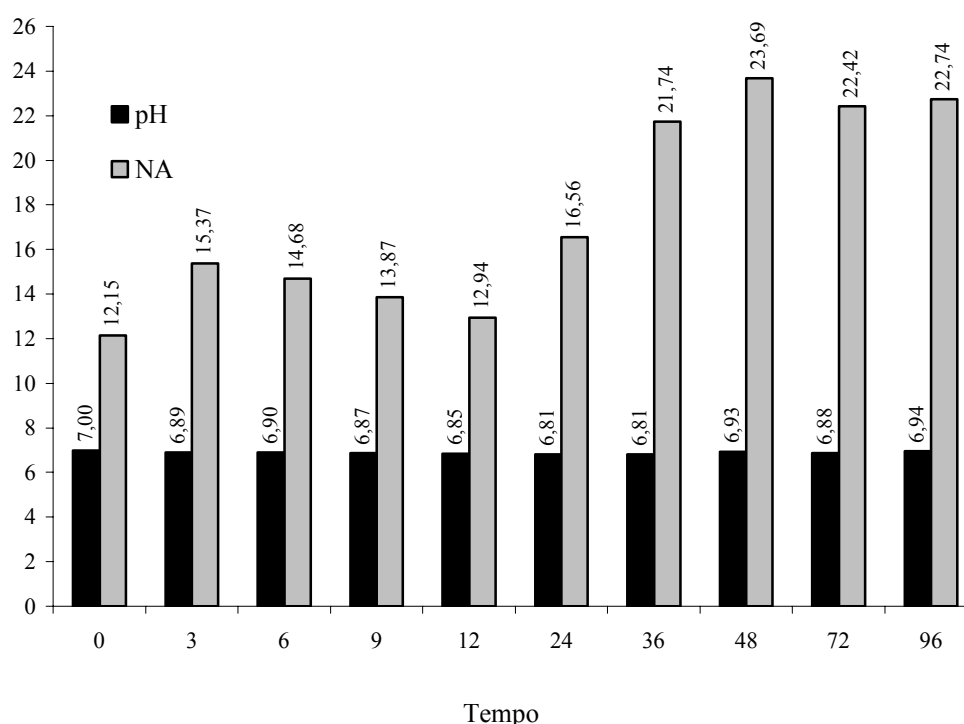


Figura 2 - Valores médios de pH e concentração de nitrogênio amoniacal (NA) no meio (mg/ dL) em função do tempo de incubação.

As bacteriocinas podem ser definidas como produtos primários ou modificados de liberação extracelular oriundos da síntese ribossomal, os quais apresentam estreito espectro de atividade bactericida, a qual, por sua vez, é caracterizada pelo fato de o microrganismo produtor apresentar algum mecanismo de autoproteção (Parente & Ricciardi, 1999). Segundo Wolin et al. (1997), a ação de bacteriocinas pode implicar redução da atividade celulolítica no rúmen.

Resultados obtidos *in vitro* permitem afirmar que a ampliação no fornecimento de aminoácidos implica incremento na produção de bacteriocinas (De Vuyst & Vandamme; 1993; Kim et al., 1997; Parente & Ricciardi, 1999; Aasen et al., 2000; e Mantovani &

Russell, 2003), o que poderia acarretar redução na atividade celulolítica ruminal. Nesse contexto, efeitos deletérios similares, portanto, não seriam obtidos com a suplementação exclusiva com uréia, devido ao fato de não se adicionarem aminoácidos ao meio (Paez-Bernal et al., s.d.).

Tabela 5 - Médias de mínimos quadrados para o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal (NA – mg/dL) do meio em função das relações protéicas e dos carboidratos suplementares

Relação Protéica		Variável ¹	
Caseína	Uréia	pH	NA
1	0	6,87a	15,99b
2/3	1/3	6,87a	18,46a
1/3	2/3	6,88a	17,24ab
0	1	6,92a	18,76a
Fonte de Carboidrato			
Amido		6,91a	17,34a
Pectina		6,87b	17,89a
CV (%)		1,3	21,2

^{1/} Médias na coluna, com relação à proporção protéica ou fontes de carboidrato, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05).

Segundo Paez-Bernal et al. (s.d.), a suplementação conjunta com carboidratos reduziria o “efeito proteína” em virtude da regulação catabólica sobre a liberação de bacteriocinas causada pela maior disponibilidade de carboidratos no meio (Mantovani & Russell, 2003). Contudo, os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que, mesmo podendo haver inibição catabólica com a suplementação com carboidratos (Mantovani & Russell, 2003; Paez-Bernal et al., s.d.), esta não foi suficiente para inibir completamente o “efeito proteína” em ambas as fontes de carboidratos (Tabela 3; Figura 1).

Embora a substituição total da caseína por uréia tenha elevado a taxa de degradação da FDNpd (Tabela 3), o que confirma resultados de outros autores (Paez-Bernal et al., s.d.), a avaliação do perfil de substituição gradativa permitiu evidenciar valores máximos de taxas de degradação na relação 2/3 U:SA:1/3 caseína (Tabela 3; Figura 1).

Considerando todos os componentes do sistema (forragem e suplemento), verificou-se participação percentual do NNP no total de PB, para amido e pectina, de: 37,1 e 36,0% para caseína; 53,0 e 51,3% para 2/3 caseína:1/3 U:SA; 69,5 e 67,3% para 1/3 caseína e 2/3 U:SA; e 86,4 e 83,6% para U:SA. Dessa forma, verifica-se que a relação total entre compostos nitrogenados não-protéicos e protéicos aproximou-se de 2/3:1/3 para o suplemento com 2/3 de U:SA.

Segundo Russell et al. (1992), as bactérias que degradam CNF utilizam 2/3 de seus substratos nitrogenados na forma de peptídeos e 1/3 na forma de amônia, potencialmente produzida a partir da uréia. Por sua vez, as bactérias que degradam carboidratos fibrosos usam unicamente nitrogênio não-protéico para crescimento. Considerando a média entre os dois grupos de bactérias, ter-se-ia perfil ideal para crescimento microbiano total no rúmen a partir do fornecimento de mistura de compostos nitrogenados formada por 1/3 de peptídeos e 2/3 por compostos fornecedores de nitrogênio amoniacal (ex.: uréia), confirmando os resultados aqui obtidos.

O maior estímulo ao crescimento global de microrganismos no sistema pode ser indiretamente reiterado pelo comportamento das estimativas de concentração de NA (Tabela 5). Embora a completa substituição de caseína por uréia tenha elevado a concentração média de NA ($P < 0,05$), observou-se que a substituição gradativa não implicou elevação uniforme das estimativas, com pequena queda ($P < 0,05$) verificada na relação 1/3 caseína:2/3 U:SA (Tabela 5), o que pode indicar maior assimilação de substratos pelos microrganismos presentes no meio (fibrolíticos e não-fibrolíticos).

Os processos fibrolíticos e do crescimento das bactérias que os realizam devem ser enfatizados na importância das interações com outras espécies microbianas, as quais provêm compostos essenciais, como vitaminas do complexo B e ácidos graxos de cadeia ramificada, os quais funcionam como precursores de aminoácidos essenciais, ácidos graxos estruturais e alguns aldeídos (Bryant, 1973). Assim, dietas com níveis demasiadamente elevados de PB oriunda de fontes não-protéicas podem conduzir a um quadro em que, mesmo se mantendo níveis adequados de NA, como observados neste estudo (Tabela 5), apresentar-se-ia deficiência de proteína verdadeira degradável no rúmen, cuja adição à dieta poderia levar a melhorias na produção microbiana (Hoover & Stockes, 1991).

Por sua vez, dietas com excesso de proteína verdadeira poderiam limitar a disponibilização de NA aos microrganismos que degradam carboidratos fibrosos (Russell et al., 1992), além de imprimirem com maior severidade a ocorrência do efeito proteína, como discutido anteriormente.

Assim, o equilíbrio entre fontes nitrogenadas nos suplementos pode ampliar a utilização da FDNpd de forragens tropicais de boa qualidade, ao prover a minimização do efeito proteína e permitir o suprimento de peptídeos degradáveis no rúmen para que as exigências das bactérias não-fibrolíticas sejam satisfeitas e para que, a partir de interações positivas entre espécies, sejam fornecidos substratos essenciais ao crescimento das bactérias fibrolíticas.

Conclusão

A suplementação protéico-energética incluindo dois terços da proteína bruta como nitrogênio não-protéico e o terço restante como proteína verdadeira degradável proporcionou as maiores taxas de degradação de FDNpd de capim-baquiária de alta qualidade, independentemente da fonte de carboidrato utilizada.

Literatura Citada

- AASEN, I.M.; MØRETRØ, T. ; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRØ, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.159-166. 2000.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN, R.C.; NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C.; JOHNSON, D.E. Effect of types of non-fiber carbohydrate on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science Technology**, v.120, p.93-106, 2005.
- BALSALOBRE, M.A.A.; SANTOS, P.M.; CORSI, M.; MEDEIROS, S.R.; BANIN R.L. Desempenho de novilhos em crescimento recebendo suplementação à pasto durante o verão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999.p246
- BEUVINK, J.M.W.; KOGUT, J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated in ruminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1041-1046, 1993.
- BRYANT, M.P. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. **Federation Proceedings**, v.32, p.1809-1813, 1973.
- CONE, J.W.; Van GELDER, A.H. Influence of protein fermentation on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.251-264, 1999.
- COSTA, V.A.C. **Dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragens tropicais em função de suplementação protéica e/ou energética.** 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) –Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- De VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* batch fermentations using complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.40, p.17-22. 1993.
- ELLIS, W.C., MATIS, J.H., HILL, T.M.; MURPHY, M.R. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization.** Wisconsin: American Society of Agronomy, 1994, p.682-756.
- EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B.A.; JOHNSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.20, p.268-273, 1961.

- HAFLEY, J.L.; ANDERSIN, B.E.; KLOPFENSTEIN, T.J. Supplementation of growing cattle grazing warm-season grass with proteins of various ruminal degradability. **Journal of Animal Science**, v.71, p.522-529, 1993.
- HOOVER, W.H & STOKES S. R. Balancing Carbohydrates and Proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3630-3644, 1991.
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? **Journal of Animal Science**, v.79, p.2297-2306, 1996.
- KIM, W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.449-453, 1997.
- LAZZARINI, I. **Consumo, digestibilidade e dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados**. 2007. 52p Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Review**, v.3, p.277-303, 1990.
- LICITRA, G.; HERNANDES, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardizations of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. Factors affecting the antibacterial activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* HC5. **Current Microbiology**, v.46, p.18-23, 2003.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep’s saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MERTENS, D.R.. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217–1240, 2002.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p 1437 -1446, 1980.
- MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R., MANNS, O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, n.1, p.15-30, 1983.
- MORAES E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; FIGUEIREDO, D.M.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E; SALES M.F.L.; PORTO, M.O.; LAZZARINI, I.; SOUZA, M.G.; COUTO, V.M.; MORAES K.A.K. Desempenho de novilhos de corte submetidos a diferentes frequências de suplementação no período das águas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. (CD ROM).
- OLIVEIRA, A.L.F.; CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T. Efeito da fermentação de proteínas na cinética de produção de gases *in vitro*. In: ZOOTEC’2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Zootecistas, 2005. (CD-ROM).

- ØRSKOV, E. R. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In : GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. (Eds) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.175-188.
- PAEZ-BERNAL, D. M.; DETMANN, E. ; QUEIROZ, A.C. Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, s.d. (submetido).
- PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SIMCORTE, 2002. p.153-196.
- PAULINO, M.F.; MOARES, E.H.B.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ALEXANDRINO, E.; FIGUEIREDO, D.M. Fontes de energia em suplementos múltiplos de auto-regulação de consumo na recria de novilhos mestiços em pastagem de *Brachiaria decumbens* durante período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.3, p. 957-962, 2005.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.628-638, 1999.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073.
- PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society, Series B**, v.163, p.224-231, 1965.
- PIWONKA, E.J.; FIRKINS, J. L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2196-2206, 1993.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- PORTO, M.O. **Suplementos múltiplos para terminação de bovinos a pasto**. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, 2002. 119p.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G.; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- RUSSELL, J.B.; BALDWIN, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.319-329, 1978.
- SANTOS, F.A.P.; COREIA, P.S.; COSA, D.F.A. Sistemas intensivos de recria de bovinos com suplementação em pastagens e terminação em confinamento. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 6, 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba,SP: FEALQ, 2007. p. 163-181
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235 p.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.

- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 2515-2529, 1991.
- VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephant grass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal. Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.
- WOLIN, M.J.; MILLER, T.L.; STEWARD, C.S. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed.: London: Chapman Hall, 1997. p.467-491.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, destacam-se como principais conclusões e implicações:

A suplementação isolada com proteína verdadeira e carboidratos causou efeitos deletérios sobre a utilização da fibra em detergente neutro em função de interações negativas entre espécies microbianas fibrolíticas e não-fibrolíticas. Esses efeitos, contudo, apresentaram comportamento de regulação cruzada, sendo amenizados com a suplementação simultânea com esses compostos.

A suplementação com uréia incrementou a degradação da fibra em detergente neutro, em razão da melhor adequação físico-química do ambiente de fermentação e da possível ausência de relações amensais entre espécies microbianas.

A suplementação protéico-energética incluindo dois terços da proteína bruta como nitrogênio não-protéico e o terço restante como proteína verdadeira degradável proporcionou as maiores taxas de degradação de FDN_{pd} de capim-baquiária de alta qualidade, independentemente da fonte de carboidrato utilizada.