



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO PARA
MELHORIA DA DEGRADABILIDADE DE FORRAGEM PARA CAPRINOS**

JOSÉ ADELSON SANTANA NETO

AREIA-PB
AGOSTO – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO PARA
MELHORIA DA DEGRADABILIDADE DE FORRAGEM PARA CAPRINOS**

JOSÉ ADELSON SANTANA NETO

Zootecnista

AREIA-PB
AGOSTO – 2017

JOSÉ ADELSON SANTANA NETO

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO
PARA MELHORIA DA DEGRADABILIDADE DE FORRAGEM
PARA CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição e Produção de Ruminantes

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Juliana Silva de Oliveira

AREIA-PB

AGOSTO - 2017

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia – PB.*

S232e Santana Neto, José Adelson.

Determinação da Concentração de Nitrogênio
para Melhoria da Degradabilidade de Forragem para
Caprinos / José Adelson Santana Neto. - Areia,
2017.
157 f. : il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Carboidratos fibrosos. 3.
Nitrogênio não protéico. 4. Microbiota ruminal. 5.
Proteína verdadeira. 6. Rúmen. I. Oliveira, Celso
José Bruno de.
II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA
UFPB – UFC – UFRPE

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Determinação da concentração de nitrogênio para melhoria da degradabilidade de forragem para caprinos”

AUTORA: José Adelson Santana Neto

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

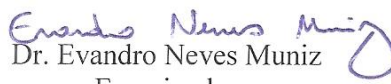
J U L G A M E N T O

CONCEITO: APROVADO

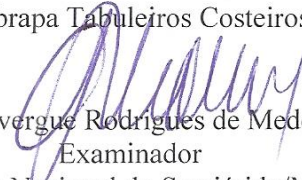
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Dra. Alenice Ozino Ramos
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Dr. Evandro Neves Muniz
Examinador
Embrapa Tabuleiros Costeiros


Dr. José Henrique de Albuquerque Rangel
Examinador
Embrapa Tabuleiros Costeiros


Dr. Geovergue Rodrigues de Medeiros
Examinador
Instituto Nacional do Semiárido/MCT

Areia, 31 de agosto de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ ADELSON SANTANA NETO, filho de José Erivaldo Santana e Maria Auxiliadora Gomes Santana e pai de Elisa Alves Santana, nasceu em Aracaju, Sergipe, no dia 09 de Setembro de 1986. Em Março de 2007, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Federal de Sergipe, concluindo este em Julho de 2011. Em agosto de 2011, iniciou o Curso de Pós – Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração em Produção Animal no Semi-árido, com a linha de pesquisa em Alimentação e Nutrição Animal, na Universidade Federal da Sergipe, desenvolvendo estudos na área de Avaliação de Alimentos para Terminação de Cordeiros. No dia 31 de Julho de 2013, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de Mestrado. Em Setembro de 2013 iniciou suas atividades no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia CCA/UFPB. Em Agosto de 2017 submeteu-se à banca examinadora para defesa da Tese de Doutorado.

“Não há diferença fundamental entre o Homem e os animais nas suas faculdades mentais(...) Os animais, como o Homem, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento”

Charles Darwin

“(...) a natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Esta é uma das lições mais duras que os humanos têm de aprender.”

Richard Dawkins

“Não há nada de que se desculpar por ser ateu. Pelo contrário, é uma coisa da qual se deve ter orgulho, encarando o horizonte de cabeça erguida, já que o ateísmo quase sempre indica uma independência de pensamento saudável e, mesmo, uma mente saudável.”

Richard Dawkins

DEDICO...

À minha filha Elisa Santana, por me ensinar um novo significado do amor.

À minha amada esposa Ana Alves, por todo amor, carinho, dedicação e compreensão.

À minha mãe Maria Auxiliadora e ao meu pai José Erivaldo Santana, pelo amor e confiança depositados, pelos exemplos de caráter, pela educação e pelo incentivo e apoio em todos momentos.

À minha irmã, meus avós, tios e amigos, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa amada Ana Alves, minha amiga e eterna namorada, foi um período difícil, onde em alguns momentos pensei em desistir, mas sempre encontrei, em você, a força necessária para continuar, obrigado pelo amor incondicional, paciência, incentivo e, em especial, obrigado por ter me dado minha filha, Elisa Santana, que nem completou um ano de vida, mas já mudou totalmente minha compreensão e entendimento do que é o amor.

Agradeço muito aos meus pais, José Erivaldo (Galego) e Maria Auxiliadora (Dôra). À minha mãe, pelas cobranças em relação aos estudos. Obrigado por todo amor e carinho, a senhora é muito importante para mim. Ao meu pai, um exemplo de homem e de pai para mim, pelo esforço feito para poder me proporcionar sempre uma educação de qualidade, com a qual adquiri conhecimentos que carregarei por toda minha vida. Esse foi o maior presente que ele poderia ter me dado. À minha irmã, Benizia, que apesar de ser uma chatice na minha vida, sempre torceu muito pelas minhas vitórias e comemorou minhas conquistas. Aos meus fiéis companheiros caninos Suzy, Lua e Luke.

Aos meus avós maternos, Benildo (*in memoriam*) e Nivalda, por todo amor, carinho e proteção. Sei que fui e sou muito amado por vocês. À minha avó materna Maria, pelo apoio e preocupação demonstrada, sempre disposta a me ajudar no que fosse preciso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPB, funcionários e a todos os professores do programa que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira pela orientação, paciência e oportunidade. À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Juliana Silva de Oliveira pela orientação à realização deste trabalho e amizade. Obrigado aos meus orientadores por todo conhecimento repassado. Meus agradecimentos ao pessoal do Laboratório do setor de Forragicultura pela ajuda nos trabalhos, em especial ao Prof. Dr. Edson Mauro por abrir as portas do laboratório para que pudesse realizar minhas análises laboratoriais.

Aos alunos da graduação Vinicius e Priscila, pela ajuda no laboratório, sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil. Carregarei a amizade de vocês para sempre. Meus agradecimentos para Elizabete e Alberto, sempre prontos para ajudar nas análises laboratoriais.

Aos doutores Evandro Neves Muniz, José Henrique Albuquerque Rangel, Geovergue Rodrigues de Medeiros e Alenice Ozino Ramos pela boa vontade e colaboração importantíssima a minha tese.

Meu agradecimento especial para Candice, sempre disposta para ajudar, não foram poucos os momentos em que precisei de ajuda e você sempre estava pronta para ajudar.

Aos meus colegas de república Cosme, Paulo e Gilmar pelo companherismo.

E a todos que não citei, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu pudesse realizar este sonho.

SÚMARIO

	Página
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Figuras	XIV
Resumo Geral.....	XVI
General Abstract.....	XVIII
Considerações Iniciais.....	20
CAPÍTULO 1 - APROVEITAMENTO DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS PELOS RUMINANTES DOMÉSTICOS.....	21
Introdução.....	22
Digestão de Carboidratos Fibrosos Pelos Ruminantes.....	23
Degradação Ruminal de Carboidratos Fibrosos.....	20
Utilização de Fontes de Nitrogênio por Microrganismos Fermentadores de Carboidratos Fibrosos.....	36
Cinética da Degradação da Fibra em Detergente Neutro de Forrageiras Tropicais.....	43
Considerações Finais.....	52
Referências Bibliográficas.....	53
CAPÍTULO 2 - DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA SOBRE A DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS DE CAPIM-BUFFEL.....	69
Resumo.....	70
Abstract.....	71
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	73
Resultados e Discussão.....	79
Conclusões.....	91
Referências Bibliográficas.....	91
CAPÍTULO 3 - SUBSTITUIÇÃO DO NITROGÊNIO NÃO PROTEICO POR PROTEÍNA VERDADEIRA SOBRE A DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS DE CAPIM-BUFFEL.....	98
Resumo.....	99
Abstract.....	100
Introdução.....	101
Material e Métodos.....	101
Resultados e Discussão.....	108
Conclusões.....	120
Referências Bibliográficas.....	120

CAPÍTULO 4 - COMPOSTOS NITROGENADOS ASSOCIADOS A UMA FONTE DE CARBOIDRATO NÃO FIBROSO SOBRE A DEGRADAÇÃO IN VITRO DA FDN DE CAPIM-BUFFEL.....	127
Resumo.....	128
Abstract.....	129
Introdução.....	130
Material e Métodos.....	131
Resultados e Discussão.....	137
Conclusões.....	149
Referências Bibliográficas.....	150
 Considerações Finais e Implicações.....	 157

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Teor de PDR e PNDR em relação ao teor de proteína bruta dos principais alimentos proteicos utilizadas na alimentação de ruminantes.....	29
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição bromatológica do Capim-buffel e da uréia.....	65
Tabela 2 - Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de amônia e proteína microbiana as 0 e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	71
Tabela 3 - Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de ácidos graxos voláteis em 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	74
Tabela 4 - Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre o pH do meio as 0 e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	75
Tabela 5 - Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDN potencialmente degradável e desvios-padrão assintóticos (DPA) em função dos tratamentos.....	77
Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a FDN potencialmente degradável em função dos tratamentos.....	79
Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função dos diferentes tratamentos.....	81

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição bromatológica do Capim-buffel, da uréia e da caseína.....	93
Tabela 2 - Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre a concentração de nitrogênio amoniacal e proteína microbiana as 0 e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	99
Tabela 3 - Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre o pH do meio as 0 horas e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	103
Tabela 4 - Concentrações dos ácidos graxos voláteis e lactato em função à substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).....	104
Tabela 5 - Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da fibra em detergente neutro potencialmente degradável e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função das substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).....	106
Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a fibra em detergente neutro potencialmente degradável em função das substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).....	109
Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função das	

substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).....	110
--	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Composição da forragem e dos componentes dos suplementos.....	124
Tabela 2 - Efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados sobre a concentração de nitrogênio amoniacal e proteína microbiana as 0 hora e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	129
Tabela 3 - Efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso sobre o pH do meio as 0 horas e 48 horas de incubação <i>in vitro</i>	133
Tabela 4 - Médias das concentrações dos ácidos graxos voláteis e lactato em relação à fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.....	133
Tabela 5 - Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.....	137
Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a FDNpd em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.....	139
Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.....	140

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Esquema da degradação de carboidratos estruturais pelas bactérias ruminai.....	26
Figura 2 - Rota Glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).....	27
Figura 3 - Proporções dos AGV em relação a atividade microbiana e pH.....	28
Figura 4 - Degradação proteica pelos microrganismos ruminai.....	31
Figura 5 - Representação esquemática da colonização de uma partícula de alimento pelas bactérias ruminai.....	36

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de amônia e proteína microbiana ao longo de 96 horas de incubação <i>in vitro</i>	73
Figura 2 - Degradação da FDN (%) em relação aos níveis experimentais de nitrogênio amoniacal.....	82

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre a concentração de amônia (a) e proteína microbiana (b) ao longo de 96 horas de incubação <i>in vitro</i>	101
Figura 2- Degradação da FDN (%) em relação a substituição das fontes de compostos nitrogenados.....	

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Efeito de níveis de substituição da uréia por caseína associado a uma fonte de carboidrato não fibroso sobre a concentração de amônia (a) e proteína microbiana (b) ao longo de 96 horas de incubação <i>in vitro</i>	131
Figura 2 - Degradação da FDN (%) em relação a fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.....	141

RESUMO GERAL

O objetivo foi avaliar a dinâmica da degradação da fibra em detergente neutro (FDN) advindo de forragem em função da suplementação com compostos nitrogenados em caprinos. Foram realizados ensaios *in vitro* no Laboratório do Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia pertencente à Universidade Federal de Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, no município de Areia/PB. No primeiro experimento foram utilizados seis concentrações de nitrogênio amoniacal (0, 5, 10, 15, 20 e 30 mg/dL) em meio de cultura de microrganismos ruminais contendo o feno de capim-buffel como substrato. Para isto foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 9, com três repetições. No segundo experimento foram utilizadas cinco combinações entre nitrogênio não proteico (uréia) e proteína verdadeira (caseína), em meio de cultura de microrganismos ruminais contendo o feno de capim-buffel como substrato. As combinações foram determinadas a partir dos resultados do primeiro experimento. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 9, com três repetições. No terceiro experimento foram utilizadas seis combinações diferentes de nitrogênio não proteico (uréia), proteína verdadeira (caseína) e carboidrato não fibroso (amido) em meio de cultura de microrganismos ruminais contendo o feno de capim-buffel como substrato. As combinações foram determinadas a partir dos resultados do primeiro experimento. O delineamento foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 6 x 9, com três repetições. Em todos os experimentos os parâmetros avaliados foram: pH, concentração de amônia, concentração de proteína microbiana, concentração de ácidos graxos voláteis e digestibilidade *in vitro* da FDN em 96 horas de incubação. Em todos os experimentos, os resíduos da incubação foram avaliados em relação ao teor de FDN e analisados por intermédio de modelo logístico não-linear. No primeiro ensaio, foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) para as concentrações ruminais de acetato e propionato, com aumento no nível de $N-NH_3$. O tratamento com 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, apresentou médias de 57,6 e 23,1 mM para acetato e propionato, respectivamente, com ponto de máximo de 16,4 e 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal. A adição da uréia elevou de 2,5 a 20,1% a taxa de degradação da FDNpd em comparação ao tratamento sem adição de uréia e uma redução na estimativa de latência discreta de 0,34 a 2,31 horas. A suplementação com uréia elevou em 2,6 a 20,1% a taxa de crescimento específico de microrganismos. A degradação da FDN, ao término do ensaio de incubação, apresentou efeito quadrático com ponto de máxima com 17,76 mg/dL de líquido ruminal. No segundo ensaio, a substituição da uréia pela caseína em até 50% elevou em 17,42% a taxa de degradação da FDN potencialmente degradável (FDNpd) em comparação ao tratamento sem substituição. A taxa de degradação da FDNpd decresceu nos tratamentos com 75 e 100% de substituição em 6,53 e 13,57%, respectivamente. O tratamento com 50% de substituição obteve uma redução na estimativa de latência discreta de 1,31 horas em comparação ao tratamento com 0% de substituição e uma redução de 2,7 horas em comparação ao tratamento com 100% de substituição. A substituição em até 50% de nitrogênio não proteico por proteína verdadeira proporcionou um crescimento microbiano, em torno, de 16,1% mais eficiente. A substituição da uréia pela caseína não afetou ($P > 0,05$) as concentrações de acetato e propionato. No terceiro ensaio, o tratamento com 0% de PV apresentou um valor mais elevado de proteína microbiana, 545,8 mg/L, enquanto o tratamento com

100% de PV obteve o menor valor entre todos os níveis de substituição, 426,6 mg/L, valor próximo ao tratamento sem adição de compostos nitrogenados, 423,1 mg/L. A substituição do NNP pela PV afetou ($P<0,05$) as concentrações de acetato. A maior concentração de AGVs Totais foi observada no tratamento com 100% de NNP. A substituição do NNP pela PV em 100% provocou um decréscimo de 28,98% na taxa de degradação em comparação ao tratamento sem com 0% de NNP. A adição da PV em substituição ao NNP em 100% diminuiu em 29,02% a taxa de crescimento específico de microrganismos e em 8,86% a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd no tratamento com 100% de PV. A utilização de compostos nitrogenados, de forma geral, otimizou a degradação da FDN do capim-buffel. No primeiro ensaio, o nível ótimo de nitrogênio amoniacal é de 17,76 mg/dL para uma máxima degradação da FDN. No segundo ensaio, a proporção de 50% de NNP e 50% de PV otimizou a degradação da FDN do capim-buffel. No terceiro ensaio, a utilização de 100% de NNP como única fonte de composto nitrogenado, associado a uma fonte de CNF, no meio ruminal, aumentou as concentrações de acetato e concentração total de AGV, melhorando o aproveitamento da FDN do capim-buffel.

Palavra-chave: carboidratos fibrosos, nitrogênio não protéico, microbiota ruminal, proteína verdadeira, rúmen

GENERAL ABSTRACT

The objective was to evaluate the dynamics of neutral detergent fiber (NDF) degradation from forage as a function of nitrogen supplementation in goats. *In vitro* tests were performed at the Laboratory of the Forage Sector of the Department of Animal Science belonging to the Federal University of Paraíba (UFPB), Center of Agrarian Sciences, in the city of Areia/PB. In the first experiment six concentrations of ammoniacal nitrogen (0, 5, 10, 15, 20 and 30 mg/dL) were used in culture medium of ruminal microorganisms containing buffel grass hay with substrate. For this, a completely randomized design was used, in a 6 x 9 factorial scheme, with three replications. In the second experiment, five combinations of non-protein nitrogen (urea) and true protein (casein) were used in culture medium of ruminal microorganisms containing buffel grass hay as substrate. Combinations were determined from the results of the first experiment. A completely randomized design was used in a 5 x 9 factorial scheme with three replications. In the third experiment, six different combinations of non-protein nitrogen (urea), true protein (casein) and non-fibrous carbohydrate (starch) were used in culture medium of ruminal microorganisms containing buffel grass hay as substrate. Combinations were determined from the results of the first experiment. The design was completely randomized, in the factorial scheme 6 x 9, with three replications. In all experiments the parameters evaluated were pH, ammonia concentration, microbial protein concentration, volatile fatty acid concentration and *in vitro* digestibility of NDF in 96 hours of incubation. In all experiments, the residues from the incubation were evaluated in relation to the NDF content and analyzed by means of a nonlinear logistic model. In the first assay, a quadratic effect ($P < 0.05$) was observed for the ruminal concentrations of acetate and propionate, with an increase in the $N-NH_3$ level. Treatment with 15 mg/dL of ammoniacal nitrogen in the ruminal fluid presented mean values of 57.6 and 23.1 mM for acetate and propionate, respectively, with a maximum point of 16.4 and 15 mg/dL of ammoniacal nitrogen in the ruminal liquid. The addition of urea increased the degradation rate of NDFpd from 2.5 to 20.1% compared to the treatment without addition of urea and a reduction in the discrete latency estimate of 0.34 to 2.31 hours. Urea supplementation increased the specific growth rate of microorganisms by 2.6 to 20.1%. The degradation of the NDF at the end of the incubation test showed a quadratic effect with maximum point with 17.76 mg/dL ruminal liquid. In the second assay, the substitution of urea by casein by up to 50% increased the rate of degradation of potentially degradable NDF (NDFpd) by 17.42% compared to treatment without substitution. The rate of degradation of the NDFpd decreased in treatments with 75 and 100% substitution in 6.53 and 13.57%, respectively. The 50% replacement treatment obtained a reduction in the discrete latency estimate of 1.31 hours compared to the 0% replacement treatment and a 2.7 hour reduction compared to the 100% replacement treatment. Replacement by up to 50% of non-protein nitrogen by true protein provided a microbial growth of around 16.1% more efficiently. Replacement of urea by casein did not affect ($P > 0.05$) acetate and propionate concentrations. In the third trial, treatment with 0% PV had a higher value of microbial protein, 545.8 mg/L, while treatment with 100% PV had the lowest value among all replacement levels, 426.6 mg/L of ruminal fluid, value close to the treatment without addition of nitrogen compounds, 423.1 mg/L. Replacement of NPN by TP affected ($P < 0.05$) the concentrations of acetate. The highest concentration of total VFAs

was observed in the treatment with 100% NPN. The substitution of NPN by TP in 100% caused a decrease of 28.98% in the rate of degradation compared to the treatment without 0% of NPN. Addition of TP in substitution to 100% NPN decreased the specific growth rate of microorganisms by 29.02% and microbial growth efficiency over NDF in the 100% TP treatment by 8.86%. The use of nitrogen compounds, in general, optimized the degradation of NDF of buffelgrass. In the first test, the optimum level of ammoniacal nitrogen is 17.76 mg / dL for maximum degradation of NDF. In the second assay, the proportion of 50% NPN and 50% TP optimized the NDF degradation of buffel grass. In the third trial, the use of 100% NPN as the only source of nitrogen compound, associated with a source of NFC, in the ruminal environment, increased the concentrations of acetate and total concentration of VFA, improving the use of NDF of buffelgrass.

Keyword: carbohydrates, non-protein nitrogen, rumen, ruminal microbiota, true protein

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As plantas forrageiras são as principais fontes de nutrientes para os ruminantes nos trópicos. Por serem ricas em carboidratos fibrosos, se tornam a principal fonte de energia para estes animais. Entretanto, principalmente na época seca do ano, as forragens apresentam baixo valor nutricional, com elevados teores de lignina e baixos teores de proteína bruta, podendo limitar a digestão da fibra no rúmen. A eficiência na utilização dessa fonte de energia pode ser otimizada quando se estimula o crescimento dos microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos.

Sabe-se que a maioria das espécies bacterianas ruminais podem utilizar amônia para síntese de seus compostos nitrogenados, principalmente para as bactérias que degradam os carboidratos fibrosos, visto que a amônia é essencial para seu crescimento. Quando se estimula o crescimento desses microrganismos ocorre maior fermentação de celulose e hemicelulose, tendo maior produção dos ácidos graxos voláteis, que são utilizados como fonte de energia pelos ruminantes.

A população microbiana do rúmen é influenciada por vários fatores, inclusive pela espécie hospedeira, entretanto, ainda é indefinida a concentração de nitrogênio no rúmen que otimize o processo de fermentação dos carboidratos fibrosos. Os trabalhos realizados com este intuito foram feitos, em sua maioria com bovinos e ovinos, sendo os trabalhos com caprinos escassos na literatura.

Ter o conhecimento dessa concentração de amônia no rúmen de caprinos é de suma importância, pois permite utilizar de forma mais eficiente não só a forragem, mas também as fontes de nitrogênio. Ao se determinar a concentração de amônia no rúmen dos animais para otimização da digestão da fibra, se evitará também, a utilização em excesso de fontes de proteína, diminuindo o custo na alimentação animal.

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de fontes de nitrogênio no rúmen necessários para otimizar a digestão da fibra de forragens e sua dinâmica em caprinos, promovendo o melhor aproveitamento de fontes de carboidratos fibrosos e, dessa maneira, incrementando o desempenho animal.

CAPÍTULO 1

APROVEITAMENTO DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS PELOS RUMINANTES DOMÉSTICOS

INTRODUÇÃO

O rebanho de ruminantes no Brasil vem crescendo continuamente. O efetivo bovino brasileiro representou cerca de 215,2 milhões de animais em 2015, com um aumento de 1,3%^o em relação ao ano anterior (IBGE, 2016). Segundo o IBGE (2016), o rebanho nacional de caprinos, em 2014, alcançou 8,8 milhões de cabeças, sendo 8,1 milhões de cabeças só na região Nordeste (91,6% do rebanho brasileiro), enquanto o rebanho ovino registrou em 2014 o número de 17,6 milhões de cabeças, das quais 10,1 milhões estavam na região Nordeste (57,5%) e 5,1 milhões na região Sul (29,3%).

Segundo Magalhães et al. (2016), apesar da recente crise econômica e dos anos seguidos de seca nas diferentes regiões do Brasil, os rebanhos de caprinos e ovinos aumentaram no país nos últimos três anos. Porém, os produtores necessitam encontrar alternativas para redução de custos, principalmente, com a alimentação do rebanho, para que a atividade seja, cada vez mais, rentável.

Os ruminantes apresentam algumas particularidades em relação ao trato gastrointestinal, onde ocorre uma relação de simbiose com microrganismos ruminais, que é responsável pelo aproveitamento da fibra para obtenção de energia. Como a fibra representa a fração dos carboidratos de digestão lenta ou indigestível dos alimentos, ela ocupa um maior espaço no rúmen e, em função de sua concentração e digestibilidade, impõe limitações ao consumo de matéria seca. Devido a esta característica é de fundamental importância conhecer os mecanismos envolvidos no aproveitamento da fibra pelos ruminantes, uma vez que a máxima degradação da fibra favorece uma maior taxa de passagem e taxa de digestibilidade e, conseqüentemente, um aumento do consumo e melhora no desempenho.

Para se obter maior eficiência no processo de degradação da fibra pelos microrganismos ruminais, é importante observar alguns aspectos, tais como: características da população microbiana ruminal envolvida no processo de fermentação dos carboidratos fibrosos; os mecanismos utilizados por estes microrganismos na degradação como, adesão ao substrato, tipo do substrato, complexo enzimático que catalisam a hidrólise dos componentes fibrosos; e a associação dos microrganismos com suplementos energéticos ou nitrogenados, para maior crescimento microbiano e, conseqüentemente, maior aproveitamento dos carboidratos fibrosos.

Diante às considerações feitas, o propósito desta revisão foi abordar as bases teóricas da digestão dos componentes fibrosos pelos ruminantes, com ênfase na anatomia dos ruminantes, população microbiana envolvida na degradação da fibra, utilização de compostos nitrogenados, taxa de passagem e taxa de degradação da fibra de forragens nos trópicos.

DIGESTÃO DE CARBOIDRATOS FIBROSOS PELOS RUMINANTES

Os ruminantes evoluíram há cerca de 55 a 36 milhões de anos, no período conhecido como Eoceno e representavam uma especialização dentro dos *Artiodáctilos*, uma ordem que contém as espécies ruminantes de maior importância econômica para o homem, tanto na obtenção de alimentos e vestuário, como também no trabalho para força motora, como no transporte e arado da terra. As espécies de maior interesse são os bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos (VAN SOEST, 1994; FERNÁNDEZ e VRBA, 2005).

Estas espécies de ruminantes evoluíram a partir de uma necessidade de sobrevivência, onde a habilidade de ruminação, ou seja, a capacidade de regurgitar o alimento consumido em pequenas porções de bolo alimentar, de volta à boca, para fazer uma segunda mastigação e, em seguida, deglutí-lo definitivamente, visa a proteção contra predadores. Isso porque quando estão pastando, estão vulneráveis a ataques de predadores e, por isso, necessitam consumir a maior quantidade de alimento em um menor intervalo de tempo possível. Com o desenvolvimento evolutivo, surgiram os microrganismos pré-gástricos, que estão alocados no rúmen e são responsáveis pela fermentação do alimento. Acredita-se que os pré-estômagos têm evoluído do esôfago ou região cardíaca do estômago (DEHORITY, 2002).

Os ruminantes domésticos se enquadram na subordem *Ruminantia* que abrange quase 160 espécies alocadas em seis famílias diferentes (*Tragulidae*, *Giraffidae*, *Antilocapridae*, *Moschidae*, *Cervidae* e *Bovidae*). Trata-se do grupo mais importante de grandes mamíferos herbívoros terrestres. Além disso, eles são facilmente encontrados na maioria dos continentes do mundo, com exceção da Austrália e Antártica (FERNÁNDEZ e VRBA, 2005).

No processo evolutivo, os ruminantes divergiram quanto ao hábito de pastejo e, como consequência, surgiram variações anátomo-fisiológicas nos compartimentos pré-estômacais (rúmen, retículo, omaso) e abomaso (estômago verdadeiro). Essa diferença anatômica influencia a seletividade e o aproveitamento das frações fibrosas nas diferentes espécies de ruminantes.

É possível classificarmos os ruminantes de acordo com seu hábito alimentar, existindo o grupo de consumidores de concentrados, seletores intermediários e os comedores de gramíneas (HOFFMAN, 1988; CHURCH, 1993). Entre as espécies domésticas de ruminantes mais exploradas no Brasil, podemos classificar os caprinos como seletores intermediários, os ovinos, bovinos e bubalinos como comedores de gramas.

Os ruminantes consumidores de concentrados, alimentam-se predominantemente de forrageiras dicotiledóneas lenhosas e não-lenhosas, tais como folhas de árvores, ervas, arbustos ou frutos silvestres. Os seletores intermediários, como por exemplo, os caprinos, consomem basicamente gramíneas forrageiras monocotiledóneas. No entanto, dependem muito da variação sazonal na disponibilidade de forragem. Já os bovinos alimentam-se principalmente de gramíneas de qualidade nutricional inferior, ricas em fibra (PEREZ et al., 2014).

Ainda que caprinos, ovinos e bovinos apresentem certas características em comum, em relação ao hábito de pastejo, isto não significa que ocorra uma competição pelo mesmo nicho alimentar. Afinal, diferenças anatômicas modificam a forma de apreensão do alimento. Caprinos, por exemplo, utilizam os dentes incisivos inferiores e língua para selecionar as folhas de melhor qualidade nutricional, enquanto os bovinos utilizam, predominantemente, a língua para apreender o alimento, sem que ocorra uma seleção mais rigorosa do alimento. Portanto, há uma diversidade botânica da pastagem consumida pelas diferentes espécies.

Através da avaliação comparada do pastejo alternado entre ovinos e caprinos, Pereira Filho et al. (2007) concluíram que o pastejo realizado por ovinos reduziu a disponibilidade de matéria seca de gramíneas, enquanto o pastejo realizado por caprinos diminuiu a disponibilidade das dicotiledóneas herbáceas, conferindo assim hábitos de pastejo diferentes e evidenciando que as duas espécies não competem diretamente pelo mesmo nicho alimentar. Destaca-se a preferência dos ovinos pelas gramíneas, uma vez

que em áreas nativas e sob lotação contínua e duradoura, os ovinos reduzem a presença das gramíneas entre as espécies herbáceas (PAPACHRISTOU et al., 2005; PEREIRA FILHO et al., 2013).

O hábito de pastejo dos ruminantes não é só influenciado pela forma de apreensão do alimento, mas também pelas diferenças anátomo-fisiológicas do sistema digestivo de cada espécie. Como mencionado anteriormente, os ruminantes podem ser divididos de acordo com a preferência do alimento (concentrado ou volumoso) e, para que cada espécie consiga retirar energia destas diferentes fontes de alimentos, é necessário que o sistema digestivo esteja adaptado para tal função.

O trato gastrointestinal dos ruminantes é um sistema complexo e dinâmico, onde se inicia na boca e termina no reto e ânus. Cada espécie possui particularidades anátomo-fisiológicas, por exemplo, ovinos e caprinos apresentam uma maior retenção do alimento no intestino grosso, onde a retirada de água é mais acentuada em relação as espécie bovina. Essa característica pode estar associada a um menor consumo de água pelos caprinos e ovinos em relação aos bovinos (AGANGA, 1992; ALVES et al., 2007), decorrente de uma melhor capacidade na utilização da água, provavelmente pelas menores perdas de água nas fezes e urina. Caprinos e ovinos contêm menor teor de água nas fezes, entre 60 a 65%, quando comparadas com as fezes de bovinos, que apresentam 70 a 75% (ARAÚJO et al., 2010).

Diferenças anatômicas no rúmen entre as espécies de ruminantes podem determinar o sucesso ou não no aproveitamento dos diferentes tipos de carboidratos presentes nas dietas. Em espécies comedoras de gramas, como bovinos, existem pilares mais espessos entre o rúmen e o retículo em comparação aos seletores de concentrado (DYCE et al., 2004; MACHADO et al., 2015). Os pilares ruminais têm fundamental importância para as espécies comedoras de grama, uma vez que são responsáveis pela ruminação e mistura do conteúdo ruminal, que por, influencia dos pilares, estratifica a dieta baseada em forragem, formando uma camada com grande quantidade de fibra (NRC, 2007).

Essas adaptações em espécies comedoras de gramas favorecem um maior ataque dos microrganismos ruminais ao substrato. Quando se trata de um alimento de menor qualidade, este efeito é mais evidente, uma vez que as espécies mais adaptadas ao consumo de forragem conseguem aproveitar com mais eficiência este tipo de dieta.

Gomes et al. (2013) determinaram o desaparecimento da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) do bagaço de cana-de-açúcar em caprinos e ovinos e observaram que a espécie ovina apresentou um maior tempo de colonização, maior taxa de degradação e degradabilidade efetiva da MS e FDN.

Os ruminantes com uma alta proporção de carboidratos fibrosos compondo sua dieta basal, como por exemplo, bovinos e ovinos, apresentam maiores proporções do omaso em comparação as espécies seletoras de concentrado, que, ao contrário, apresentam omaso menor em relação ao retículo, sendo esta uma característica própria em espécies seletoras de concentrado (CLAUSS et al., 2006).

O abomaso é o último dos quatro compartimentos e considerado o esmago verdadeiro, glandular, ou seja, apresenta um epitélio de revestimento com mucosa repleta de glândulas secretoras de enzimas, como a pepsinogênio (inativo) e pepsina (ativo), hormônios como a gastrina, ácido clorídrico (HCl) e água. O abomaso de espécies seletoras de concentrado e espécies intermediárias é relativamente maior em comparação ao abomaso de espécies comedoras de gramíneas. Esta mudança é fundamental para que espécies seletoras possam desdobrar as proteínas em péptidos mais simples (oligopeptídeos e aminoácidos), uma vez que espécies seletoras consomem alimentos com maiores percentuais de proteína em comparação aos comedores de grama.

O abomaso é formado pelas regiões fúndica, pilórica e corpo. Sua mucosa é rugosa com proporção predominantemente glandular. O abomaso tem uma túnica muscular mais fraca, mas, independentemente do peso corporal, as espécies seletoras de concentrado possuem uma membrana mucosa que dobra a espessura em comparação aos comedores de grama (AXMACHER e HOFMANN, 1988).

Além disso, há uma segunda razão importante para explicar a produção de HCl muito mais elevada na mucosa abomasal mais espessa de ruminantes seletivos: o sistema tanino-proteína complexado não digerível. O tanino tem a capacidade de se ligar a proteínas e a fibra, tornando essas frações resistentes à digestão. Os taninos também podem fazer complexos com enzimas digestivas tornando-se inibidores de enzimas devido à sua complexação com proteínas enzimáticas, tais fatos acarretam em redução na fermentação ruminal (VITTI et al., 2005; SALLAM et al., 2010). Nessas

espécies seletoras, componentes não digeríveis são dissolvidos no ambiente ácido do abomaso (HOFMANN, 1989).

Ruminantes seletores intermediários como os caprinos têm preferência por dicotiledôneas herbáceas, que representam, cerca de, 53% da dieta (PEREIRA FILHO et al., 2007; SANTOS et al., 2008). Essas plantas, assim como, a maioria das leguminosas forrageiras tropicais, apresentam significativos teores de taninos totais em sua composição (ARAÚJO FILHO e CARVALHO, 1998). Concentrações elevadas de taninos diminuem a digestibilidade de carboidratos fibrosos, uma vez que os taninos se complexam com a parede celular da planta, impossibilitando o acesso das enzimas bacterianas e prejudicando o processo digestivo, especialmente dos animais consumidores de grama (PEREIRA FILHO et al., 2005). As espécies seletoras intermediárias, que consomem uma considerável quantidade de plantas taníferas, apresentam adaptações como a secreção de substâncias com alta afinidade por taninos, como proteínas ricas em prolina (PRP), que inibem a ação desses compostos fenólicos (GUIMARÃES-BEELEN et al., 2006).

Além dessas adaptações, ruminantes que consomem plantas com alto teor de tanino apresentam microrganismos ruminais que degradam estas substâncias como a *Klebsiella variicola*, *K. pneumonia* (SHARMA et al., 2017), *Streptococcus bovis* (MOSLEH et al., 2014) e *Streptococcus gallolyticus* (KUMAR et al., 2014). A presença de espécies com capacidade de degradar taninos pode ocasionar um aumento na degradação da forragem, Kumar et al. (2014) encontraram um aumento de 11% na melhoria da degradação real *in vitro* de alimentos ricos em taninos na presença de cultura viva de *Streptococcus gallolyticus*, o que pode ser explorado como um probiótico para ruminantes, visando uma melhoria na utilização de nutrientes oriundos de forragens contendo altos teores de taninos.

Os intestinos delgado e grosso são proporcionalmente maiores em espécies comedoras de gramas, pois este tipo de alimento possui menor qualidade nutricional, e uma maior quantidade de fibra, precisando de mais tempo dentro do trato gastrointestinal para uma maior absorção dos nutrientes devido a difícil digestão destes componentes, ocasionando uma menor oferta de nutrientes para o animal. Portanto, intestinos mais longos aumentam a eficiência na absorção de nutrientes.

Portanto, as diferenças anatomo-fisiológicas do sistema digestivo de ruminantes, comedores de grama, são voltadas para a máxima eficiência no aproveitamento da fibra presente nas forrageiras consumidas por estes animais. Estas diferenças como, por exemplo, rúmen mais robusto e com maior motilidade, maior tempo de retenção da fibra nos compartimentos para a degradação microbiana visando uma melhor fermentação dos carboidratos fibrosos e trato intestinal mais longo, são algumas diferenças que melhora o aproveitamento e digestibilidade da fibra.

Seletores intermediários, como caprinos, apresentam a capacidade de aproveitamento da fibra melhor em relação a qualquer não ruminante. Entretanto são conhecidos como menos eficientes que os comedores de grama para aproveitamento de dietas com elevados valores de fibra, uma vez que apresentam um menor tempo de retenção da digesta para fermentação ruminal, por apresentar rúmen e omaso relativamente menores em relação ao tamanho corporal. Em contrapartida, necessitam consumir partes de plantas com menos fibras e de melhor qualidade; despendem mais tempo para ingestão e selecionam partículas de menor tamanho em relação aos ovinos (HADJIGEORGIOU et al., 2003). Seletores intermediários, como os caprinos, também apresentam abomaso e intestinos relativamente maiores em relação ao rúmen, aprimorando a digestão carboidratos não fibrosos e componentes facilmente digestíveis da parede celular, como a pectina. Nas condições específicas para as quais estão adaptados, os selecionadores exibem maior digestibilidade do que espécies menos seletivas (VAN SOEST, 1994).

DEGRADAÇÃO RUMINAL DE CARBOIDRATOS FIBROSOS

Os carboidratos, de forma geral, são estruturas unidas por ligações glicosídicas, alfa ou beta. Podemos classificar os carboidratos em fibrosos (celulose, hemicelulose) e não fibrosos (amido e açúcares) (CAÑIZARES et al., 2009). O tipo de ligação está relacionado com o monômero correspondente à origem do carboidrato. Carboidratos fibrosos, como a celulose, têm ligações glicosídicas β 1-4 e, portanto não são prontamente digestíveis, já que tais ligações dificultam o ataque dos microrganismos degradadores de fibra (CARVALHO e PIRES, 2008). Por outro lado, o amido é um carboidrato não fibroso, formado por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, e

possuem ligações glicosídicas tipo α 1-4 e tipo α 1-6, essas ligações ocorrem entre um grupo hidroxila de um carboidrato com o grupo hidroxila de outro ou de um álcool. Facilitando a degradação pelos microrganismos ruminais (KOZLOSKI, 2011; HALL, 2014).

Os carboidratos totais constituem cerca de 70 a 80% da dieta, uma vez que a base nutricional para ruminantes é composta por forragens, as quais são formadas principalmente por carboidratos fibrosos e uma pequena proporção de carboidratos não fibrosos (BERCHIELLI et al., 2012). São fundamentais para nutrição de ruminantes porque originam os ácidos graxos voláteis (AGVs) no rúmen (VARGA et al., 1998). Através do processo fermentativo pelos microrganismos, sendo a principal fonte de energia para ruminantes, atendendo até 80% de suas exigências diárias (BERGMAN, 1990; OWENS e GOETSCH, 1993).

Segundo Goularte et al. (2011), as proporções molares de acetato:propionato:butirato são variáveis, sendo encontrados relações de 75:15:10, em dietas ricas em carboidratos fibrosos; até 45:40:15 em dietas ricas em carboidratos não fibrosos, com o total de AGVs entre 60 e 150 mM/mL de líquido ruminal. Com a manipulação da fermentação ruminal, por meio de modificação da dieta fornecida aos animais, torna-se importante conhecer os valores médios de AGV para animais de uma determinada espécie uma vez que tais modificações alteram as relações ecológicas complexas na microbiota do rumen (ZAMBOM et al., 2007; WEIMER, 2011).

Portanto, é muito importante conhecer as populações microbianas e suas ações sobre a degradação de carboidratos fibrosos, pois estes compreendem a fonte mais econômica e eficiente na alimentação de ruminantes criados nos trópicos. Entre os principais carboidratos que compõem a parede celular, podemos destacar a celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Este último, apesar de fazer parte da parede celular, não é um carboidrato e sim um composto fenólico (VAN SOEST, 1994). Os carboidratos podem representar cerca de 90% do peso seco da parede celular da planta. A celulose compõe de 20 a 40% da parede celular, hemiceluloses de 15 a 25% e pectinas com aproximadamente 30%, formando uma camada altamente organizada e dinâmica, que pode ser mais resistente ou mais maleável conforme a maturidade da planta.

A hemicelulose é constituída principalmente por xiloglucanas (PAIVA et al., 2009), que se unem à celulose, lignina e pectina por meio de pontes de hidrogênio,

formando ligações cruzadas que dão estabilidade à parede celular (WAKABAYASHI, 2000).

A lignina não é um carboidrato e sim um polímero fenólico formado a partir de ligações éter ou bifenil, que bloqueiam a ativação hidrolítica e são geralmente resistentes à ação enzimática biológica, realizadas por microrganismos. Entretanto, alguns microrganismos anaeróbicos são capazes de degradar parte dos compostos fenólicos, principalmente as substâncias fenólicas simples, enquanto as substâncias fenólicas condensadas são mais resistentes ao ataque de microrganismos anaeróbicos, assim, compostos fenólicos condensados são mais limitantes ao potencial máximo de degradação da parede celular vegetal (VAN SOEST, 1994).

A pectina está localizada principalmente na lamela média da parede celular da planta. A parede celular é dividida em três camadas principais: a lamela média, a parede celular primária e a parede celular secundária (MÜLLER e PRADO, 2005). A pectina, apesar de ser encontrada na parede celular de plantas, não apresenta comportamento igual aos carboidratos fibrosos em relação à digestibilidade. Este carboidrato é altamente degradável no rúmen; entretanto, apresenta uma tendência a manter o pH ruminal mais elevado em relação aos alimentos energéticos tradicionais, que são ricos em amido (VALENÇA et al., 2016).

Entre os microrganismos que degradam carboidratos fibrosos podemos destacar as bactérias celulolíticas, hemicelulolíticas, degradadoras de pectina e xilanas. Como exemplo de bactérias celulolíticas, podemos destacar: *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacterioides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolveins*, *Clostridium lochheadii*, *Cillobacterium cellulosolvens*, *Clostridium longisporum*; *Fibrobacter succinogenes* e entre as bactérias hemicelulolíticas: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Bacterioides ruminicola*, *Eubacterium xylanophilum*, *E. uniformis*, *Bacteroides ruminicola* (OLIVEIRA et al., 2007). Em relação às bactérias que degradam pectina podemos destacar: *Bacteroides ruminicola*, *Lachnospira múltiparas*, *Peptostreptococcus sp.*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* (GRADEL e DEHORITY, 1972), *Prevotella ruminicola* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (DEHORITY, 1973; DUŠKOVÁ e MAROUNEK, 2001).

Pode-se notar que as bactérias que degradam pectina são as mesmas com capacidade de degradar celulose e hemicelulose, com exceção da *Lachnospira*

multíparas, que parece ter apenas afinidade para degradação de pectina. Tal fato pode ser explicado pela posição da celulose na parede celular, já que a celulose está embutida numa matriz complexa de hemicelulose e pectina (FLINT et al., 2008). Dessa forma, a pectina só pode ser degradada após os microrganismos atuarem sobre a celulose e a hemicelulose. As bactérias celulolíticas possuem a capacidade de degradar os polissacáridos de matriz, tais como xilanos, mananos e pectinas, para acederem às fibrilas de celulose, embora não necessariamente utilizem os produtos solubilizados, os quais se tornam disponíveis a outros membros da comunidade através da alimentação cruzada (OSBORNE e DEHORITY, 1989). A *Succinivibrio dextrinosolvens* também tem a capacidade para degradação da pectina. Porém, apresenta características semelhantes aquelas que fermentam carboidratos não-estruturais.

As novas tecnologias para identificação de novas espécies ruminais têm auxiliado, cada vez mais, a descoberta de microrganismos importantes na degradação da fibra. Vários estudos moleculares têm possibilitado a identificação e a purificação de enzimas degradadoras de celulose e outros carboidratos, ampliando o potencial de aplicação pela indústria (LIU et al., 2011; HESS et al., 2011; GONG et al., 2012).

O emprego das técnicas de sequenciamento de última geração dentro da abordagem metagenômica tem gerado muitas informações relevantes sobre a complexa diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas do rúmen (SIMON e DANIEL, 2011).

A diversidade de espécies bacterianas no rúmen é estimada em aproximadamente 7.000. De acordo com um estudo sobre metataxonômica (CHAUCHEYRAS-DURAND e OSSA, 2014), foram identificadas 5.271 unidades taxonômicas operacionais (OTU's) dentro de 19 filos, dos quais os mais frequentes foram *Firmicutes* (56%), *Bacteroidetes* (31%) e *Proteobacteria* (4%). Mais de 90% das sequências *Firmicutes* foram relacionadas a gêneros da classe *Clostridia*, sendo as famílias mais comuns *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Veillonellaceae*. Os gêneros predominantes incluíram *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus*, *Succinivibrio*, *Pseudobutyrovibrio* e *Mogibacterium*. Dentro da classe *Bacilli*, *Streptococci* foram os dominantes. No filo *Bacteroidetes*, a maioria das sequências foi atribuída à classe *Bacteroidia*, representada principalmente pelo gênero *Prevotella* (*Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis*, *Prevotella bryantii* e *Prevotella albensis*).

A produção de ruminantes enfrenta cada dia mais desafios, seja na busca por alimentos mais eficientes e que não sejam considerados alimentos nobres para alimentação humana, seja na busca por novas tecnologias para mitigar os efeitos dos gases que promovem o efeito estufa, como por exemplo, o metano entérico. Todos esses fatores podem ser manipulados e melhorados com um conhecimento mais amplo da complexa e diversificada população microbiana existente no rúmen. Os avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA e bioinformática estão trazendo uma maior compreensão dos ecossistemas microbianos, permitindo o estudo da diversidade microbiana nas diferentes condições nutricionais e de produção. Compreender a função do microbiota e sua interação com o animal hospedeiro servirá de base para melhores modelos simbióticos e estratégias que promovam menos perdas de energia entérica (FIRKINS, 2010; MORGAVI et al., 2013).

Salienta-se que a importância dos métodos moleculares fundamenta-se no fato de que a maioria dos microrganismos ruminais não podem ser cultivados de acordo com os métodos microbiológicos convencionais. Por exemplo, Stiverson et al. (2011) verificaram grande abundância de cinco OTU's de microrganismos não cultiváveis em rúmen de carneiros alimentados com 100% de feno, comparativamente a uma dieta contendo 70% de feno e 30% de milho (*Zea mays*). As cinco OTU's não cultiváveis foram classificadas como pertencentes aos gêneros *Acetivibrio*, *Allobaculum* da família *Ruminococcaceae* (ordem *Clostridiales*). O fato desses microrganismos apresentarem abundância comparável à das espécies conhecidamente celulolíticas pode indicar se tratarem de um grupo importante na digestão ruminal das fibras.

Populações de várias bactérias não cultiváveis, como Ad-H1-14-1 (classificada para o gênero *Acetivibrio*) foram significativamente mais elevadas nas frações aderentes do que nas frações líquidas, indicando que podem estar associadas à degradação da fibra (KIM e YU, 2012).

Segundo Shaw et al. (2016), as bactérias fibrolíticas cultiváveis mais comuns representam uma parte muito pequena do total das bactérias presentes no rúmen, como por exemplo *F. succinogenes* e *R. flavefaciens* (0,5 a 1%) e *B. fibrisolvens* e *R. albus* (cerca de 0,03%). Estes mesmos autores também identificaram bactérias não cultiváveis pertencentes às famílias *Clostridiaceae* e *Lachnospiraceae* com abundância comparável ao das principais espécies fibrolíticas. Entre as bactérias não cultivadas pode-se destacar

a Ad-H1-14-1, que pertence ao gênero *Acetivibrio*, que possui espécies celulolíticas apenas, como *A. cellulolyticus* e *A. cellulosolvens* (MURRAY, 1986; JINDOU et al., 2006). A Ad-H1-14-1 pode representar uma bactéria *Acetivibrio* que participa na degradação da fibra no rúmen e que encontra-se em maior número quando se tem uma dieta rica em fibras, revelando que algumas bactérias não cultiváveis podem ser tão importante como aquelas já conhecidas.

Após a degradação e fermentação de carboidratos da parede celular (celulose, hemicelulose e pectina) formam-se pentoses (monossacarídeos que têm 5 átomos de carbono na molécula) como por exemplo xilose e arabinose, e também hexoses (monossacarídeos que têm 6 átomos de carbono na molécula), tais como glicose e ácidos urônicos.

A celulose é um carboidrato constituído por unidades de glicose. Apresenta ligação glicosídica β (1- 4) que concede à molécula uma estrutura espacial linear, o que possibilita a formação de fibras insolúveis em água. A hidrólise total da celulose, por enzimas celulasas produzidas pelos microrganismos ruminais, resulta na formação de glicose. A hemicelulose é representada, em cerca de 70% de sua estrutura, por cadeias de arabinoxilanas e em menor quantidade por xiloglicanas e glicomananas. Devido a esta heterogeneidade, são necessários diferentes enzimas para hidrolisar as hemiceluloses. As xilanases são capazes de hidrolisar ligações β -1,4 e produzir oligômeros menores, os quais poderão ser hidrolizados à xilose pelas β -xylosidases (DASHTBAN et al., 2009). As cadeias de hemicelulose também são formadas por monômeros de arabinose, onde a hidrólise da hemicelulose também resulta em moléculas de arabinose (OGEDA e PETRI, 2010). A pectina, como é formada por ácido galacturônico, resulta na formação de moléculas de galactose (hexose) e ácido urônico, que é um ácido carboxílico derivado por oxidação de uma aldose. Esta, que esta por sua vez, é um monossacarídeo que contém apenas um aldeído por molécula (Figura 1).

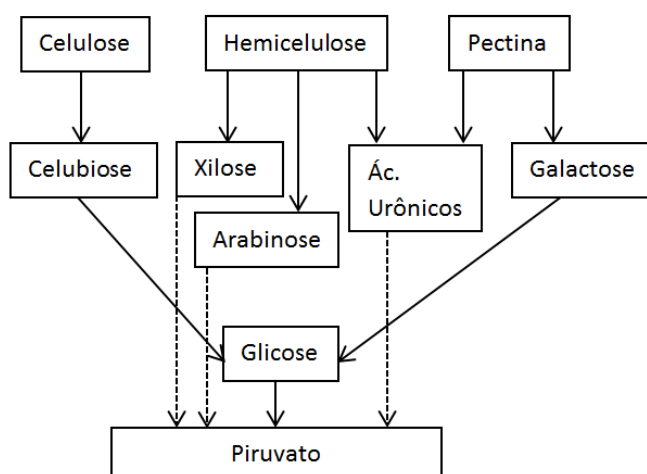


Figura 1. Esquema da degradação de carboidratos estruturais pelas bactérias ruminais (Adaptado de Van Soest, 1994).

De forma ampla, todos os polissacarídeos são degradados até unidades menores, como a glicose (monossacarídeos), que são absorvidas pela célula bacteriana e são metabolizados a piruvato. Alguns compostos como pentoses e aldoses podem ser transportadas para o interior da célula e convertido a piruvato e este, por fim, é convertido em AGV.

A rota glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) é a principal via de metabolização das hexoses em piruvato, onde a conversão de um *mol* de hexoses resulta em dois *mols* de piruvato, resultando no gasto de dois ATPs, pois ocorre as fosforilações nas duas extremidades da hexose, e na formação de 4 ATP, com saldo líquido de 2 ATP e 2 NADH₂. No decorrer da via glicolítica, a glicose é fosforilada, isomerizada a frutose, novamente fosforilada e clivada, originando duas trioses-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato), que são então, desidrogenadas e desfosforiladas até formar piruvato (Figura 2).

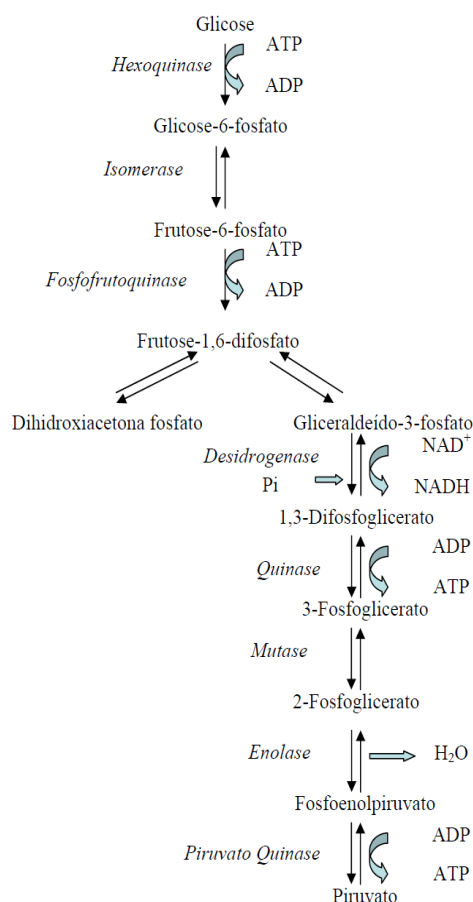


Figura 2. Rota Glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

Segundo Kozloski (2011), as pentoses também são fosforiladas no interior da célula bacteriana, formando pentose-fosfato, onde a menor parte, cerca de 25% são clivadas por uma fosfocetolase, produzindo acetil-P e com gasto de ATP, ocorre a formação de acetato. Entretanto 75% das pentoses é convertida para frutose-6-fosfato pelo ciclo das pentoses, rendendo 1,67 ATP e a formação de piruvato.

A produção dos diferentes tipos de AGV depende do tipo de carboidrato fermentado e das espécies microbianas ruminais envolvidas no processo. Carboidratos como celobiose e xilose produzem uma maior quantidade de acetato em comparação ao propionato. A glicose, um monômero de menor tamanho e produto final da degradação extracelular, também favorece uma maior proporção de acetato. Por outro lado, a maltose, produto da hidrólise do amido, fornece maiores quantidades de propionato. Um maior fornecimento e degradação de carboidratos fibrosos, em comparação aos carboidratos não fibrosos, proporciona aumento do pH ruminal por vários motivos

como, por exemplo, a maior produção de saliva que chega ao rúmen, oriunda do processo de mastigação, causando um efeito tamponante e favorecendo espécies de microrganismos que degradam celulose e outros carboidratos fibrosos, cuja a produção final é acetato (Figura 3).

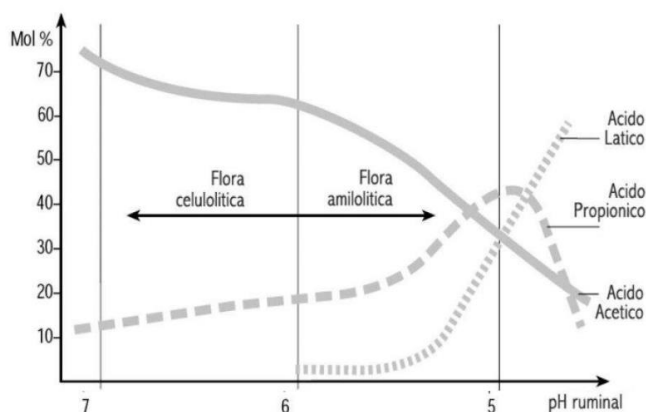


Figura 3. Proporções dos AGVs em relação a atividade microbiana e pH (Adptado de Church, 1993).

A proporção dos produtos finais da fermentação, ou seja AGVs, também está diretamente relacionado ao pH ruminal. Carboidratos de reserva ou não fibrosos, como o amido, tem uma maior e mais rápida taxa de degradação em comparação aos carboidratos fibrosos e tais condições favorecem uma diminuição do pH, aumentando ainda mais a ação de bactérias amilolíticas e diminuindo a ação das bactérias celulolíticas, de tal forma que aumenta a produção de propionato.

UTILIZAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO POR MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE CARBOIDRATOS FIBROSOS

As proteínas podem ser classificadas como proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). A PDR sofre ação enzimática dos microrganismos ruminais que utilizam os peptídeos, aminoácidos e amônia para síntese celular microbiana (SANTOS e MENDONÇA, 2011). Essas proteínas podem ser provenientes de fontes como o farelo de soja, farelo de algodão, caroço de algodão e a uréia, este último como fonte de nitrogênio não proteico. Também podemos destacar

outros alimentos alternativos como o farelo de amendoim, farelo de girassol, farelo de glúten de milho também são alternativas de suplementação (Tabela 1) (GUIMARÃES et al., 2015).

Tabela 1. Teor de PDR e PNDR em relação ao teor de proteína bruta dos principais alimentos proteicos utilizados na alimentação de ruminantes.

Alimentos	PDR (%)	PNDR (%)
Farelo de Algodão	55,39	43,0
Glúten de Milho	36,0	60,13
Farelo de Soja	64,98	35,77
Uréia	283,17	-

Fonte: Valadares Filho et al. (2010)

Para determinação das frações PDR e PNDR, o modelo Cornell (CNCPS) divide as proteínas em frações para melhor caracterizá-las. Podemos fracionar a proteína dos alimentos nas seguintes divisões: A (fração solúvel, NNP), B1 (fração solúvel rapidamente degradada no rúmen), B2 (fração insolúvel, com taxa de degradação intermediária no rúmen), B3 (fração insolúvel lentamente degradada no rúmen) e fração C, que é indigestível durante sua permanência no trato gastrointestinal (PEREIRA et al., 2010). Portanto, apenas as frações B1, B2, e B3 contribuem para fornecimento de aminoácidos e peptídeos, tanto para as bactérias quanto para o ruminante hospedeiro.

Para os microrganismos degradadores de fibras, o fornecimento de compostos nitrogenados é de fundamental importância para crescimento celular bacteriano. A amônia é a principal fonte de nitrogênio para os microrganismos e a fração A da proteína é constituída por 100% NNP e que possui taxa de degradação ruminal maior que 300%/h, onde é 100% degradada no rúmen e transformada em amônia ruminal. As frações B1, B2 e B3 possuem taxas de degradação ruminal diferentes, aproximadamente de 100 a 350%/hora, 8 a 15%/hora e 0,08 a 1,3%/h, respectivamente.

Os requerimentos nutricionais de microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos são, principalmente, amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada (isovalerato, isobutirato), que são de fundamental importância para degradação de carboidratos, uma vez que esses nutrientes são utilizados pelos microrganismos que degradam

celulose e hemicelulose da parede celular dos vegetais para síntese de proteínas microbianas (DEHORITY, 2003; OLIVEIRA; et al., 2007).

Sendo assim, a amônia é de fundamental importância para o crescimento de microrganismos que degradam os carboidratos estruturais, que é o principal componente das forragens. A suplementação dos ruminantes, consumindo alimentos ricos em fibra com fontes de nitrogênio, acelera o crescimento microbiano no rúmen, principalmente das bactérias fibrolíticas e, conseqüentemente, favorece a degradação da fibra (FIGUEIRAS et al., 2010), melhorando a digestibilidade da forragem e disponibilizando aos ruminantes maior aporte de energia.

As principais fontes de compostos nitrogenados para os microrganismos ruminais são as proteínas contidas nos alimentos e o nitrogênio não-proteico, na forma de uréia, presente na saliva do ruminante ou fornecida na dieta.

A degradação das proteínas no rúmen ocorre por enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos. As proteínas são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos pelas enzimas proteases e peptidases, respectivamente. Os aminoácidos liberados pela hidrólise das proteínas são incorporados na célula dos microrganismos para crescimento microbiano ou são desaminados para produção de AGVs com produção de amônia (Figura 4).

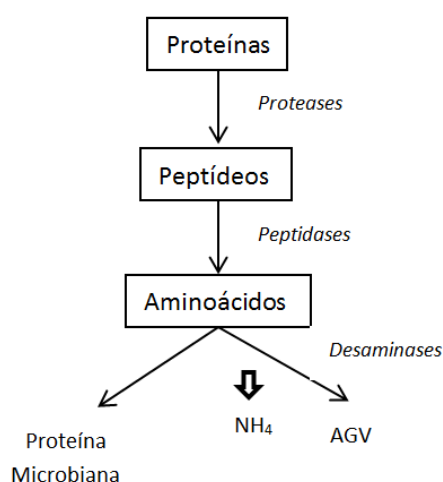


Figura 4. Degradação proteica pelos microrganismos ruminais (Adaptado de Kozloski, 2011).

As concentrações de amônia no rúmen dependem do tipo da proteína fornecida na dieta. Alimentos com altas porcentagens de PDR tendem a proporcionar maiores concentrações de amônia. Entretanto, os níveis de amônia podem sofrer uma rápida elevação com adição da uréia na dieta. A concentração da amônia ruminal é importante para melhorar as taxas de degradação de alimentos mais fibrosos.

Existem na literatura vários trabalhos realizados para identificar a concentração da amônia ruminal que é necessário para otimização da fermentação dos carboidratos fibrosos. Entretanto, a concentração ideal ainda é controversa e necessita de mais estudos, sobretudo em pequenos ruminantes. Satter e Slyter (1974) recomendam concentrações mínimas de 4 a 5 mg/dL de amônia ruminal para que não ocorra nenhuma deficiência na degradação da fibra. Mehrez et al. (1977) preconizam a concentração de 23 mg/dL para atingir o potencial máximo para síntese de proteína microbiana.

Van Soest (1994) recomenda valores ligeiramente superiores aos autores anteriormente citados, onde preconiza valores por volta de 10 mg/dL para o adequado crescimento microbiano sobre carboidratos e para degradação da FDN. Entretanto, Leng (1990) preconiza concentrações entre 10 a 20 mg /dL de amônia ruminal para que se maximize a degradação ruminal e o consumo de MS, respectivamente.

Segundo Sampaio et al. (2009), o teor mínimo de proteína bruta na matéria seca, para que os microrganismos do rúmen tenham capacidade mínimas para degradação da fibra, é de 7%, que corresponde a uma concentração mínima de 6,24 mg/dl de amônia ruminal. Valores inferiores ao proposto promovem mudanças no perfil da degradação da fibra, aumentando a fração não degradável, ocasionado pela deficiência nos sistemas enzimáticos microbianos, responsáveis pela degradação da fibra (DETMANN et al., 2011).

Detmann et al. (2009), com objetivo de definir dos parâmetros necessários para degradação ruminal da FDN de baixa qualidade e relação aos diferentes níveis de suplementação com compostos nitrogenados, indicam 15 e 8 mg/dL como sendo valores ótimos de amônia ruminal para consumo e degradação da FDN, respectivamente., Os autores atribuem esses resultados à uma melhor adequação da relação proteína

metabolizável/energia metabolizável no ambiente ruminal, o que aumenta a ingestão, mesmo após a degradação ruminal da FDN ter sido otimizada.

Pires et al. (2016) constataram uma melhora de 20% na taxa de degradação da FDN para o nível de amônia de 15mg/dl de líquido ruminal, em relação ao tratamento sem amônia no meio ruminal. Segundo Detmann et al. (2011), a melhora na taxa de degradação da FDN está atrelada à suplementação com compostos nitrogenados, uma vez que os microrganismos presentes no ambiente ruminal são capazes de fazer uso desses compostos para sintetizar enzimas fibrolíticas.

A amônia livre é tóxica para a maioria das espécies de mamíferos. Entretanto, os ruminantes possuem adaptações fisiológicas que permitem o aproveitamento da amônia através dos microrganismos ruminais. A absorção da amônia pelos microrganismos ruminais é influenciada pela concentração da amônia no rúmen, estimulando a utilização através das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase (GS-GOGAT) ou glutamato desidrogenase (GDH) (ERFLE et al., 1977; SANTOS e MENDONÇA, 2011).

Os sistemas enzimáticos possuem diferentes K_m para a amônia, sendo: K_m (GS-GOGAT) de 0,28mg de N-NH₃/dl e K_m (GDH) de 7mg de N-NH₃/dl (LIMA, 2010). Quando a concentração de amônia ruminal é alta, predomina a ação da GDH. Essa enzima não requer ATP para a fixação de amônia. Quando as concentrações de amônia ruminal são baixas, ocorre a predominância do sistema enzimático GS-GOGAT. A amônia é fixada em um grupo amida da glutamina pela enzima glutamina sintetase, utilizando o glutamato e com gasto de ATP. Após esta etapa, a glutamina transfere o grupo amida para o α -cetoglutarato pela enzima glutamato sintase, formando glutamato. A conversão da amônia em glutamato é de fundamental importância para as bactérias ruminais que utilizam amônia, uma vez que o glutamato participa como doador do seu grupo amina, no alfa-cetoglutarato, gerando glutamina, em reações de transaminação, para a síntese dos demais aminoácidos bacterianos.

Visto que o rúmen produz uma baixa quantidade de ATP, as vias de assimilação dos nutrientes podem exercer grande efeito sobre a eficiência microbiana (CABRAL et al., 2008). E como o ambiente ruminal produz pouco ATP, ocorre uma deficiência no crescimento microbiano gerando efeitos deletérios em relação a degradação da fibra,

uma vez que parte da energia que seria destinada para crescimento é utilizada no processo de fixação de amônia (SANTOS e MENDONÇA, 2011).

É importante salientar que os valores de concentrações de amônia ruminal para otimização da degradação da fibra, anteriormente citados, foram estabelecidos para bovinos. Em pequenos ruminantes, o comportamento da degradação da fibra é diferente em relação aos bovinos. Por isso, o estudo das diferentes concentrações de amônia ruminal em pequenos ruminantes é importante. Alguns trabalhos demonstram que a população microbiana do rúmen é influenciada pelo ambiente, pela dieta e pela espécie hospedeira (SHI et al., 2008). Portanto, estudos que utilizam microrganismos ruminais de bovinos podem não ser diretamente aplicáveis a pequenos ruminantes.

Os caprinos, por exemplo, não devem ser considerados modelos experimentais em estudos de degradação da MS e da FDN para os bovinos (CAMPOS et al., 2006), pois apresentam uma fisiologia ruminal e tratogastrointestinal diferenciados.

O fornecimento de fontes de energia na dieta para ruminantes parece ser importante pois, não havendo disponibilidade adequada de carboidratos não fibrosos no momento da liberação da amônia no rúmen, ela não será aproveitada pelos microrganismos ruminais, sendo absorvida pelo rúmen e transportada para corrente sanguínea. Posteriormente, é eliminada pela urina como uréia ou segue ciclo da uréia. A sincronização entre as fontes de carboidratos não fibrosos e a amônia ruminal pode acarretar maximização da eficiência microbiana e diminuição da perda de N em forma de amônia e da energia dos carboidratos, promovendo melhoria na digestão da fração fibrosa (COSTA et al., 2015).

Entretanto, Souza et al. (2010) não encontraram melhorias na degradação da FDN através da suplementação com amido. Segundo esses autores, a suplementação com nitrogênio aumentou a taxa de degradação ponderada prevista de FDN em 14,8 %, enquanto que a suplementação com amido causou diminuição de 32,5 %. Outro aspecto importante para ressaltar é que a suplementação com amido na ausência de suplementação nitrogenada ocasionou um aumento da fração de lenta degradação, ao contrário do que foi observado quando se tem uma suplementação exclusivamente proteica.

Segundo Tedeschi et al. (2000), se a energia fermentável é o primeiro nutriente limitante, a produção de proteína microbiana é ditada pela energia, e não pelo N

disponível no rúmen. Sendo assim, não haveria necessidade de reduzir o rendimento microbiano. No entanto, se N for limitante, o rendimento microbiano é reduzido pela diferença entre a energia permissível e o crescimento bacteriano permitido pela proteína.

Além da amônia ruminal e energia, as populações microbianas responsáveis pela degradação da fibra precisam de aminoácidos, uma vez que estes nutrientes são fornecedores do esqueleto carbônico, formados pela degradação do mesmo e, juntamente com amônia gerada pela hidrólise da uréia, são utilizados para a síntese de proteína microbiana (RIBEIRO et al., 2014). Por isso, dietas com adequadas proporções de proteína verdadeira e nitrogênio não proteico, são fundamentais para uma maximização da degradação do componente fibroso da dieta.

Oh et al. (2008), com objetivo de investigar os efeitos dos diferentes níveis de proteína bruta na dieta (12,2 e 15,9% de PB) em diferentes degradabilidade (23,4 e 62,1% da proteína dietética era degradada na fermentação ruminal), avaliaram as concentrações de aminoácidos livres, amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada no conteúdo ruminal e constataram que a amônia ruminal foi aumentada pelo maior nível de proteína na dieta. Assim, com o aumento da degradabilidade ruminal da proteína, elevou-se a proteólise e, conseqüentemente, os níveis de aminoácidos livres. Além disso, houve maior produção de isovalerato e outros AGVs de cadeia ramificada, que são importantes para síntese de proteína dos microrganismos que degradam fibra.

Segundo Detmann et al. (2011), os valores máximos encontrados para a FDN potencialmente degradável e eficiência microbiana foram conseguidos quando a relação foi 75% de nitrogênio não proteico e 25% de proteína verdadeira. Estes autores observaram ainda que o balanceamento do suplemento proteico otimizou a degradação da FDN de forragem de baixa qualidade para bovinos.

Quando foi avaliado o efeito da substituição do nitrogênio não proteico por proteína verdadeira sobre a degradação ruminal *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem de baixa qualidade em caprinos (SANTOS et al., 2016) a proporção de 50% de nitrogênio não proteico e 50% de proteína verdadeira elevou em 17,42% a taxa de degradação da FDN potencialmente degradável.

Possivelmente, a melhora na taxa de degradação, na elevação da fração potencialmente degradável da FDN e no aumento no crescimento microbiano em

ambientes com proporções adequadas de fontes de nitrogênio não proteico e proteína verdadeira se deve ao maior aporte no fornecimento de aminoácidos de cadeia ramificada, a exemplo dos estudos anteriormente citados, onde a suplementação da proteína verdadeira foi realizada com a caseína, rica em tais aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina, isoleucina e valina (HARAGUCHI et al., 2006). A suplementação é importante, uma vez que peptídeos e aminoácidos precisam ser deaminados para que os microrganismos ruminais produzam os aminoácidos de cadeia ramificada.

A degradação da leucina, isoleucina e valina pelas bactérias que realizam atividades desaminativa, acarreta na conversão de ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato, os quais são nutrientes importantes para os microrganismos que degradam carboidratos fibrosos (DEHORITY et al., 1967; KOZLOSKI, 2011).

Segundo Tedeschi (2001), o total de proteína que chega ao rúmen, oriunda dos alimentos consumidos e também da saliva (mucina), são atacado pelos microrganismos ruminais que realizam a deaminação destas proteínas liberando aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Em seguida, estes aminoácidos são convertidos em ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada, por meio de bactérias proteolíticas, que utilizam principalmente aminoácidos como substratos energéticos. Bactérias celulolíticas ou fibrolíticas que utilizam os ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada sintetizam novamente a leucina, isoleucina e valina intracelularmente.

CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DA FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO DE FORRAGEIRAS TROPICAIS

A obtenção de nutrientes pelos ruminantes começa em um processo fermentativo sofrido pelas forragens consumidas, onde a parede celular das plantas é quebrada e transformada em energia para o animal. Em regiões tropicais, o processo de fermentação destas partes celulares sofre modificações, uma vez que são verificadas uma elevada taxa de crescimento e produção de matéria seca, em virtude da maior eficiência na fixação de carbono (C4), conferindo altas proporções de caule e de feixes vasculares das folhas em relação às gramíneas temperadas (C3) (CABRAL et al. 2004).

Estas características das forrageiras tropicais conferem algumas particularidades, como por exemplo, maior consumo da FDN, maior fermentação de carboidratos fibroso e consequentemente, maior produção de acetato (SANTANA NETO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

O processo de fermentação (degradação) dos componentes fibrosos da dieta inicia-se com o processo de aderência bacteriana e colonização das partículas (Figura 5), estabelecendo biofilmes, que são comunidades de bactérias envoltas por substâncias, principalmente por mono ou dissacarídeos, produzidas pelas próprias bactérias na degradação enzimática extracelular de compostos mais complexos, como a celulose e hemicelulose. Dessa forma, o biofilme fornece um contínuo suprimento de nutrientes para os microrganismos pela ação concentrada das enzimas em um pequeno ponto e impede que os nutrientes fiquem dispersos no ambiente ruminal. O biofilme, além de conferir suporte nutricional, também proporciona à comunidade bacteriana proteção contra engolfamento pelos protozoários e proteção contra agentes antibacterianos, por exemplo, bacteriófagos (McALLISTER et al., 1994; MIRON, 2001; KOZLOSKI, 2011). Assim, os biofilmes fazem com que a comunidade de bactérias permaneça por mais tempo no rúmen em relação aos microrganismos não aderidos.

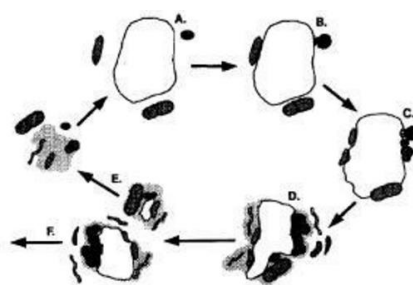


Figura 5. Representação esquemática da colonização de uma partícula de alimento pelas bactérias ruminais (McALLISTER et al., 1994).

Podemos observar, na Figura 5, que as bactérias associam-se à partícula do alimento de forma aleatória ou através de atração química. Em seguida, as bactérias aderem à partícula de alimentação pelo glicocalíce bacteriano, que tem a função de reconhecimento entre células e há adesão celular por proteínas de ligação. As bactérias

primárias, tais como *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, se multiplicam geram erosões na superfície da partícula de alimento, liberando nutrientes solúveis e atraindo colonizadores secundários. Em seguida, colonizadoras primárias e secundárias se unem para formar um biofilme mais estruturado, otimizando a digestão das partículas e concentrando os produtos da degradação no interior do biofilme. Os biofilmes são formados por populações microbianas morfolologicamente diversas. Uma única espécie microbiana seria incapaz de produzir um conjunto de enzimas necessárias para digerir os mais variados tecidos das plantas. Porções do biofilme dissociam-se das partículas de alimentação para associar e colonizar as partículas de alimentos recém-ingeridas. Outras porções permanecem ligadas às partículas de alimentação e passam do rúmen para os próximos compartimentos, onde serão fontes de aminoácidos para o animal hospedeiro (McALLISTER et al., 1994).

A aderência e, conseqüentemente, colonização bacteriana na partícula do alimento é dependente de alguns fatores como, por exemplo, a espécie bacteriana e suas diferentes taxas de crescimento, bem como, algum fator que altere o funcionamento do glicocálice. A superfície do substrato também interfere na adesão microbiana com a ausência ou não de cutícula de proteção da parede celular ou compostos secundários, como tanino. Por último, o ambiente ruminal tem forte influência sobre a adesão e o pH é um dos principais fatores neste aspecto. Farenzena et al. (2014) conduziram um experimento para avaliar a influência do pH na adesão, degradação e atividade enzimática e observaram que a atividade máxima da enzima fibrolíticas e adesão microbiana se deu em pH 6,0. Valores inferiores a 6,0 ou acima de 7,0 são prejudiciais à adesão e, conseqüentemente, a degradação da fibra.

Após a aderência, os polissacarídeos são degradados no rúmen por meio de sistemas enzimáticos chamados celossomas, os quais estão relacionados à membrana das bactérias por uma glicoproteína de domínio não catalítico, que ligam o complexo enzimático com a parede celular bacteriana (XIMENES e FÉLIX, 2008). Os celossomas também auxiliam na aderência microbiana.

O celossoma foi inicialmente mencionada para descrever o complexo enzimático liberado pela bactéria *C. thermocellum*, encontrada no rúmen. Até os dias atuais, é usado para descrever outros complexos enzimáticos com atividade de degradação de carboidratos fibrosos de outros microorganismos que possuem a mesma

estrutura, proteína estrutural e subunidades catalíticas unidas por domínios específicos (KARPOL et al., 2013).

Segundo Farenzena (2010), pouco se conhece sobre a estrutura do celulosoma de uma bactéria ruminal, mas acredita-se que o complexo enzimático assemelha-se entre as bactérias celulolíticas. Apesar da *C. thermocellum* ter sido isolada no rúmen de caprinos (CAMARGO, 2013) estas bactérias não pertencem às espécies mais importantes e ativas na degradação da fibra em ruminantes domésticos. Por outro lado, celulosomas já foram descritos a partir do *Ruminococcus albus* (OHARA et al., 2000) e *Ruminococcus flavefaciens* (JINDOU et al., 2008).

Embora os estudos moleculares para observação de genes responsáveis pela produção de enzimas associadas ao celulosoma encontram-se no início, o número de variantes de celulosoma no ambiente ruminal parece ser muito maior do que foi descrito até agora. Isso pode ser crucial para proporcionar uma diversidade na capacidade de degradação dos carboidratos fibrosos encontrados no rúmen (BAYER et al., 2008).

Assim como as proteínas, os carboidratos são classificados de acordo com sua biodisponibilidade e taxa de degradação. O CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) tem uma classificação que visa uma melhor caracterização das diferentes frações, visando um melhor entendimento e suporte para as formulações de rações, apresentado equações que estimam as taxas de fermentação e de passagens dos carboidratos pelo trato digestivo (GONÇALVES et al., 2001; PEREIRA et al., 2010).

De acordo com Sniffen et al. (1992), os carboidratos totais podem ser subdivididos na fração A, correspondente à fração solúvel, constituída de açúcares de rápida degradação no rúmen; a fração B1 é composta de amido e pectina, esta última apesar de ser constituinte da parede celular vegetal, apresenta um comportamento similar aos carboidratos de reserva ou não fibrosos; na fração B2 corresponde à porção digestível da parede celular, como a celulose, hemicelulose disponíveis de acordo com as taxas de passagem e degradação; e na fração C, que corresponde à fração não degradável da parede celular.

Como mencionado anteriormente, estas frações apresentam diferentes taxas de degradação e fermentação de 100, 75 e 20%, para as frações A, B1 e B2 dos carboidratos, respectivamente, como a fração C é a parte indigestível da parede celular,

o valor é considerado de 0%. Sabendo que os carboidratos, sejam eles fibrosos ou não, constituem a principal fonte de obtenção de energia para o crescimento microbiano, resultando em um maior aporte de aminoácidos para os ruminantes, em virtude do aumento da proteína microbiana, as proporções de suas respectivas frações, bem como as taxas de degradação e digestão entre e dentro de alimentos podem afetar o suprimento de proteína microbiana ao intestino delgado e, conseqüentemente, interferir no desempenho animal (COSTA et al., 2015).

Para demonstrar a qualidade das mais variadas fontes de carboidratos, vários estudos têm sido realizados com o intuito de corroborar o valor nutricional por meio do fracionamento dos carboidratos em diferentes tipos de alimentos, nas mais variadas situações.

Nas regiões dos trópicos e regiões semiáridas, a disponibilidade de energia para ruminantes pode ser limitada em longos períodos no decorrer do ano, restringindo o consumo, não só pelas características químicas, físicas e anatômicas das forrageiras, mas também pela diminuição da oferta de alimento (MUNIZ et al., 2011). Estes mesmo autores determinaram as frações de carboidratos de alimentos volumosos secos e úmidos de regiões tropicais e semiáridas e encontraram alto teor de fração C para o feno de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e de mororó (*Bauhinia cheilanta*). Dessa forma, foi verificada interferência na cinética de degradação ruminal dos carboidratos e, dentre as forrageiras nativas do nordeste brasileiro, o mata pasto (*Senna uniflora*) apresentou a melhor taxa de fermentação, com valor para fração A+B1 elevado, superior ao do feno de feno de juazeiro e de mororó e menor valor de fração C em relação a todos os fenos de espécies do nordeste brasileiro.

Valores elevados das frações A/B1 dos carboidratos, aumenta a disponibilidade de energia para os microrganismos fermentadores de carboidratos não fibrosos e fibrosos, uma vez que estas frações são compostas pelos carboidratos de rápida fermentação. Enquanto maiores proporções da fração B2, fração potencialmente degradável, pode maximizar o crescimento microbiano, principalmente microrganismos que utilizam carboidratos fibrosos (MUNIZ et al. 2011).

Pereira et al. (2010) observaram que a fração C, em detrimento da fração B2 dos carboidratos, apresentou valores elevados para Juazeiro e Sabiá, conferindo

indigestibilidade dos carboidratos estruturais desses alimentos, acarretando menores ingestões voluntárias.

É importante ressaltar que alimentos com elevados valores das frações A e B1 são considerados como fontes de energia de rápida utilização, estimulando o crescimento de microrganismos ruminal. Esta energia (carboidratos não fibrosos) em sincronia com o fornecimento PDR tem um efeito importante sobre os produtos finais de fermentação e é benéfica para produção animal pelo melhor aproveitamento da fração B2, uma vez que os microrganismos responsáveis pela degradação dos componentes fibrosos de lenta degradação utilizam amônia para multiplicação celular. Negrão et al. (2014) constataram que a adição de carboidratos das frações A e B1 melhora as proporções entre carboidratos, bem como os parâmetros cinéticos de degradação ruminal da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro do capim-braquiária.

Entretanto, forrageiras tropicais tendem a conferir um maior teor de partes indigestível da fibra. Essa condição favorece um aumento da repleção no rúmen, favorecendo, assim, uma maior sensibilização dos receptores de tensão (mecânicos) que aumenta o número de contrações de ruminação (LEEK, 1993) e resulta em uma taxa de passagem mais elevada e, conseqüentemente, a uma menor degradabilidade da fibra (BEZERRA et al., 2004; RIBEIRO, 2009). É importante ressaltar que a taxa de passagem (K_p) e a taxa de digestão (K_d) são responsáveis, em sincronia, pelo esvaziamento do conteúdo ruminal. Assim, é necessário estudar os efeitos combinados da digestão e da taxa de passagem para maximizar o consumo de nutrientes digestíveis (SILVA, 2013).

A taxa de passagem refere-se ao fluxo de resíduos não digeridos e indigestíveis através do trato digestivo em determinado tempo (VAN SOEST, 1994), enquanto a taxa de digestão ou degradabilidade refere-se ao material digerido em determinado tempo. A degradabilidade da FDN está diretamente relacionada com a concentração de celulose e parte da hemicelulose e inversamente relacionada com a taxa de lignificação, ou seja, quanto maiores os teores de lignina e compostos fenólicos (que impedem a atuação microbiana na digestão da parede celular), menor será a degradabilidade da FDN. Tais efeitos são mais acentuados com o aumento da idade fisiológica da planta (DESCHAMPS, 1999).

Em dietas ricas em frações da fibra potencialmente não degradáveis, seria desvantajoso para um animal com um maior volume rumino-reticular consumir uma dieta relativamente rica nessas frações. Um menor consumo implicaria em um lento processo de enchimento do rúmen e reduziria significativamente a eficiência da fermentação da fibra. Não obstante, o preenchimento mais eficiente e mais rápido do rúmen seria vantajoso para um animal com uma dieta relativamente rica em frações da fibra potencialmente não degradável. Com isso, o conteúdo celular da planta seria digerido mais rapidamente e uma maior taxa de passagem da parede celular lignificada seria vantajosa para o animal. Contudo, deve ser propenso a obter uma dieta relativamente alta em conteúdo celular e não despender tempo e energia processando lignina e celulose (LEITE e CALVACANTE, 2005).

Muniz et al. (2012) avaliaram as características das estimativas dos parâmetros relativos à cinética de degradação ruminal da FDN dos fenos de forrageiras nativas, como mata pasto, juazeiro e mororó e concluíram que as referidas espécies forrageiras podem limitar o consumo de matéria seca e da FDN, devido aos menores valores para as taxas de passagem no feno de juazeiro. Para uma taxa de passagem mais elevada, o menor valor de consumo foi relacionado ao feno de mata pasto. As forrageiras nativas também apresentaram uma maior repleção ruminal em comparação aos alimentos mais usuais (milho, tifton 85 e aveia).

Bezerra et al. (2010) avaliaram a cinética da degradação ruminal do feno de cinco espécies forrageiras nativas do semiárido paraibano: orelha de onça (*Macroptilium Martii* Benth), amor de vaqueiro (*Desmodium canum*), feijão bravo, maniçoba (*Manihot Epruinosa*) e imburana de cambão (*Camniphora leptophloes*) e observaram que o feno de maniçoba apresentou maior valor médio da fração potencialmente degradável da FDN. Os fenos de maniçoba e orelha de onça apresentaram um menor percentual da fração não degradável entre as forrageiras avaliadas. O feno de maniçoba e feijão bravo apresentaram uma degradabilidade potencial e degradabilidade efetiva (2-5%/h) da FDN superior às demais forrageiras.

A degradabilidade da FDN de algumas espécies exóticas é superior a degradabilidade encontrada em forragens nativas da Caatinga. Entretanto, para as condições semiáridas, essas forragens exóticas apresentam dificuldades para se desenvolverem e, desta forma, prejudicam o cultivo e a utilização na alimentação de

caprinos e ovinos. Um dos aspectos determinantes para essa não utilização é a irregularidade na distribuição da chuva, o que prejudica ou até impossibilita o seu cultivo. Já as forragens nativas sobressaem-se neste ponto, pois suportam períodos prolongados de estiagem (BEZERRA et al., 2010).

Os resultados acima corroboram aqueles observados por Araújo Filho (2008). Esses autores avaliaram a qualidade do feno de mata-pasto (fase fenológica de floração e frutificação), mororó e de sabiá por meio da cinética de degradação *in situ*, e não encontraram diferença na taxa de degradação nas diferentes fases fenológicas do mata-pasto. Entretanto, foi encontrada diferença para degradabilidade efetiva para taxa de passagem de 2%/hora, onde o feno de mororó apresentou a menor taxa de degradação (2,64%/hora).

Segundo Araújo Filho (2008), as maiores taxas de degradação para os diferentes estados fenológicos do mata-pasto em relação ao feno de mororó se devem às menores proporção de FDA. O mororó, além de apresentar cerca de 88% das frações da fibra potencialmente não degradável, apresentou teor mais elevado de tanino (5,4%), o que dificulta a ação dos microrganismos que atuam na degradação ruminal. Forrageiras como o mororó, que tem uma lenta degradação da parede celular, ou seja, menor qualidade nutricional apresentam menores taxa de degradação e de passagem, prejudicando o consumo de matéria seca (MERTENS e ELY, 1982; VAN SOEST, 1994).

Embora, algumas, forrageiras da Caatinga possam limitar o consumo e, conseqüentemente, alterar a taxa de passagem e digestibilidade de certos nutrientes, é de fundamental importância buscar alternativas que viabilizem a criação de pequenos ruminantes na Caatinga, maximizando a taxa de passagem e a digestibilidade das frações fibrosas. Isso porque, na maior parte do ano, o conteúdo de fibra na Caatinga é elevado, salvo alguns meses do ano onde ocorrem a rebrota das plantas e a disponibilidade de material mais jovem no mês de março, período que coincide com maior precipitação pluviométrica. Santos et al. (2009) observaram decréscimo no teor da FDN do pasto durante a transição da estação seca para a chuvosa, onde a menor variação nos teores de FDN ocorreu entre os períodos de avaliação, com média em torno de 60%, exceto no mês de março, que foi de 54,8%. Nota-se, claramente, a

importância da melhoria no aproveitamento da FDN quando se tem a Caatinga como recurso forrageiro basal.

Santos et al. (2009) avaliaram o período de colheita das amostras e comprovaram o efeito significativo benéfico sobre a degradabilidade potencial, taxa de degradação da fração potencialmente degradável da fibra (Kd) e sobre a degradabilidade efetiva da fibra em detergente neutro a 2 e 5%/hora. Segundo os autores, esse efeito possivelmente esteve relacionado às mudanças na composição botânica e química da vegetação ao longo do período experimental, afetando as espécies presentes na área, e às partes da planta que estariam disponíveis à seleção dos animais para composição de sua dieta.

No decorrer do ano, a composição botânica da Caatinga sofre grandes modificações e, em resposta ao efeito desta situação, ocorre também uma variação na disponibilidade e qualidade da dieta. É preciso buscar alternativas para atenuar estas mudanças e reduzir o impacto causado na produção de pequenos ruminantes criados em área de Caatinga.

Visando buscar alternativas para melhorar o aproveitamento da FDN proveniente do capim-buffel, muito utilizado em sistema de produção de ruminantes, Detmann et al. (2009) determinaram que a otimização da taxa de degradação da FDN ocorre a partir da concentração de 8mg/dl da amônia ruminal.

Com o objetivo de avaliar a cinética ruminal dos fenos de malva preta, malva branca e mata-pasto, forrageiras nativas da Caatinga, bem como avaliar o desempenho de cordeiros, Benício et al. (2011) observaram que as taxas de degradação da fração potencialmente degradáveis da MS das espécies estudadas foram semelhantes entre si, de 5,96; 4,93 e 3,73, respectivamente para malva branca, malva preta e mata-pasto. Quando avaliaram o consumo de malva branca, mata pasta e um combinado entre as duas espécies mais uma suplementação concentrada em todos os tratamentos, os mesmos autores observaram um consumo máximo de 366g/dia para o tratamento com mata-pasto mais concentrado. Estes valores estão abaixo do recomendado pelo NRC (2007), que preconiza o consumo de 900 g/dia para ovinos desta categoria. Nota-se que o fornecimento de concentrado energético foi de 200g/dia para todos os tratamentos e podemos concluir que os animais substituíram o consumo da forragem pelo

concentrado, uma vez que as reais necessidades nutricionais não foram atendidas para um melhor processo fermentativo ruminal.

Em situações onde há limitação na oferta de alimento ou uma oferta de baixa qualidade nutricional, observa-se uma baixa qualidade da fibra que apresenta uma alta proporção da fração indegradável da FDN. A utilização da suplementação nitrogenada visa diminuir esta fração indegradável para uma maximização do aproveitamento do alimento. Entretanto, a suplementação energética, com base no fornecimento de concentrado não demonstra resultados favoráveis em relação à taxa de passagem e taxa de digestão da fibra.

Quando uma suplementação concentrada é fornecida e esta não atende a real necessidade nutricional dos animais, pode ocorrer um efeito de substituição: o animal aumenta o consumo do suplemento e reduz o consumo de pasto, adquirindo, desta forma, a maior parte dos nutrientes consumidos a partir do suplemento. Podemos observar esse efeito no manejo de animais criados na Caatinga, quando se fornece suplemento alimentar a animais mantidos em pasto nativo, como a Caatinga, durante a época seca, quando a oferta de nutrientes provindos do pasto é escassa.

No entanto, um aumento na disponibilidade de nitrogênio amoniacal no meio, fornecido pela suplementação com fontes de nitrogênio, como uréia e caseína, pode indicar redução do efeito carboidrato. Isso decorre da redução da competição por substratos essenciais entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas ou concomitante à suplementação conjunta com carboidratos que permite a redução dos efeitos deletérios em comparação à suplementação isolada com esses compostos (COSTA et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ruminantes, de modo geral, apresentam características semelhantes em relação ao aparelho trato gastrointestinal. Entretanto, as diferentes espécies de ruminantes apresentam certas particularidades anatômicas, dando-lhes vantagens adaptativas de acordo com o nicho ecológico que cada espécie ocupa. Uma análise holística, podemos observar que as diferentes espécies domésticas de ruminantes não ocupam o mesmo nicho ecológico, possibilitando um manejo misto entre as espécies sem prejudicar o pastejo e a oferta de alimento.

A produção de energia para o ruminante acontece via fermentação de carboidratos, sejam fibrosos ou não, entretanto em condições tropicais ocorre uma maior disponibilidade de carboidratos fibrosos e estes apresentam uma taxa de degradação mais lenta por possuir uma estrutura mais complexa. A degradação ocorre por meio de microrganismos ruminais, onde estes fermentam os carboidratos fibrosos. A estrutura dos microrganismos atuantes no processo de degradação ainda é pouco conhecida, sendo que, menos de 10% das espécies são conhecidas e cultiváveis. Novos estudos moleculares têm evidenciado novos grupos de microrganismos, tão importante quanto os já conhecidos na degradação da fibra.

Os microrganismos que degradam a fibra utilizam amônia para síntese de novas células, entretanto, os valores ideais da concentração sofrem grande variação. Em bovinos, o mínimo para que não ocorra deficiência na degradação é de 8mg/dl e de 23mg/dl de líquido ruminal para máxima taxa de crescimento microbiano. Em pequenos ruminantes, os valores ainda não estão estabelecidos, mas os valores são presumivelmente próximos aos encontrados para bovinos. Entretanto, é necessário averiguar.

Além da amônia, os microrganismos que degradam componentes fibrosos no rúmen necessitam de fontes de proteína verdadeira para suprimento de aminoácidos. Em bovinos, 1/3 do nitrogênio, requerido para máxima degradação fibra, provém de aminoácidos. O fornecimento de fontes de proteína verdadeira possibilita reparar o déficit de energia, uma vez que proporciona um aumento no crescimento de microrganismos no rúmen e, conseqüentemente, eleva a digestibilidade da forragem de baixa qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGANGA, A. A. Water utilization by sheep and goats in northern Nigeria. **World Animal Review**, v.73, p.9-14, 1992.

ALVES, J. M.; ARAÚJO, G. G. L.; PORTO, E. R.; CASTRO, J. M. C.; SOUZA, L. C. Feno de erva-sal (*Atriplex nummularia* Lindl.) e palma-forrageira (*Opuntia ficus* Mill.) em dietas para caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.9, n.1, p.43-52, 2007.

ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C. **Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifólias da Caatinga**. EMBRAPA-CNPQ. Comunicado Técnico, 39, 5p. 1998.

ARAÚJO FILHO, J. M. **Curva de desidratação e degradação in situ do feno de forrageiras nativas da Caatinga cearense**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 56p. 2008.

ARROQUY, J. I.; COCHRAN, R. C.; NAGARAJA, T. G.; Titgemeyera, 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.

AXMACHER, H.; HOFMAN, R.R. Morphological characteristics of the masseter muscle of 22 ruminant species. **Journal of Zoology**, v.215, n.3, p.463–473, 1988.

ARAÚJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V.; CHIZZOTTI, M. L.; TURCO, S. H. N.; CARVALHO, F. F. R. Water and small ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, supl. spe, p. 326-336, 2010.

BAYER, E.A.; LAMED, R.; WHITE, B.A.; FLINT, H.J. From Cellulosomes to Cellulosomics. **The Chemical Record**, v.8, n.6, p.364–377, 2008.

BERCHIELLI, T.T.; MESSANA, J.D.; CANESIN, R.C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.4, p. 954-968, 2012.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, n.2, p.567-589, 1990.

BEZERRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; BEZERRA, A. R. G. F.; PEREIRA, J. C.; PAULINO, M. F. Perfil granulométrico da fibra dietética sobre o tempo médio de retenção e a digestibilidade aparente de dietas de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2378-2386, 2004.

BEZERRA, L. R.; SILVA, A. M. A.; LIMA, F. H. S.; SOUZA, J. E. L.; CARVALHO JUNIOR, S. B.; MELLLO, J. R. M. Cinética ruminal de espécies forrageiras nativas da Caatinga. **Scientia Agraria Paranaensis**. v.9, n.2 , p. 85- 94, 2010.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T.; SOUZA, A.L.; VELOSO, R.G. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.919-925, 2008.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T.; VELOSO, R. G.; NUNES, P. M. M. Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos para as silagens de milho e de capim-elefante, o feno de capim-tifton-85 e o farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1573-1580, 2004.

CAMARGO, B.R. **Produção, caracterização e purificação de complexos enzimáticos holocelulolíticos produzidos por *Clostridium thermocellum* (Isolado B8) na presença de substratos lignocelulósicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília - DF. 86p. 2013.

CAMPOS, P.R.S.S.; VALADARES FILHO, S.C.; CECOM, P.R.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I.; SOUZA, S.M.; LUCCHI, B.B.; VALADARES, R.F.D. Estudo comparativo da cinética de degradação ruminal de forragens tropicais em bovinos e ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p. 1181-1191, 2006.

CAÑIZARES, G. I. L.; RODRIGUES, L.; CAÑIZARES, M. C. Metabolismo de carboidratos não-estruturais em ruminantes. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.1, p.63-73, 2009.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, v.57, p.13-28, 2008.

COSTA, N.L.; MONTEIRO, A.L.G.; SILVA, A.L.P; MORAES, A.; GIOSTRI, A.F.; STIVARI, T.S.S.; GILAVERT, S.; BALDISSERA, T.C.; PIN, E.A. Considerações

sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v.64, p.31-41, 2015.

COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HENRIQUES, L.T.; MANTOVANI, H. C. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1803-1811, 2009.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; OSSA, F. Review: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 1, p.1-12, 2014.

CHURCH, D. C. **El ruminante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, p. 652, 1993.

CLAUSS, M.; HOFMANN, R. R.; HUMMEL, J.; ADAMCZEWSKI, J.; NYGREN, K.; PITRA, C.; STREICH, W. J.; REESE, S. The macroscopic anatomy of the omasum of free-ranging moose (*Alces alces*) and muskoxen (*Ovibos moschatus*) and a comparison of the omasal laminal surface area in 34 ruminant species. **Journal of Zoology**, v.270, n.2, p.346–358, 2006.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residuos; Opportunities e Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DESCHAMPS, F.C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.6, p.1358-1369, 1999.

DEHORITY, B.A. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. **Journal of Applied Animal Research**, v.21, n.2, p.145-160, 2002.

DEHORITY, B.A. Hemicellulose degradation by rumen bactéria. **Federation Proceedings**, v.32, n.7, p.1819-1825, 1973.

DEHORITY, B.A. **Rumen Microbiology**. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 380, 2003.

DEHORITY, B. A.; SCOTT, H. W.; KOWALUK, P. Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.94, n.3, p.537-543, 1967.

DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; ZORZI, K.; MANTOVANI, H. C.; BAYÃO, G. F. V.; GOMES, M. P. C. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1272-1279, 2011.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, Í.; DETMANN, K.S.C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using *Michaelis–Menten* kinetics. **Livestock Science**, v.126, n.1-3, p.136–146, 2009.

DUŠKOVÁ, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, n.2, p.159–163, 2001.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 813p. 2004.

ERFLE, J.D.; SAUER, F.D.; MAHADEVAN, S. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.60, n.7, p.1064-1072, 1977.

FARENZENA, R. **Aderência e atividade fibrolítica bacteriana ruminal: Efeito do pH e da concentração de carboidratos solúveis**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS. 101p. 2010.

FARENZENA, R.; KOZLOSKI, G.V.; MEZZOMO, M.P.; FLUCK, A.C. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect

of pH or glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, v.152, p.325–332, 2014.

FERNÁNDEZ, M.H.; VRBA, E.S.A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 269-302, 2005.

FIGUEIRAS, J.F.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALENTE, T.N.P.; VALADARES FILHO, S.C.; LAZZARINI, I. Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1303-1312, 2010.

FIRKINS, J.L. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, supl. esp., p.445-457, 2010.

FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews, Microbiology**, v.6, n.2, p.121-131, 2008.

GOMES, G.M.F.; VASCONCELOS, A.M.; EGITO, A.S.; LIMA, A.R.; CARNEIRO, J. C.; LANDIM, A.V.; FONTELES, N.L.O.; SALLES, H.O. Degradabilidade in situ do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1792-1800, 2013.

GONG, X.; GRUNINGER, R.J.; QI, M.; PATERSON, L.; FORSTER, R.J.; TEATHER, R.M.; McALLISTER, T.A. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. **BMC Research Notes**, v.5, p.1-11, 2012.

GRADEL, C.M.; DEHORITY, B.A. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.23, n.2, p.332-340, 1972.

GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C.; CECATO, U.; DAMASCENO, J.C.; BRANCO, A.F.; SILVA, K.T. Determinação das frações de proteína e de carboidratos de gramíneas do gênero *Cynodon* em idades ao corte. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p. 789-794, 2001.

GOULARTE, S.R.; ÍTAVO, L.C.V.; SANTOS, G.T.; ÍTAVO, C.C.B.F.; OLIVEIRA, L.C.S.; FAVARO, S.P.; DIAS, A.M.; TORRES JUNIOR, R.A.A.; BITTAR, C.M.M. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1479-1486, 2011.

GUIMARÃES-BEELEN, P.M.; BERCHIELLI, T.T.; BUDDINGTON, R.; BEELEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.910-917, 2006.

GUIMARÃES, T.P.; PERON, H.J.M.C.; SILVA, D.B.; MOREIRA, K.K.G.; NEVES NETO, J. T.; SILVA, B.M.N.; SANTOS, F.C. Exigências proteicas para bovinos de corte. **Multi-Science Journal**, v.1, n.1, p.90-99, 2015.

LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R. Nutrição de Caprinos e Ovinos em Pastejo. In: I Seminário Norte-Riograndense de Caprinocultura e Ovinocultura, **Anais...** Mossoró-RN, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2005.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303. 1990.

LIMA, J.B.M.P. **Suplementação de novilhos nelore no período de transição águas-seca em pastagens de capim-piatã diferidas**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte. 161p. 2010.

LIU, J.; LIU, W.D.; ZHAO, X.L.; SHEN, W.J.; CAO, H.; CUI, Z.L. Cloning and functional characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase gene from a soil-derived

metagenomic library. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.4, p.1083-1092, 2011.

HADJIGEORGIOU, I. E.; GORDON, I. J.; MILNE, J. A. Intake, digestion and selection of roughage with different staple lengths by sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.47, n. 2, p.117–132, 2003.

HALL, M.B. Selection of an empirical detection method for determination of water-soluble carbohydrates in feedstuffs for application in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.198, p. 28-37, 2014.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 479-488, 2006.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T.W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D.S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R.I.; PENNACCHIO, L.A.; TRINGE, S.G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E.M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v.331, n.6016, p.463-467, 2011.

HOFMANN, R. R. **Anatomy of the gastro-intestinal tract**. In: CHURCH, D. C.; ed. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs, New Jersey:Prentice Hall, p.14-43, 1988.

HOFMANN, R.R. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. **Oecologia**, v.78, n.4, p.443-457, 1989.

JINDOU, S.; BRULC, J.M.; LEVY-ASSARAF, M.; RINCON, M.T.; FLINT, H.J.; BERG, M.E.; WILSON, M.K.; WHITE, B.A.; BAYER, E.A.; LAMED, R.; BOROVOK, I. Cellulosome gene cluster analysis for gauging the diversity of the ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v.285, n.2, p.188-194, 2008.

JINDOU, S.; XU, Q.; KENIG, R.; SHULMAN, M.; SHOHAM, Y.; BAYER, E.A.; LAMED, R. Novel architecture of family-9 glycoside hydrolases identified in cellulosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, p.308–316, 2006.

KARPOL, A.; JOBBY, M.K.; SLUTZKI, M.; NOACH, I.; CHITAYAT, S.; SMITH, S.P.; BAYER, E.A. Structural and functional characterization of a novel type-iii dockerin from *Ruminococcus Flavefaciens*. **FEBS Letters**, v.587, n.1, p.30-36, 2013

KIM, M.; YU, Z. Quantitative comparisons of select cultured and uncultured microbial populations in the rumen of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.3, n.1, p.1-6, 2012.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3º ed. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 212, 2011.

KUMAR, K.; CHAUDHARY, L.C.; AGARWAL, N.; KAMRA D.N. Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from the rumen of goats fed oak (*Quercus semicarpifolia*) leaves. **Agricultural Research**, v. 3, n. 4, p. 377–385, 2014.

LEEK, B. F. Digestion in the ruminant stomach. In: SWENSON, M. J.; REECE, W.O. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11th ed. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 387–416, 1993.

MACHADO, M. R. F.; LEAL, L. M.; SASAHARA, T. H. C.; OLIVEIRA, F. S.; DUARTE, J. M. B.; OKUDA, H. T. Morfologia do estômago do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*, Illiger 1815). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p.424-432, 2015.

MAGALHÃES, K.A.; MARTINS, E.C.; SOUZA, J.D.F.; BARBOSA, C.M.P.; GUIMARAES, V.P. **Panorama e perspectiva nacional da Ovinocultura e Caprinocultura**. Embrapa Caprinos e Ovinos, p. 1-4, 2016.

McALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**. v. 72, n. 11, p.3004-3018, 1994.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; Mc DONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal Nutrition**, v.38, n.3, p.437-443, 1977.

MERTENS, D. R.; ELY, L. O. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization - a dynamic model evaluation. **Journal of Animal Science**, v.54: 895-905, 1982.

MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**. v.84, n.6, p.1294-1309, 2001.

MORGAVI, D.P.; KELLY, W.J.; JANSSEN, P.H.; ATTWOOD, G.T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v.7, n.s.1, p.184-201, 2013.

MOSLEH, H.; NAGHIHA, A.; KESHTKARAN, A.N.; KHAJAVI, M. Isolation and Identification of tannin-degrading bacteria from native sheep and Goat feces in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, n.1, p. 176-180, 2014.

MULLER, M.; PRADO, I.N. Metabolismo da pectina em animais ruminantes-Uma revisão. **Revista Varia Scientia**, v.4, n.08, p.45-56, 2005.

MUNIZ, E.B.; MIZUBUTI, I.Y.; PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; RIBEIRO, E.L.A.; ROCHA JÚNIOR, J.N.; CAPELARI, M.G.M.; BRITO, V.M. Cinética de degradação ruminal de carboidratos de volumosos secos e aquosos: técnica de produção de gases. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1191-1200, 2011.

MUNIZ, E. B.; MIZUBUTI, I. Y.; PEREIRA, E. S.; PIMENTEL, P. G.; RIBEIRO, E. L. A.; PINTO, A. P. Cinética ruminal da fração fibrosa de volumosos para ruminantes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 3, p. 604-610, 2012.

MURRAY, W.D. *Acetivibrio cellulosolvens* is a synonym for *Acetivibrio cellulolyticus*: emendation of the genus *acetivibrio*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.314-316, 1986.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academic Press, 292p. 2007.

NEGRÃO, F.M.; ZANINE, A.M.; CABRAL, L.S.; SOUZA, A.L.; DE, ALVES, G.R.; FERREIRA, D.J.; DANTAS, C.C.O.; LEHMKUHL, A. Fractionation of carbohydrates and protein and rumen degradation kinetic parameters of brachiaria grass silage enriched with rice bran. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.43, n.3, p.105-113, 2014.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33 n.7, p. 1549-1558, 2010.

OHARA, H.; KARITA, S.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, n.2, p.254-260, 2000.

OH, Y.K.; KIM, J.H.; KIM, K.H.; CHOI, C.W.; KANG, S.W.; NAM, I.S.; KIM, D.H.; SONG, M.K.; KIM, C.W.; PARK, K.K. **Asian Australasian Journal Animal Sciences**, v. 21, n.3, p. 392-403, 2008.

OLIVEIRA, J.S.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**. v.8, n.6, p.1-12, 2007.

OLIVEIRA, V.S.; SANTANA NETO, J.A.; VALENÇA, R.L. Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo - Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 1-21, 2013.

OSBORNE, J.M.; DEHORITY, B.A. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.9, 2247–2250, 1989.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. **Fermentación ruminal**. In: CHURCH, D.C. (Ed.) El rumiante fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Acribia, p.159- 190. 1993.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v.10, n.4, p.196-211, 2009.

PAPACHRISTOU, T. G.; DZIBA, L. E.; PROVENZA, F. D. Foraging ecology of goats and sheep on wooded rangelands. **Small Ruminant Research**, v.59, p.141-156. 2005.

PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; DUARTE, L.S.; MIZUBUTI, I.Y.; ARAÚJO, G.G.L.; CARNEIRO, M.S.S.; REGADAS FILHO, J.G.L.; MAIA, I.S.G. Determinação das frações proteicas e de carboidratos e estimativa do valor energético de forrageiras e subprodutos da agroindústria produzidos no Nordeste Brasileiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.4, p.1079-1094, 2010.

PEREIRA FILHO, J.M.; ARAÚJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F. C.; REGO, M.C. Disponibilidade de fitomassa do estrato herbáceo de uma Caatinga raleada submetida ao pastejo alternado ovino-caprino. **Livestock Research for Rural Development**, v.19, n.1, 2007.

PEREIRA FILHO, J.M.; SILVA, A.M.A.; CÉZAR, M.F. Manejo da Caatinga para produção de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, n.1, p.77-90, 2013.

PEREIRA FILHO, J.M.; VIEIRA, E.L.; KAMALAK, A.; SILVA, A.M.A.; CEZAR, M.F.; BEELEN, P.M.G. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Wild) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**, v.17, n.8, p.1, 2005.

PEREZ, W.; ERDOGAN, S.; UNGERFELD, R. Anatomical study of the gastrointestinal tract in free-living Axis deer (*Axis axis*). **Anatomia Histologia Embryologia**, v.44, n.1, p.43-49, 2014.

PIRES, P.R.S.; SANTANA NETO, J.A.; OLIVEIRA, J.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; SANTOS, E.M.; SANTOS, V.S. Efeito de diferentes concentrações da amônia ruminal

sobre a degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem de baixa qualidade. In: X Simpósio Paraibano de Zootecnia, Areia-PB. **Anais...** p. 1-3, 2016.

RIBEIRO, M. S. **Consumo e cinética ruminal da fibra oriunda da forragem para cabras em manutenção.** Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP, 67p. 2009.

RIBEIRO, P. R.; MACEDO JUNIOR, G.L.; SILVA, S.P. Aspectos nutricionais da utilização da proteína pelos ruminantes. **Veterinária Notícias**, v.20, n.2, p.1-14, 2014.

SALLAM, S.M.A.; BUENO, I.C.S.; GODOY, P.B.; NOZELLA, E.F.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, p. 1-10, 2010.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; LAZZARINI, I.; SOUZA, M.A.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.560-569, 2009.

SANTANA NETO, J.A.; OLIVEIRA, V.S.; VALENÇA, R.L.; CAVALCANTE, L.A. D. Características da fermentação ruminal de ovinos em pastejo - Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1-21, 2012.

SANTOS, F.A.P.; MENDONÇA, A.P. **Metabolismo de proteínas.** In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.). *Nutrição de Ruminantes*, 2ª ed. Jaboticabal, Funep, p. 265-297, 2011.

SANTOS, G.R.A.; BATISTA, Â.M.V.; GUIM, A.; SANTOS, M.V.F.; MATOS, D.S.; SANTORO, K.R. Composição química e degradabilidade *in situ* da ração em ovinos em área de Caatinga no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.2, p. 384-391, 2009.

SANTOS, V.S.; SANTANA NETO, J.A.; OLIVEIRA, J.S.; OLIVEIRA, C.J.B.; SANTOS, E.M.; PIRES, P.R.S.; COSTA, E.C.B. Efeito da substituição do nitrogênio não proteico por proteína verdadeira sobre a degradação ruminal *in vitro* da fibra em

detergente neutro de forragem de baixa qualidade. In: XXVI Congresso Brasileiro de Zootecnia, Santa Maria - RS. **Anais...** p. 1-3, 2016.

SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 32, n. 2, p.199-208, 1974.

SILVA, S. P. **Taxa de passagem em caprinos submetidos ou não à restrição alimentar**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p.80, 2013.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.4, p.1153–1161, 2011.

SHARMA, D.; MAL, G.; KANNAN, A.; BHAR, R.; SHARMA, R.; SINGH B. Degradation of euptox A by tannase-producing rumen bacteria from migratory goats. **Journal of Applied Microbiology**, v.123, n.5, p. 1194-1202, 2017.

SHAW, N.C.; KIM, M.; EASTRIDGE, M.L.; YU, Z. Effects of different sources of physically effective fiber on rumen microbial populations. **Animal**, v.10, n. 3, p. 410-417, 2016.

SHI, P. J.; MENG,K.; ZHOU, Z.G.; WANG,Y.R.; DIAO, Q.Y.; YAO, B. The host species affects the microbial community in the goat rumen. **Applied Microbiology**, v.46, n.1, p.132–135, 2008.

SNIFFEN, C. J.; O’CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p. 3562-3577, 1992.

SOUZA, M.A.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; SAMPAIO, C.B.; LAZZARINI, Í.; VALADARES FILHO, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fibre in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.6, p.1299-1310, 2010.

STEVENS, C.E.; HUME, I.D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrientes. **Physiological Reviews**, v.78, n.2, p.393-427, 1998.

STIVERSON, J.; MORRISON, M.; YU, Z. Populations of select cultured and uncultured bacteria in the rumen of sheep and the effect of diets and ruminal fractions. **International Journal of Microbiology**, p.1-8 p. 2011.

TEDESCHI, L.O. **Development and evaluation of models for the Cornell net carbohydrate and protein system: 1. Feed Libraries, 2. Ruminal nitrogen and branched-chain volatile fatty acid deficiencies, 3. Diet optimization, 4. Energy requirement for maintenance and growth.** Thesis (Ph.D. Animal Science.). Ithaca, Cornell University, 414p. 2001.

TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal Animal Science**, v.78, n.6, p.1648-1658, 2000.

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.; CHIZZOTTI, M.L.; AMARAL, H.F.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. (Eds.). **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**, 3ª ed. Viçosa, MG, 502p., 2010.

VALENÇA, R.L.; FERREIRA, Â.C.D.; SANTOS, A.C.P.; SILVA, B.C.D.; OLIVEIRA, V.S.; SANTANA NETO, J.A.; LIMA, J.U.N.; OLIVEIRA, E.S. Silagem de bagaço de laranja pré-seco e a sua utilização na alimentação de ruminantes - Revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.15, n.1, p. 68-73, 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Comstock Publishing Association, 476 p. 1994.

VARGA, G.A.; DANN, H.M.; ISHLER, VA. The use of fiber concentrations for ration formulation. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p. 3063-3074, 1998.

VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; SILVA FILHO, J.C.; COSTA, C.; BUENO, M.S.; NOZELLA, E.F.; LONGO, C.; VIEIRA, M.E.Q.; CABRAL

FILHO, S.L.S.; MUELLER-HARVEY, I. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p.345-361, 2005.

WAKABAYASHI, K. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. **Journal Plant Research**, v.113, n.3, p.231-237, 2000.

WEIMER, P.J. End product yields from the extraruminal fermentation of various polysaccharide, protein and nucleic acid components of biofuels feedstocks. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p.3254-3259, 2011.

XIMENES, E.A.; FELIX, C.R. O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulosoma. **Universitas Ciências da Saúde**. v.1, n.2, p.335-341, 2008.

ZAMBOM, M.A.; ALCALDE, C.R.; HASHIMOTO, J.H.; MACEDO, F.A.F.; PASSIANOTO, G.O.; LIMA, L.S. Parâmetros digestivos, produção e qualidade do leite de cabras Saanen recebendo rações com casca do grão de soja em substituição ao milho. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.29, n.3, p. 309-316, 2007.

CAPÍTULO 2

DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA SOBRE A DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS DE CAPIM-BUFFEL

Diferentes níveis de amônia sobre a degradação *in vitro* dos carboidratos fibrosos de capim-buffel

Resumo – Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) e o perfil de ácidos graxos voláteis oriundos da fermentação de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*, L.) em diferentes níveis de amônia em meio de cultura. Os tratamentos consistiram em seis níveis de amônia em meio de cultura, através da adição da uréia: 0; 5; 10; 15; 20 e 30 mg/dL de meio. Sendo avaliados por incubação *in vitro* em diferentes tempos de incubação: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas, com três repetições. Os resíduos da incubação foram avaliados em relação ao teor de FDN e analisados por intermédio de modelo logístico não-linear. Foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) para as concentrações ruminais de acetato e propionato, com o aumento dos níveis de amônia. O tratamento com 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, apresentou médias de 57,6 e 23,1 mM para acetato e propionato, respectivamente, com ponto de máximo de 16,4 e 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal. A adição da uréia elevou de 2,5 a 20,1% a taxa de degradação da FDNpd em comparação ao tratamento sem adição de uréia e uma redução na estimativa de latência discreta de 0,34 a 2,31 horas. A suplementação com uréia elevou em 2,6 a 20,1% a taxa de crescimento específico de microrganismos. A degradação da FDN, ao término do ensaio de incubação, demonstrou efeito quadrático com ponto de máxima degradação da FDN, de 17,76 mg/dL de amônia no líquido ruminal. O fornecimento da uréia melhora a dinâmica de degradação da fibra em detergente neutro do capim-buffel diferido e as concentrações de acetato e propionato. O nível ótimo de nitrogênio amoniacal é de 17,76 mg/dL para uma máxima degradação da FDN de capim-buffel, por microrganismos ruminas de caprinos e de 16,4 e 15 mg/dL respectivamente para acetato e propionato.

Palavras-chave: carboidratos fibrosos, *Cenchrus ciliaris*, cinética de degradação, nitrogênio não proteico, uréia

Effect of ammonia levels on the degradation of the fibrous carbohydrates of buffel grass *in vitro*

Abstract - The objective of this work was to evaluate the *in vitro* degradation dynamics of neutral detergent fiber (NDF) and the volatile fatty acid profile of the fermentation of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*, L.) at different levels of ammonia in medium culture. The treatments consisted of six levels of ammonia in culture medium, by the addition of urea: 0; 5; 10; 15; 20 and 30 mg/dL of medium. They were evaluated by *in vitro* incubation at different incubation times: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours with three replicates. The residues from the incubation were evaluated in relation to the NDF content and analyzed by means of a nonlinear logistic model. The quadratic effect ($P < 0.05$) was observed in the ruminal concentrations of acetate and propionate, with an increase in ammonia levels. Treatment with 15 mg / dL of ammoniacal nitrogen in the ruminal fluid presented mean values of 57.6 and 23.1 mM for acetate and propionate, respectively, with a maximum of 16.4 and 15 mg / dL of ruminal ammoniacal nitrogen liquid. The addition of urea increased the NDFpd degradation rate from 2.5 to 20.1% compared to the treatment without addition of urea and a reduction in the discrete latency estimate of 0.34 to 2.31 hours. Urea supplementation increased the specific growth rate of microorganisms by 2.6 to 20.1%. Degradation of NDF at the end of the incubation test showed a quadratic effect with the maximum NDF degradation point of 17.76 mg/dL ammonia in the rumen liquid. The urea supply improves the degradation dynamics of the neutral detergent fiber of the delayed buffel grass and the concentrations of acetate and propionate. The optimum level of ammoniacal nitrogen is 17.76 mg / dL for a maximum degradation of the NDF of buffelgrass, by goat microorganisms and 16.4 and 15 mg/dL, respectively, for acetate and propionate.

Key words: *ciliary cenchrus*, degradation kinetics, fibrous carbohydrates, non-protein nitrogen, urea

INTRODUÇÃO

A amônia é um dos principais compostos utilizados pelos microrganismos ruminais que degradam os carboidratos fibrosos e sendo assim, essencial para o seu crescimento. A suplementação com fontes de nitrogênio ao ruminante mostra-se importante, principalmente em animais mantidos em pastagens (FIGUEIRAS et al., 2010), melhorando a digestibilidade ruminal da forragem e disponibilizando maior aporte de energia e nutrientes ao animal, na forma de ácidos graxos voláteis e de proteína microbiana.

Na região Nordeste, mais precisamente na região Semiárida brasileira, o capim-buffel é amplamente utilizado em pastagens para pequenos ruminantes (caprinos e ovinos). No período seco, é comum utilizar o feno em pé de pastagem de capim-buffel manejada em sistema de deferimento na alimentação dos animais, como uma forma de garantir uma maior disponibilidade de massa forrageira, suficiente o bastante para atender o bom nível de consumo pelos animais (SANTOS et al., 2005).

Segundo Moreira et al. (2007), feno em pé de capim-buffel manejada em sistema de deferimento apresenta baixo teor de lignina, porcentagens de carboidratos totais, de nutrientes digestíveis totais, proteína ligada à fibra em detergente ácido e o teor da fibra em detergente neutro, destacando que a grande limitação da pastagem de Capim- Buffel diferido está relacionada ao teor de proteína bruta.

A utilização eficiente da fração fibrosa das forragens, por meio da adição de compostos nitrogenados, incrementa o desempenho animal e, conseqüentemente, melhora a eficiência produtiva e econômica dos sistemas de produção (COSTA et al., 2008). Desde Satter e Slyter (1974), vários trabalhos foram realizados para identificar a concentração do nitrogênio amoniacal ruminal que é necessária para otimização da fermentação pelos microrganismos ruminais, dos carboidratos fibrosos. Entretanto, essa concentração ainda é controversa. Esses autores recomendam concentração mínima de 4 a 5 mg/dL de nitrogênio amoniacal ruminal, para que não ocorra nenhuma deficiência na degradação da fibra. Mehrez et al. (1977) preconizam a concentração de 23 mg/dL para atingir o potencial máximo para síntese de proteína microbiana. Ainda assim, para gramíneas tropicais são necessários 10 a 20 mg de amônia/dL de líquido ruminal para

que se maximize a degradação ruminal e o consumo de matéria seca (MS), respectivamente (LENG, 1990).

Sabe-se, então, da importância dos compostos nitrogenados na digestão dos carboidratos fibrosos por ruminante. Porém, a maioria destes trabalhos foi realizada com bovinos, havendo poucos estudos em relação à concentração de nitrogênio amoniacal ruminal e degradação da forragem para caprinos. Segundo Campos et al. (2006), bovinos não devem ser considerados modelos experimentais em estudos de degradação da FDN para pequenos ruminantes. Uma vez que as diferenças nas composições da comunidade microbiana são predominantemente atribuíveis à dieta, entretanto a espécie hospedeira também pode influenciar na estrutura da comunidade bacteriana (HENDERSON et al., 2015) Então, trabalhos que utilizam microrganismos ruminais advindos de bovinos podem não apresentar os mesmos resultados quando repetidos com caprinos.

Assim, para determinação da utilização eficiente da fração fibrosa de forragens por caprinos, são necessários estudos sobre a dinâmica da digestão da forragem utilizando compostos nitrogenados em diferentes proporções para avaliar a extensão da degradação da forragem, bem como, verificar crescimento microbiano e produção de ácidos graxos voláteis no rúmen.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*, L.) de baixa qualidade em diferentes níveis de amônia e o perfil de crescimento de microrganismos ruminais advindos de caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio *in vitro* foi realizado no Laboratório do Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Paraíba (UFPB), do Centro de Ciências Agrárias, no município de Areia/PB. Foi utilizado um caprino fistulado no rúmen como doador de líquido ruminal. Este foi alimentado exclusivamente com capim-elefante por sete dias consecutivos, antes da realização da coleta do líquido ruminal, para diminuir a concentração de compostos nitrogenados no líquido ruminal.

O experimento foi executado obedecendo às normas técnicas de biossegurança e ética, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (protocolo: 0209/14).

O capim-buffel (*Cenchrus Ciliaries*), foi coletado de uma pastagem deferida, onde a gramínea apresentava-se em um estado fenológico avançado e após a coleta foi seco sob ventilação forçada (60° C), foi processado em moinho de facas com peneiras de 2 mm para uso nas incubações e processadas em moinho de facas com peneiras de 1 mm para quantificar os teores de matéria seca (MS) (método 930.15), proteína bruta (PB) (método 968.06), extrato etéreo (EE) (954.05), matéria mineral (MM) (método 942.05), de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2012). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram estimados por metodologia de Van Soest (1967) e expressos na forma corrigida para cinzas e compostos nitrogenados e o teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro em relação ao nitrogênio total (NIDN/NT) segundo os procedimentos de Licitra et al., (1996). Os valores de carboidratos totais (CHOT) foram obtidos pela equação CHOT (%) = 100 - (%PB + %EE + %MM) e os carboidratos não fibrosos (CNF) = 100 - (%PB + %FDNcp + %MM + %EE), onde FDNcp é o FDN livre de cinzas e proteínas como descrito por Sniffen et al. (1992). (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição bromatológica do capim-buffel e da uréia

Item	Capim-buffel	Uréia
Matéria seca (g/kg)	854,4	982,1
Matéria orgânica(g/kg MS)	905,2	997,6
Cinzas (g/kg MS)	94,8	2.4
Proteína Bruta (g/kg MS)	49,8	2610,0
Extrato Etéreo (g/kg MS)	16,6	-
Carboidratos Totais (g/kg MS)	838,8	-
¹ FDN (g/kg MS)	857,0	-
² FDNcp (g/kg MS)	799,7	-
³ FDA (g/kg MS)	348,1	-
⁴ CNF (g/kg MS)	39,1	-

⁵ NT (g/kg MS)	8,0	-
⁶ NIDN (% do NT)	195,6	-
Lignina (g/kg MS)	76,6	-

¹Fibra em Detergente Neutro; ² FDN livre de cinzas e proteínas; ³Fibra em Detergente Ácido;

⁴Carboidratos não Fibrosos; ⁵Nitrogênio Total; ⁶Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro.

Foi coletado líquido ruminal do caprino, três horas após o arraçoamento, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa. No laboratório, o líquido foi saturado com dióxido de carbono (CO₂), colocado em repouso a 39°C e após formação das interfaces do líquido procedeu a retirada do líquido intermediário que foi centrifugado a 500 x G por 10 minutos e o sobrenadante descartado para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (RUSSELL e MARTIN, 1984). O resíduo da centrifugação (*pellet*), foi re-suspenso mais duas vezes em tampão de McDougall (9,80g de NaHCO₃; 4,65g de Na₂HPO₄*2H₂O; 0,57g de KCl; 0,12g de MgSO₄*7H₂O e 0,04g de CaCl₂, diluídos com água destilada até o volume de 1000ml) autoclavado.

O experimento consistiu de seis níveis de amônia ruminal, através da adição de uréia no meio de incubação: 0; 5; 10; 15; 20 e 30 mg/dL, encubados por 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Cada tratamento teve três repetições por tempo, em que foi determinada a degradação *in vitro* da FDN e parâmetros de crescimento microbiano. Foram incluídos nas incubações três frascos sem inóculo, que serviram de branco para a degradabilidade. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado com 6 níveis de amônia e com três repetições.

Foi utilizado, em cada frasco de incubação, 35 ml do meio de cultura (28 ml de tampão de McDougall e 7 ml de inóculo), 350 mg de capim-buffel, ou apenas 35 ml do meio de cultura (branco). A uréia foi adicionada nos frascos de incubação para atingir as determinadas concentrações finais de nitrogênio amoniacal no meio de cultura de cada tratamento. Os tratamentos tiveram as seguintes constituições: 1) 0 mg de uréia; 2) 3,19 mg de uréia; 3) 6,39 mg de uréia; 4) 9,58 mg de uréia; 5) 12,77 mg de uréia e 6) 19,16 mg de uréia. Cada frasco foi então saturado com CO₂, tampado e lacrado. Os frascos foram incubados a 39°C, em estufa incubadora de BOD durante 96 horas. Durante a incubação foram retirados de todos os frascos, os gases produzidos através de seringas a cada 3 horas.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da estufa incubadora de BOD e o resíduo filtrado para determinação da degradabilidade da FDN. Foi retirado de cada unidade experimental 2,0 ml de amostra do meio de cultura que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a 5200 x G, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análise, posterior, da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3). O pelete resuspenso em solução de NaCl (0,9% p/v), centrifugado a 5200 x g, por 10 minutos, descartado o sobrenadante, resuspenso novamente em solução de NaCl (0,9% p/v), e congelado para posterior determinação de proteína microbiana. A concentração de amônia foi determinada através do método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962) e proteína microbiana pelo método de Bradford (1976).

Para análise dos ácidos graxos voláteis (AGV), foi retirado de todas as unidades experimentais, às 48 horas de incubação, 2,0 ml de amostra do meio de cultura que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a 5200 x g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análises de ácidos graxos voláteis (AGV), em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se um comprimento de ondas: 210 nm. Utilizou-se uma coluna C18 marca SHIMADZU com 30 cm x 7.9 mm de diâmetro, com fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto, sobre uma pressão de 69 kgf, sendo a fase móvel água em 1% de ácido orto fosfórico e o volume injetado 20 ul. Foram analisadas as concentrações dos ácidos graxos voláteis acetato, propionato e butirato, bem como a relação acetato/propionato, AGVs totais e a concentração de lactato.

Foram incubados também frascos considerados branco, contendo as soluções de incubação sem substrato, para o ajuste das variações existentes. Os frascos foram fechados utilizando-se rolhas de borracha e, em seguida, agitados para homogeneização das amostras.

Na determinação da degradabilidade da FDN foi retirado, para cada período de análise, o material residual de cada frasco, lavado com água quente em cadinho filtrante até a retirada do meio de cultura. Este resíduo foi seco em estufa ventilada e, após 24 horas, foi pesado em balança analítica. Deste resíduo foi determinado o teor de FDN pelo método de Van Soest (1967), que foi considerado parte indigestível do alimento.

Os resíduos da FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram analisados pelo algoritmo de Gauss-Newton e ajustado ao modelo logístico não linear descrito por Van Milgen et al. (1991) e Detmann et al. (2011).

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

(I)

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

A função descrita em (I) é considerada simétrica em relação às taxas fracionais de degradação c e p , sendo frequentemente reconhecido que os menores valores estão associados a c (VIEIRA *et al.*, 1997). Entretanto, quando as taxas fracionais c e p tendem à mesma estimativa, indeterminação matemática será observada e o modelo re-parametrizado segundo a regra de L’Hôpital (VAN MILGEN *et al.*, 1991):

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

(II)

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h⁻¹). Nesta circunstância, devido o parâmetro λ descrever simultaneamente as taxas de latência e degradação, determinou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ utilizando as propriedades da distribuição gama-2 (ELLIS *et al.*, 1994):

$$c' = 0,59635 \times \lambda$$

(III)

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDN_{pd} (h⁻¹) para os casos em que o modelo re-parametrizado for utilizado (Equação II).

A latência discreta foi obtida segundo modelos de Vieira *et al.* (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(t_i)}{\mu} + t_i$$

(IV)

em que: L = latência discreta (h); $R(0)$ = resíduo de FDN não degradada em $t = 0$ (%); $R(t_i)$ = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de

degradação (%); μ = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h^{-1}); t_i = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de t_i foram calculados segundo as observações de Van Milgen et al. (1991) (Equações I e II, respectivamente):

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

(V)

$$t_i = \frac{1}{\lambda}$$

(VI)

A taxa específica de crescimento microbiano em relação a FDNpd foi calculada segundo hipótese proposta por Beuvink e Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{\mu}{U}$$

(VII)

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1}). Com as estimativas de Sgr calculadas, estimou-se as eficiências de crescimento microbiano em relação a FDNpd, segundo teorias de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{Sgr} + \frac{1}{Y_m}$$

(VIII)

em que: Y = eficiência microbiana ($g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$); m = exigência para manutenção dos microrganismos ($g \text{ carboidratos} \times g^{-1} \text{ células} \times h^{-1}$); e Y_m = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato ($g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$). O parâmetro Y_m foi adotado como referência com o valor de $0,4 g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$ e para m o valor de $0,05 g \text{ carboidratos} g^{-1} \text{ células} \times h^{-1}$, conforme recomendações de Russell et al. (1992).

As frações efetivamente degradadas da FDN foram calculadas de acordo por Costa et al. (2008) em adequação a metodologia de Ørskov e McDonald (1979):

$$FED = \lim_{t \rightarrow \infty} \int_0^t \left[f(t) \times \left(-\frac{dRt}{dt} \right) \right] dt$$

(IX)

em que: FED = fração efetivamente degradada da FDN (%); $f(t)$ = função relativa ao deslocamento de sólidos no ambiente ruminal. Para definição da função descrita em (IX), assumiu-se deslocamento ruminal de sólidos de ordem gama-1 (ELLIS et al., 1994), à qual foram alocado valores hipoteticamente, 0,020, 0,035 e 0,050.

Desta forma, calculou-se FED, no contexto das equações (X), respectivamente, por:

$$FED = U \times \frac{\lambda^2}{(\lambda + k)^2}$$

(X)

Os modelos foram ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes níveis de adição e foram comparados de forma descritiva. Os valores de concentração de N-NH₃ e proteína microbiana obtidos nos tempos de 0 e 48 horas de incubação foram avaliados por análise de variância e regressão e os critérios utilizados na escolha do modelo foi a significância dos coeficientes de regressão a 5% de probabilidade pelo teste Tukey e o coeficiente de determinação (r^2), obtido pela relação entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados dos tratamentos e do fenômeno biológico.

Os dados de AGV e lactato foram submetidos à análise de variância e regressão. Os critérios para escolha de modelos de regressão foram a significância dos parâmetros da regressão, valores do coeficiente de determinação e interpretação biológica das curvas de regressão. A análise estatística das variáveis foi realizada pelo teste Tukey e, assim aplicada a análise de regressão para os que foram significativos.

O desvio padrão assintótico (DPA), foi calculado a partir da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo de cada modelo. Todas as análises estatísticas, tanto lineares, como não-lineares, foram realizadas por intermédio do programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da uréia elevou os valores de N-NH₃ linearmente ($P < 0,05$), tanto no tempo 0 hora, imediatamente após a adição da uréia, como no tempo de 48 horas de incubação (Tabela 2). Analisando o tempo experimental de 0 hora, pode-se observar

que no tratamento sem adição de uréia houve o menor valor para nitrogênio amoniacal(1,63 mg/dL) e com aumento linear até o valor máximo de 11,8 mg/dL no tratamento com máxima adição de uréia.

Tabela 2 – Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de amônia e proteína microbiana as 0 e 48 horas de incubação *in vitro*

	Níveis de Nitrogênio amoniacal, mg/dl						CV(%) ¹	R ²	<i>p-value</i>	
Parâmetro	0	5	10	15	20	30			L	Q
	N-NH ₃ , mg/dL									
0 horas ²	1,63	3,47	7,12	7,87	8,56	11,81	17,60	0,94	0,018	ns
48 horas ³	16,38	16,46	19,46	25,55	34,99	42,68	14,67	0,94	0,013	ns
	Ptn microbiana, mg/L									
0 horas	282,1	282,6	273,0	284,0	277,3	268,3	13,0	-	ns	ns
48 horas ⁴	308,7	334,9	335,9	421,6	478,8	357,8	7,72	0,64	0,001	0,005

¹CV = coeficiente de variação, probabilidade significativa ao nível de 5% de probabilidade (p < 0,05 pelo teste Tukey); NS = não significativo; L = linear; Q = quadrático, R²= Coeficiente de determinação. ² $\hat{Y}=2,34+0,0,330X$; ³ $\hat{Y}= 12,96+0,97X$; ⁴ $\hat{Y}= 283,66+14,53X-0,38X^2$.

No tempo de 48 horas de incubação observa-se elevada concentração de N-NH₃ no meio, independente da concentração de uréia adicionada no tempo 0h. Provavelmente, nos menores níveis de amônia (0 e 5 mg de N-NH₃/dl) parte da proteína do Capim-buffel, foi desaminada no rúmen, por ação de microrganismos proteolíticos, sendo desdobrado em amônia. Segundo Lana et al. (1998), a maior produção de amônia também está associada ao aumento do pH do meio, elevando a atividade de desaminação e consequentemente aumentando a produção de amônia. No início da fermentação a maior parte da proteína, presente na forragem, encontra-se na forma de proteína não degradada e durante o processo de fermentação há redução do nitrogênio protéico e aumento substancial do nitrogênio amoniacal pela proteólise e desaminação de proteínas e aminoácidos, ou seja, a proteína insolúvel, mas potencialmente degradável, dos alimentos, é convertida em amônia (DANLEY e VETTER, 1973; LANA et al., 2007).

Foi observado um ponto ótimo para eficiência de síntese de proteína microbiana, pela derivação da equação de segundo grau, quando foi verificado uma concentração

ótima de 19,11 mg de N-NH₃/dL de meio de cultura. As concentrações maiores de 19,11 mg de N-NH₃/dL no meio inibiu o crescimento microbiano. Esta concentração está acima do recomendado por Hoover (1986), que preconiza concentrações médias de amônia para iniciar o crescimento microbiano, suprimindo as necessidades mínimas da população microbiana em torno de 3,3 mg/dL e abaixo dos valores definidos por Mehrez et al. (1977), que recomendam a concentração de 23 mg/dL para atingir o potencial máximo para síntese de proteína microbiana em ovinos.

Na Figura 1b, observa-se que a concentração de proteína microbiana foi aumentando concomitante a liberação de amônia (Figura 1a) no meio, demonstrando que a medida que se tinha mais N-NH₃, possibilitou maior crescimento microbiano. Após 12 horas de incubação observa-se um pico de proteína microbiana nos meios que continham entre 5 a 30 mg /dL de N-NH₃. No nível de 0 mg/dL de N-NH₃ o pico na concentração de proteína microbiana ocorreu entre 72 e 96 horas de incubação e a concentração de amônia e proteína microbiana no meio foi, ao longo de todo o período de incubação, menor que os tratamentos que continham entre 5 a 30 mg/dL de N-NH₃. Provavelmente, a liberação lenta de nitrogênio não protéico advindo do capim-buffel limitou o crescimento microbiano, porque fenos desta gramínea pode apresentar cerca de 44,5% da PB na forma de NNP (CABRAL, 2014) e parte deste NNP é insolúvel, pois está associada a lignina na parede celular, sendo de baixa disponibilidade ao processo digestivo dos ruminantes (FRIBOURG, 1985; BEZERRA et al., 2014).

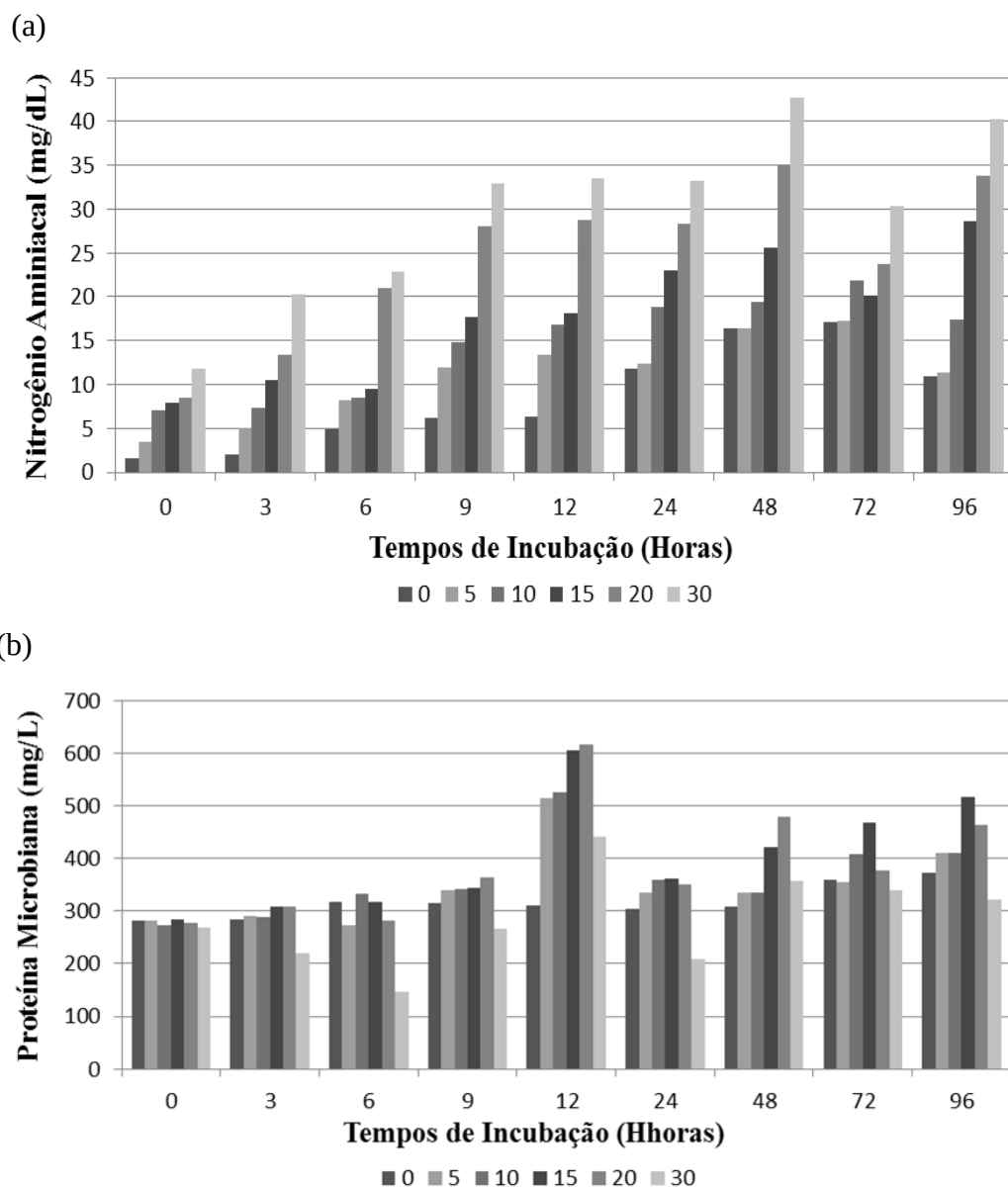


Figura 1- Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de amônia (a) e proteína microbiana (b) ao longo de 96 horas de incubação *in vitro*.

No meio com nível de 30 mg/dL de N-NH_3 houve menor concentração de proteína microbiana ao longo de todo o período de incubação em relação aos meios que continham entre 5 a 20 mg/dL de N-NH_3 (Figura 1b). Devido a sua alta solubilidade no meio ruminal, as fontes químicas de nitrogênio não proteico, como a exemplo da uréia, podem provocar uma liberação de níveis prejudiciais de amônia no rúmen, o que pode reduzir a atividade microbiana ruminal (ARELOVICH et al., 2000).

Foi observado efeito quadrático ($P<0,05$) para as concentrações ruminais de acetato e propionato. As maiores concentrações de acetato (57,6 mM) e propionato (23,1 mM), foram com 16,4 e 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal no meio, respectivamente (Tabela 3). Quando as concentrações de nitrogênio amoniacal ultrapassaram os níveis citados, ocorreu decréscimo na fermentação, ocasionando uma redução nas concentrações dos AGVs citados.

Tabela 3. Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre a concentração de ácidos graxos voláteis em 48 horas de incubação *in vitro*

AGV ²	Níveis de Nitrogênio amoniacal ¹					
	0 mg/dL	5 mg/dL	10 mg/dL	15 mg/dL	20 mg/dL	30 mg/dL
Acetato	52,6	53,2	55,6	57,6	46,2	44,3
Propionato	13,1	15,2	16,9	24,1	12,6	13,1
Butirato	2,3	2,4	2,5	2,6	2,6	2,5
Lactato	0,35	0,35	0,33	0,38	0,38	0,32
A/P ³	4,3	3,5	3,3	2,5	3,8	3,9
AGV Totais	68	70,8	75	84,3	61,4	59,9
Parâmetro	Equação Regressão		CV(%)	L	Q	R ²
Acetato	$\hat{Y}=52,8+0,59X-0,018X^2$		17,6	0,064	0,043	0,66
Propionato	$\hat{Y}=12,8+0,69X-0,023X^2$		22,8	0,825	0,012	0,35
Butirato	$\hat{Y} = 2,5$		22,5	0,189	0,216	-
Lactato	$\hat{Y} = 0,35$		23,6	0,707	0,550	-
A/P ³	$\hat{Y} = 3,5$		20,6	0,634	0,488	-
AGV Totais	$\hat{Y}=68,1+1,17X-0,04X^2$		5,2	0,055	0,001	0,49

¹Níveis de nitrogênio amoniacal ruminal; ²Concentração de AGVs em milimolar (mM); ³Relação Acetato/Propionato.

Segundo Satter & Slyter (1974) a produção de AGVs é ligeiramente diminuída sob condições limitantes de nitrogênio amoniacal ruminal, entretanto em concentrações maiores a 5 mg/dL de nitrogênio amoniacal ruminal não ocorre nenhum efeito significativo em relação as quantidades relativas de AGVs produzidos. Porém Imaizumi et al. (2002) infere que 5 mg/dL de nitrogênio amoniacal ruminal são insuficientes para

alcançar a máxima atividade microbiana no rúmen, uma vez que os valores médios de N-NH₃ observados para máxima degradação da fibra foi entre 10,91 e 15,29 mg/dL. No presente trabalho, no meio sem adição de uréia houve baixo crescimento microbiano (Tabela 2), somente após 24 horas de incubação e a liberação de teores maiores de 15 mg/dL de amônia, é que se iniciou um lento crescimento microbiano (Figura 1b).

Em relação ao butirato e lactato não foram observados efeitos significativos ($P>0,05$) em relação aos níveis de concentração do nitrogênio amoniacal ruminal, com média de 2,5 e 0,35 mM, respectivamente (Tabela 3).

A relação acetato/propionato não sofreu efeito significativo ($P>0,05$) com a adição da uréia no meio ruminal, apresentando média de 3,5 mM de acetato para cada mM de propionato. A produção total de AGVs, apresentou efeito quadrático ($P<0,05$) com ponto máximo da concentração do nitrogênio amoniacal ruminal de 14,5 mg/dL no meio. Diferente dos resultados encontrado por Mehrez et al. (1977), que preconizaram valores de 23 mg/dL de líquido ruminal para máxima de fermentação em ovinos. No presente trabalho, pode-se observar que os valores para uma máxima fermentação são inferiores ao recomendado por estes autores.

Não foram observados efeitos da uréia sobre o pH do líquido ruminal no tempo experimental de 0 hora ($P<0,05$), sendo que o pH, neste tempo, obteve media geral de 6,83 (Tabela 4). Depois de 48 horas de incubação os valores para pH apresentaram comportamento linear decrescente ($P<0,05$), na medida que acrescentava-se uréia ao meio ruminal de incubação, com valores que variam de 7,64 a 7,33. Desta forma todos os valores observados ficaram acima do mínimo recomendado para a atividade de enzimas fibrolítica, que é de 6,0 (MOULD et al., 1983; CYSNEIROS et al., 2013).

Tabela 4 - Efeito de níveis de nitrogênio amoniacal sobre o pH do meio as 0 e 48 horas de incubação *in vitro*

	Níveis Nitrogênio amoniacal, mg/dl						CV(%) ¹	R ²	p-value	
Parâmetro	0	5	10	15	20	30			L	Q
pH										
0 horas	6,80	6,83	6,86	6,87	6,83	6,83	0,74	0,56	ns	ns
48 horas ²	7,64	7,55	7,53	7,48	7,44	7,33	0,48	0,96	0,001	ns

¹ Coeficiente de Variação; ² $\hat{Y} = 7,63 - 0,009X$.

Possivelmente, a rápida hidrólise da uréia associada aos elevados valores de pH encontrado no presente trabalho (Tabela 4), foram as responsáveis pelos altos valores de nitrogênio amoniacal ruminal. Quanto maior for o pH ruminal e a quantidade de uréia na dieta, maior será a concentração de N-NH_3 no rúmen, devido a uma maior atividade ureolítica pela elevação do pH ruminal em decorrência rápida ação da uréase, acelerando a hidrólise da uréia (FROSLIE, 1977). Segundo Mahadevan et al. (1976), o pH ideal para a máxima atividade da enzima uréase ocorre entre 7,0 a 8,5, corroborando com os dados de N-NH_3 no tempo de 48 horas, que obteve as maiores concentrações no decorrer das 96 horas de incubação (Figura 1) coincidindo com valores de pH acima de 7,0 (Tabela 4).

Entretanto, pode-se atribuir uma maior degradabilidade da FDN à aderência e colonização do que à atividade específica de enzimas bacterianas. Assim como Farenzena et al. (2013), Rasmussen et al. (1989), não observaram efeitos da mudança do pH entre 6,0 e 8,0 sobre a aderência bacteriana, o que pode indicar que valores de pH ligeiramente superiores a 7,0 podem favorecer a degradabilidade da FDN. Ainda de acordo com De Veth e Kolver (2001), a degradação da FDN reduz quando o pH ruminal permanece por quatro horas em valores abaixo de 6,0 e a síntese microbiana reduz quando o pH permanece 12 horas abaixo desse valor. No presente estudo, em nenhuma dos tempos experimentais, foi verificado pH abaixo de 6,0, mantendo-se na faixa considerada adequada para atuação dos microrganismos ruminais celulolíticos (MOULD et al., 1983; RUSSELL et al. 1992).

Foram observadas nas estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd (Tabela 5) indeterminação matemática entre os parâmetros c e p , que tendem à mesma estimativa conforme Equação I. Neste caso, não foi observado diferenciação entre os dois parâmetros estudados, sendo impreterível a re-parametrização do modelo proposto (Van MILGEN et al., 1991) com a adoção de taxa conjunta de latência e degradação, λ (Equação II). De acordo com Costa et al. (2008) não é possível obter comparações biológicas aplicando diretamente os parâmetros c e λ , sendo este último, convertido à forma c' (Equação III), o que permite observar um maior valor relativo da taxa de degradação.

O uso do nitrogênio não proteico (NNP) aumentou de 2,5 a 20,1% a taxa de degradação da FDNpd em comparação ao tratamento sem adição de NNP. O tratamento

com adição de 15,0mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal apresentou a maior taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ . Segundo Detmann et al. (2011), a melhoria na degradação da FDN, se deve pela adição de compostos nitrogenados à dieta, favorecendo os microrganismos presentes no ambiente ruminal à serem capazes de fazer uso desses compostos para sintetizar complexos enzimáticos, justificando assim o incremento nas taxas de FDNpd. Tal aspecto pode ser verificado observando a latência discreta (Tabela 5), onde ocorreu uma diminuição no tempo para início da degradação efetiva da FDN no tratamento de 15,0 mg/dL de nitrogênio amoniacal.

Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDN potencialmente degradável e desvios-padrão assintóticos (DPA) em função dos tratamentos.

Parâmetro ¹	Níveis de Nitrogênio amoniacal					
	0 mg/dL	5 mg/dL	10 mg/dL	15 mg/dL	20 mg/dL	30 mg/dL
λ (h ⁻¹)	0,1247	0,1278	0,1372	0,1497	0,1424	0,1290
c' (h ⁻¹) ¹	0,0743	0,0762	0,0818	0,0892	0,0849	0,0769
VRTD(%) ²	100	102,5	110,1	120,1	114,3	103,5
L (h)	13,78	13,44	12,52	11,47	12,06	13,32
DPA	7,41	8,07	8,25	8,69	9,06	8,65

c' = taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ ; VRTD = valor relativo da taxa de degradação; L = latência discreta (L).¹Estimado segundo propriedades da distribuição gama-2: c' = 0,59635 λ . ²Valor relativo da taxa de degradação em relação à forragem (0 mg/dL).

Com relação a concentração de 30,0 mg/dL de nitrogênio amoniacal, foi observado uma menor degradação da FDNpd e um aumento da latência nesses tratamentos quando comparados ao tratamento de 15,0 e 20 mg/dL. A menor degradação da FDNpd nas concentrações de 30,0 mg/dL de nitrogênio amoniacal se deve ao excesso de amônia no meio que inibiu o crescimento microbiano como observado na Tabela 2 e Figura 1.

Possivelmente, a presença de uma fonte de carboidratos de rápida degradação como, por exemplo, o amido e a pectina, no meio incubado, possa melhorar a utilização da amônia fornecida, diminuindo o excesso da mesma no meio. Segundo Detmann et al. (2005), altos níveis de inclusão de uréia, favorecem a formação de amônia no rúmen e

com níveis reduzidos de energia de rápida disponibilidade ruminal, pode ocorrer um baixo rendimento na proteína microbiana e, conseqüentemente, na degradação da FDN, uma vez que, essa energia de rápida fermentação reduz o pH, conservando a molécula na forma de amônio, o que diminui as perdas de amônia. Portanto, a queda no pH ruminal, com o fornecimento de carboidrato de rápida degradação, favorece a ionização da amônia acarretando menos perdas.

Mesmo com níveis mais elevados de nitrogênio amoniacal ruminal no meio incubado, não foi constatado taxas mais elevadas da degradação da FDN, uma vez que os resultados da literatura divergem muito quanto ao nível que otimiza a fermentação da fibra no rúmen.

Entretanto, a melhoria na taxa de degradação da FDNpd em virtude da adição de compostos nitrogenados confirma a necessidade no fornecimento de fontes de NNP em situações onde a dieta basal é, prioritariamente, forragem de baixa teor protéico como o capim-buffel em estágio de maturidade avançado. Nessa situação, para a obtenção de energia a partir da degradação microbiana dos carboidratos fibrosos são necessários fontes de compostos nitrogenados para a síntese dos complexos enzimáticos dos microrganismos ruminais (DETMANN et al., 2009; LAZZARINI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2009) e síntese de proteína microbiana.

Gradativamente ocorreu uma redução na latência discreta com o aumento da concentração de amônia no meio até 30 mg/dL. A menor estimativa da latência discreta foi observado no tratamento com 15mg/dL de amônia no líquido ruminal. A latência discreta é um parâmetro que tem a finalidade de estimar o tempo necessário para que os eventos preparatórios às atividades de degradação, como hidratação da partícula, aderência ao substrato, colonização e formação de biofilmes para produção de enzimas. Desta forma, a redução na latência confirma que o meio se torna mais propício à multiplicação celular microbiana com a inclusão de compostos nitrogenados (DETMANN et al., 2009).

Na Tabela 6 estão descritos os parâmetros relacionados ao crescimento microbiano sobre a FDN. A adição de fonte de NNP elevou em 2,6 a 20,1% a taxa de crescimento específico de microrganismos e em 5% a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd no tratamento com 15mg/dL de nitrogênio amoniacal. Isso representa 293,33g de MS microbiana/kg de carboidrato degradado em relação a 0

mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal que apresentou 278,42g de MS microbiana/kg de carboidrato degradado.

Apesar da discreta melhora de crescimento microbiano, os resultados descritos no presente trabalho encontram-se acima aos resultados relatados por Costa et al. (2008) e Detmann et al. (2011) que estudaram diferentes fontes de compostos nitrogenados na degradação da FDN, o que pode indicar uma maior disponibilidade enzimática para a degradação da fibra basal nas diferentes concentrações estudadas. Satter e Roffler (1979) afirmam que a concentração mínima de nitrogênio amoniacal ruminal deve ser por volta de 5 mg/dL de líquido ruminal para não ocorrer uma deficiência na fermentação microbiana, valor este que foi atingindo em todos os níveis, inclusive quando se tinha exclusivamente feno de Buffel. Enquanto que para se atingir o máximo de síntese microbiana, Mehrez et al. (1977) preconizaram a concentração de 23 mg/dL. No presente estudo a máxima eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd, foi alcançado com 15 mg/dL de líquido ruminal. Tal diferença pode ser explicado pelas diferentes espécies utilizadas nos estudos, ovinos tem a flora microbiana mais adaptada para degradação da fibra, resultando em um maior aproveitamento da amônia para síntese microbiana (HENDERSON et al., 2015).

Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a FDN potencialmente degradável em função dos tratamentos.

Parâmetro	Níveis de Nitrogênio amoniacal					
	0 mg/dL	5 mg/dL	10 mg/dL	15 mg/dL	20 mg/dL	30 mg/dL
μ^1	2,29	2,35	2,58	2,92	2,68	2,37
Sgr	0,0458	0,0470	0,0504	0,0550	0,0524	0,0474
EFM	278,42	280,59	286,36	293,33	289,35	281,30

¹ μ = máxima taxa de degradação (h^{-1}); Sgr = taxa de crescimento específico de microrganismos (h^{-1}); EFM = eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd (g MS microbiana/kg de carboidrato degradado).

Segundo Lazzarini et al. (2009), um ruminante deve receber no mínimo de 7% de PB na dieta basal, sendo este o mínimo necessário para que os microrganismos ruminais possam utilizar os substratos fibrosos potencialmente degradáveis em forragens tropicais de baixa qualidade. Tal afirmativa não corrobora com o incremento na fração

de FDNpd efetivamente degradada obtida no presente trabalho, uma vez que, o mínimo de compostos nitrogenados foi parcialmente suprido pelo tratamento que continha apenas forragem com 4,98% de PB (Tabela 1). Tal atendimento de nitrogênio pode ser atribuído as forragens conservadas na forma de feno, que apresentam entre 15 a 25% de nitrogênio não proteico, o que foi responsável pela garantia de níveis mínimos de nitrogênio amoniacal para população bacteriana no tratamento 0 mg/dL. Entretanto, o crescimento microbiano e o tempo necessário para iniciar a degradação da fibra (latência discreta) foram bem inferiores para os tratamentos com a presença de uréia no meio. Considerando que o rúmen é um sistema aberto com entrada e saída de substâncias constantemente, a menor velocidade de colonização e degradação da fibra na ausência de fontes de nitrogênio, além do próprio capim-buffel, pode inibir a digestão da fibra no animal.

A carência de compostos nitrogenados em dietas pode ocasionar efeitos deletérios em relação ao desempenho animal quando estes compostos não suprem os requerimentos microbianos, pode comprometer não somente a velocidade de utilização, mas impor limitações na extensão de degradação da FDN, assim como, ocorre também uma deficiência na proliferação celular e na própria atividade dos microrganismos com consequente redução no aproveitamento da fibra, o que resulta em diminuição no consumo de matéria seca e, consequentemente, em um baixo desempenho animal (DETMANN et al., 2009; FIGUEIRAS et al., 2010).

Pode-se observar na Tabela 7, que as maiores frações efetivamente degradadas foram constatadas no tratamento com 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal nas diferentes taxas de passagens estudadas. Este tratamento foi 11,1% mais eficiente quando comparado com o tratamento sem adição de uréia e considerando uma taxa de passagem de $0,020\text{ h}^{-1}$, na qual foi observado maior porcentagem de degradação da FDNpd. Em valores absolutos das estimativas da fração efetivamente degradada da FDNpd, o tratamento com 15mg/dL de nitrogênio amoniacal ruminal, apresentou os maiores valores para as diferentes taxas de passagem. Tais resultados seguem os padrões das demais variáveis estudadas, já que se trata de um parâmetro derivado da taxa de degradação da FDNpd.

Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função dos diferentes tratamentos.

Tratamento	Taxa de passagem ruminal (h ⁻¹) ¹		
	0,020	0,035	0,050
0 mg/dL	37,11	30,47	25,46
5 mg/dL	37,45	30,87	25,88
10 mg/dL	38,90	32,41	27,43
15 mg/dL	41,23	34,80	29,77
20 mg/dL	39,32	32,95	28,01
30 mg/dL	37,43	30,90	25,94

¹ Assumindo-se cinética de deslocamento ruminal de sólidos com ordem gama-1.

Foi constatado que a adição de uma fonte de NNP, como a uréia elevou linearmente ($P < 0,05$) a disponibilidade de nitrogênio amoniacal no meio de incubação (Tabela 5). Os valores médios observados de nitrogênio amoniacal ruminal em todos os tratamentos encontram-se acima do nível mínimo de 4 a 5 mg/dL recomendado por Satter e Slyter (1974) e também acima do recomendado por Van Soest (1994), que preconiza valores por volta de 10 mg/dL. Exceto o tratamento com 0 mg/dL de nitrogênio amoniacal obteve valor adequado para o crescimento microbiano sobre carboidratos fibrosos e degradação da FDN. No presente estudo, concentração de 30 mg/dL de nitrogênio amoniacal está acima dos valores ótimos. A degradação da FDN, ao término do ensaio de incubação, demonstrou efeito quadrático com ponto de máxima degradação da FDN, pela derivação da equação, em torno de 17,76 mg/dL (Figura 2).

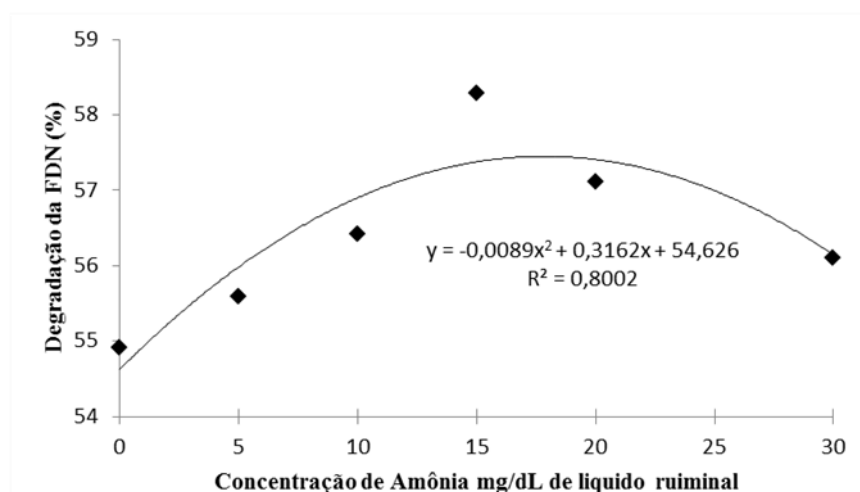


Figura 2- Degradação da FDN (%) em relação aos níveis experimentais de nitrogênio amoniacal

Segundo Detmann et al. (2011), em experimentos *in vitro*, os mecanismos de reciclagem de nitrogênio amoniacal não estão presentes como acontece no ambiente ruminal *in vivo*. Assim, os resultados advindos de experimentos *in vitro* podem proporcionar valores menores ou maiores de nitrogênio amoniacal para otimização da digestão de forragens de baixo teor protéico e alto teor de FDN do que no animal. Entretanto, o comportamento dos microrganismos ruminais, tendem a ser semelhantes *in vitro* como *in vivo* (GONÇALVES et al., 2001), o que possibilita inferir que a presença de nitrogênio não protéico, na forma de amônia, estimula o crescimento de microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos e por conseguinte, aumenta a digestão ruminal da FDN.

CONCLUSÕES

O fornecimento da uréia melhora a dinâmica de degradação da fibra em detergente neutro do capim-buffel diferido, aumentando as concentrações de acetato e propionato. O nível ótimo de nitrogênio amoniacal é de 17,76 mg/dL para uma máxima degradação da FDN de capim-buffel diferido *in vitro*, por microrganismos ruminais de caprinos e de 16,4 e 15 mg/dL respectivamente para acetato e propionato. Possivelmente, a adição de uma fonte de carboidrato de rápida degradação melhoraria otimizaria a utilização da amônia gerada pela adição da uréia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARELOVICH, H. M.; OWENS, F. N.; HORN, G. W.; Vizcarra, J. A. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. **Journal of Animal Science**, v.78, n.11, p.2972-2979, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 19th.ed., Gaithersburg, MD, USA, 2610p, 2012.

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.

BEZERRA, H. F. C.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, J. S.; PINHO, R. M. A.; PERAZZO, A. F.; SILVA, A. P. G.; RAMOS, J. P. F.; PEREIRA, G. A. Fenos de capim-buffel amonizados com uréia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.3, p.561-569, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CABRAL, J. E. S. **Fracionamento do nitrogênio e dos carboidratos de plantas encontradas na caatinga no Rio Grande do Norte**. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 55 p. 2014.

CAMPOS, P.R.S.S.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I.; SOUZA, S.M.; LUCCHI, B.B.; VALADARES, R.F.D. Estudo comparativo da cinética de degradação ruminal de forragens tropicais em bovinos e ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p. 1181-1191, 2006.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M. F.; HENRIQUES, L. T.; MANTOVANI, H. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.494-503, 2008.

CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p. 426-435, 2013.

DANLEY, M.M.; VETTER, R.L. Change in carbohydrate and nitrogen fraction and digestibility of forages: maturity and ensiling. **Journal of Animal Science**, v.37, n.4, p.994-999, 1973.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SAMPAIO, C. B.; SOUZA, M. A.; LAZZARINI, I.; DETMANN, K. S. C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using *Michaelis–Menten* kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136–146, 2009.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; ZERVOUDAKIS, J. T.; CABRAL, L. S.; GONÇALVES, L. C.; 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 dos compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1380-1391, 2005

DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; ZORZI, K.; MANTOVANI, H. C.; BAYÃO, G. F. V.; GOMES, M. P. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1272-1279, 2011.

De VETH, M.J.; KOLVER, E.S. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2066-2207, 2001.

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**. Madison: American Society of Agronomy, p.682-756. 1994.

FARENZENA, R.; KOZLOSKI, G. V.; MEZZOMO, M. P.; FLUCK, A. C. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity *in vitro*: Effect of pH or glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, v.152, n.02, p. 325-332, 2013.

FIGUEIRAS, J.F.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALENTE, T.N.P.; VALADARES FILHO, S.C.; LAZZARINI, I. Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1303-1312, 2010.

FRIBOURG, H.A. **Summer anual grasses**. In: HEATH, M.E.; BARNES, R.F.; METCALFE, D.S. (Eds.). Forages: the science of grassland agriculture. 4.ed. Ames : Iowa State University, 643p. 1985.

FROSLIE, A. Feed-related urea poisoning in ruminants. **Folia Veterinary Latina**, v.7, n.1, p. 17-37, 1977.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; RODRIGUES, M. T.; VIEIRA, R. A. M.; QUEIROZ, A. C.; HENRIQUE, D. S. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da fibra em detergente neutro de alguns volumosos utilizados na alimentação de cabras leiteiras, submetidas a dietas com diferentes relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p. 1893-1903, 2001.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P. H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v.5, p. 1-15, 2015.

IMAIZUMI, H.; SANTOS, F. A. P.; PIRES, A. V.; NUSSIO, C. M. B.; BARNABÉ, É. C.; JUCHEM, S. O. Avaliação de diferentes fontes e teores de proteína na dieta sobre o desempenho, fermentação ruminal e parâmetros sanguíneos de vacas da raça Holandesa em final de lactação. **Acta Scientiarum**, v.24, n.4, p.1031-1037, 2002.

LANA, R. P.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, J. S.; VELOSO, R.G.; NUNES, P. M. M.; QUEIROZ, A.C. Parâmetros da degradação protéica ruminal de diferentes

alimentos e rações estimados por técnica *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.414-422, 2007.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; AMBURGH, M. E. V. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.

LAZZARINI, I., DETMANN, E., SAMPAIO, C.B., PAULINO, M.F., VALADARES FILHO, S.C., SOUZA, M.A. AND OLIVEIRA, F.A. Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, 635–647. 2009.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, n. 1, p. 277-303, 1990.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.

MAHADEVAN, S.; SAUER, F.; ERFLE, J.D. Studies on bovine rumen bacterial urease. **Journal Animal Science**, v.42, n.3, p.745-753, 1976.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal Nutrition**, v.38, n.3, p. 437-443, 1977.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, G. C. Potencial de produção de Capim-buffel na época seca no semi-árido pernambucano. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p. 20-27, 2007.

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.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements of feed in weighted according to rate passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.

PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proceedings of **Royal Society**, Series B, v.163, p.224-231, 1965.

RASMUSSEN, M. A.; WHITE, B. A.; HESPELL, R. B. Improved assay for quantitating adherence of ruminal bacteria to cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2089-2091, 1989.

RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen micorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1329-1338, 1984.

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.

SANTOS, G. R. A.; GUIM, A.; SANTOS, M. V.; FERREIRA, M. A.; LIRA, M. A.; DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; SILVA, M. J. Caracterização do pasto de Capim-buffel diferido e da dieta de bovinos, durante o período seco no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.454-463, 2005

SAMPAIO, C. B.; DETMANN. E.; LAZZARINI, I.; SOUZA, M. A.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 03, p. 560-569, 2009.

SATTER, L.D.; ROFFLER, R.E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.8, p. 1212-1237, 1979.

SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 32, n. 2, p.199-208, 1974.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**.v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

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. Development of a comprehensive system of feeds analysis and its applications to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press. 476p. 1994.

VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephantgrass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.

CAPÍTULO 3

SUBSTITUIÇÃO DO NITROGÊNIO NÃO PROTEICO POR PROTEÍNA VERDADEIRA SOBRE A DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DOS CARBOIDRATOS FIBROSOS DE CAPIM-BUFFEL

Substituição do nitrogênio não proteico por proteína verdadeira sobre a degradação *in vitro* dos carboidratos fibrosos de capim-buffel

Resumo – O presente estudo teve com objetivo avaliar o efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados no aproveitamento da fibra em detergente neutro (FDN) *in vitro*. O experimento consistiu de cinco níveis de substituição da uréia pela caseína, em 0; 25; 50; 75 e 100%. Os efeitos dos níveis foram avaliados por incubação *in vitro* em diferentes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de FDN e interpretados pelo modelo logístico não-linear. A substituição da uréia pela caseína em até 50% elevou em 17,42% a taxa de degradação da FDN potencialmente degradável (FDN_{pd}) em comparação ao tratamento sem substituição. A taxa de degradação da FDN_{pd} decresceu nos tratamentos com 75 e 100% de substituição em 6,53 e 13,57%, respectivamente, em relação ao tratamento com 0% de substituição. O tratamento com 50% de substituição obteve uma redução na estimativa de latência discreta de 1,31 horas em comparação ao tratamento com 0% de substituição e uma redução de 2,7 horas em comparação ao tratamento com 100% de substituição. A substituição em até 50% de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira proporcionou um crescimento microbiano em torno de 16,1% mais eficiente. A substituição da uréia pela caseína não afetou ($P>0,05$) as concentrações de acetato e propionato. A maior concentração de AGVs Totais foi observada no tratamento com 50% de substituição. A utilização de 50% de nitrogênio não proteico e 50% de proteína verdadeira, como fonte de nitrogênio, para microrganismos ruminais, otimiza a degradação da fibra em detergente neutro do capim-buffel com baixo teor protéico e o crescimento microbiano *in vitro*.

Palavras-chave: amônia, caseína, FDN, rúmen, uréia

Effect of substitution of non-protein nitrogen by true protein on the degradation of the fibrous carbohydrates of Buffel Grass *in vitro*

Abstract - The objective of this study was to evaluate the effect of different sources of nitrogen compounds on the use of neutral detergent fiber (NDF) *in vitro*. The experiment consisted of 5 levels of substitution of urea by casein, in 0; 25; 50; 75 and 100%. The levels were evaluated by *in vitro* incubation at different times: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours. The experiment was done in a completely randomized design with 5 treatments with three replicates. Incubation residues were evaluated for NDF content and interpreted by the nonlinear logistic model. Replacement of urea by casein by up to 50% increased the rate of degradation of potentially degradable NDF) by 17.42% compared to treatment without substitution. The rate of degradation of the FDNpd decreased in treatments with 75 and 100% substitution in 6.53 and 13.57% respectively. The 50% replacement treatment obtained a reduction in the discrete latency estimate of 1.31 hours compared to the 0% replacement treatment and a 2.7 hour reduction compared to the 100% replacement treatment. Replacement by up to 50% of non-protein nitrogen by true protein gave a microbial growth around 16.1% more efficient. Replacement of urea by casein did not affect ($P > 0.05$) acetate and propionate concentrations. The highest concentration of total VFAs was observed in the treatment with 50% substitution. The use of 50% of non-protein nitrogen and 50% of true protein as a nitrogen source for ruminal microorganisms optimizes the neutral detergent fiber degradation of low-protein buffelgrass and *in vitro* microbial growth.

Key words: ammonia, casein, NDF, rumen, urea

INTRODUÇÃO

As gramíneas tropicais apresentam uma boa produção de matéria seca ao longo do ano, no entanto, em alguns períodos, como na época seca, existe uma tendência para aumento no teor de fibra e uma redução no teor de proteína, resultando em uma menor digestibilidade e qualidade nutricional destas forrageiras (ARRUDA et al., 2010). O capim-buffel (*Cenchrus ciliaries*) é uma gramínea adaptada ao nordeste brasileiro, apresentando potencial para sistemas pecuários na região, por se apresentar bastante resistente à seca, porém, no período seco e com o rápido desenvolvimento fenológico da espécie, torna o seu valor protéico é baixo, com teores de proteína bruta (PB) próxima a 3% (SANTOS et al., 2005) e elevados teores de fibra em detergente neutro (FDN), alcançando facilmente valores superiores a 70% com base na matéria seca (BARROS, 2010).

O uso de nitrogênio não proteico (NNP) quando superior a 27 % da PB total da dieta, tem proporcionado desempenho satisfatório em ruminantes (MALLMANN et al., 2006). Para que ocorra a multiplicação celular, a flora microbiana tem exigência de peptídeos, aminoácidos e amônia que são hidrolisados a partir de uma fonte de proteína verdadeira ou nitrogênio não protéico. Experimentalmente, tem sido observado um aumento no crescimento microbiano sobre a FDN quando há uma interação entre uréia e caseína (DETMANN et al., 2011), promovendo uma possível melhora da utilização da fração fibrosa.

Neste contexto, visando a melhoria no aproveitamento das frações fibrosas do capim-buffel no período seco do ano, é de fundamental importância observar os efeitos de diferentes fontes de compostos nitrogenados sobre o crescimento microbiano e digestão dos carboidratos fibrosos deste capim *in vitro*.

Objetivou-se avaliar o efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados no aproveitamento da fibra em detergente neutro (FDN) *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio *in vitro* foi realizado no Laboratório do Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia pertencente à Universidade Federal de Paraíba (UFPB),

Centro de Ciências Agrárias, no município de Areia/PB. Foi utilizado um caprino fistulado no rúmen como doador de líquido ruminal, que foi alimentado exclusivamente com capim-elefante por sete dias consecutivos, antes da realização da coleta do líquido ruminal, para diminuir a concentração de compostos nitrogenados no líquido ruminal.

O trabalho foi executado obedecendo às normas técnicas de biossegurança e ética, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (protocolo: 0209/14).

O capim-buffel (*Cenchrus Ciliaries*), foi coletado de uma pastagem deferida, onde a gramínea apresentava-se em um estado fenológico avançado e após a coleta foi seco sob ventilação forçada (60° C), foi processado em moinho de facas com peneiras de 2 mm para uso nas incubações e processadas em moinho de facas com peneiras de 1 mm para quantificar os teores de matéria seca (MS) (método 930.15), proteína bruta (PB) (método 968.06), extrato etéreo (EE) (954.05), matéria mineral (MM) (método 942.05), de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2012). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram estimados por metodologia de Van Soest (1967) e expressos na forma corrigida para cinzas e compostos nitrogenados e o teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro em relação ao nitrogênio total (NIDN/NT) segundo os procedimentos de Licitra et al., (1996). Os valores de carboidratos totais (CHOT) foram obtidos pela equação CHOT (%) = 100 - (%PB + %EE + %MM), e os carboidratos não fibrosos (CNF) = 100 - (%PB + %FDN_{ncp} + %MM + %EE), onde FDN_{ncp} é o FDN livre de cinzas e proteínas como descrito por Sniffen et al. (1992). (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição bromatológica do Capim-buffel, da uréia e da caseína.

Item	Forragem	Uréia	Caseína
Matéria seca (g/kg)	854,4	982,1	900,0
Matéria orgânica (g/kg MS)	905,2	997,6	972,4
Cinzas (g/kg MS)	94,8	2,4	27,6
Proteína Bruta (g/kg MS)	49,8	2610,0	889,7
Extrato Etéreo (g/kg MS)	16,6	-	3,2
Carboidratos Totais (g/kg MS)	838,8	-	-

¹ FDN (g/kg MS)	857,0	-	-
² FDNcp (g/kg MS)	799,7	-	-
³ FDA (g/kg MS)	348,1	-	-
⁴ CNF (g/kg MS)	39,1	-	-
⁵ NT (g/kg MS)	8,0	-	-
⁶ NIDN (g/kg MS)	195,6	-	-
Lignina (g/kg MS)	76,6	-	-

¹Fibra em Detergente Neutro; ²FDN livre de cinzas e proteínas; ³Fibra em Detergente Ácido; ⁴Carboidratos não Fibrosos; ⁵Nitrogênio Total; ⁶Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro.

Foi coletado líquido ruminal do caprino, três horas após o arração, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa. No laboratório, o líquido foi saturado com dióxido de carbono (CO₂), colocado em repouso a 39°C e após formação das interfaces do líquido procedeu a retirada do líquido intermediário que foi centrifugado a 500 x G por 10 minutos e o sobrenadante descartado para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (RUSSELL e MARTIN, 1984). O resíduo da centrifugação (pellet), foi re-suspenso mais duas vezes em tampão de McDougall (9,80g de NaHCO₃; 4,65g de Na₂HPO₄*2H₂O; 0,57g de KCl; 0,12g de MgSO₄*7H₂O e 0,04g de CaCl₂, diluídos com água destilada até o volume de 1000ml) autoclavado.

O experimento foi constituído de cinco diferentes níveis de substituição de nitrogênio não proteico (uréia) por proteína verdadeira (caseína), tendo como base a quantidade de uréia utilizada para alcançar as concentrações de nitrogênio que otimizou a digestão da FDN do capim-buffel em pesquisa anterior. Foi utilizado 9,58 mg de uréia para chegar as concentrações de 17,76 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, sendo este, o tratamento com 100% de nitrogênio não proteico. A uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio não proteico e a caseína P.A. (DINÂMICA QUÍMICA CONTEMPORÂNEA) foi utilizado como fonte de proteína verdadeira. A partir da definição da concentração de nitrogênio amoniacal, os níveis experimentais foram construídos a partir da substituição fracional da uréia (NNP) por caseína.

Cada tratamento teve três repetições por tempo, em que foi determinado a digestibilidade *in vitro* e parâmetros de crescimento microbiano e foram incluídos nas incubações três frascos sem inóculo, que serviram de branco para a digestibilidade. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos

e três repetições. Os tratamentos tiveram as seguintes proporções de fontes de nitrogênio: 100% de nitrogênio advindo de uréia (9,59 mg) e 0% de caseína (0 mg); 75% de uréia (7,20 mg) e 25% de caseína (2,39 mg); 50% uréia (4,80 mg) e 50% de caseína (4,80 mg); 25% de uréia (2,39 mg) e 75% de caseína (7,20 mg); 0% de uréia (0 mg) e 100% de caseína (9,59 mg).

Foram utilizados em cada frasco de incubação, além das fontes de nitrogênio, 35 ml do meio de cultura (28 ml de tampão de McDougall e 7 ml de inóculo), 350 mg de capim-buffel, ou apenas 35 ml do meio de cultura (branco).

Cada frasco foi então saturado com CO₂, tampado e lacrado. Os frascos foram incubados a 39 °C, em estufa oncubadora de BOD durante 96 horas. Durante a incubação foram retirados de todos os frascos, os gases produzidos através de seringas a cada 3 horas. Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da estufa incubadora de BOD e o resíduo filtrado para determinação da degradabilidade da FDN. Foi retirado de cada unidade experimental 2,0 ml de amostra do meio de cultura, que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a 5200 x g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análise posterior da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). O pelete foi resuspenso em solução de NaCl (0,9% p/v), centrifugado a 5200 x G, por 10 minutos, descartado o sobrenadante e resuspenso novamente em solução de NaCl (0,9% p/v), em seguida foi congelado para posterior determinação de proteína microbiana. A concentração de amônia foi determinada através do método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962) e proteína microbiana pelo método de Bradford (1976).

Para análise dos ácidos graxos voláteis (AGV), foi retirado de todas as unidades experimentais, no tempo de 48 horas de incubação, 2,0 ml de amostra do meio de cultura que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a 5200 x g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análises de ácidos graxos voláteis (AGV), em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) utilizando-se um comprimento de ondas: 210 nm. Utilizando uma coluna C18 marca SHIMADZU com 30 cm x 7.9 mm de diâmetro, com fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto.

Sobre uma pressão de 69 kgf, sendo a fase móvel água em 1% de ácido orto fosfórico e o volume injetado 20 ul. Foram analisadas as concentrações dos ácidos graxos voláteis acetato, propionato e butirato, bem como a relação acetato/propionato, AGVs totais e a concentração de lactato.

Foram incubados também frascos considerados branco, contendo as soluções de incubação sem substrato, para o ajuste das variações existentes. Os frascos foram fechados utilizando-se rolhas de borracha e em seguida agitados para homogeneização das amostras.

Na determinação da degradabilidade da FDN foi retirado, para cada período de análise, o material residual de cada frasco, lavado com água quente em cadinho filtrante até a retirada do meio de cultura. Este resíduo foi seco em estufa ventilada e, após 24 horas, foi pesado em balança analítica. Deste resíduo foi determinado o teor de FDN pelo método de Van Soest (1967), que foi considerado parte indigestível do alimento.

Os resíduos da FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram analisados pelo algoritmo de Gauss-Newton e ajustamento ao modelo logístico não linear descrito por Van Milgen et al. (1991) e Detmann et al. (2011).

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

(I)

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

A função descrita em (I) é considerada simétrica em relação às taxas fracionais de degradação c e p , sendo frequentemente reconhecido que os menores valores estão associados a c (VIEIRA et al., 1997). Entretanto, quando as taxas fracionais c e p tendem à mesma estimativa, indeterminação matemática será observada e o modelo re-parametrizado segundo a regra de L'Hôspital (VAN MILGEN et al., 1991):

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

(II)

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h^{-1}). Nesta circunstância, devido o parâmetro λ descrever simultaneamente as taxas de latência e degradação, determinou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ utilizando as propriedades da distribuição gama-2 (ELLIS et al., 1994):

$$c' = 0,59635 \times \lambda$$

(III)

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

A latência discreta foi obtida segundo modelos de Vieira et al. (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(ti)}{\mu} + ti$$

(IV)

em que: L = latência discreta (h); $R(0)$ = resíduo de FDN não degradada em $t = 0$ (%); $R(ti)$ = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de degradação (%); μ = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h^{-1}); ti = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de ti foram calculados segundo as observações de Van Milgen et al. (1991) (Equações I e II, respectivamente):

$$ti = \frac{\ln(c) - \ln(p)}{(c - p)}$$

(V)

$$ti = \frac{1}{\lambda}$$

(VI)

A taxa específica de crescimento microbiano em relação a FDNpd foi calculada segundo hipótese proposta por Beuvink e Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{\mu}{U}$$

(VII)

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1}). Com as estimativas de Sgr calculadas, estimou-se as eficiências de crescimento microbiano em relação a FDNpd, segundo teorias de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{S_{gr}} + \frac{1}{Y_m}$$

(VIII)

em que: Y = eficiência microbiana (g células × g⁻¹ carboidratos degradados); m = exigência para manutenção dos microrganismos (g carboidratos × g⁻¹ células × h⁻¹); e Y_m = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato (g células × g⁻¹ carboidratos degradados). O parâmetro Y_m foi adotado como referência com o valor de 0,4 g células × g⁻¹ carboidratos degradados e para m o valor de 0,05 g carboidratos g⁻¹ células × h⁻¹, conforme recomendações de Russell et al. (1992).

As frações efetivamente degradadas da FDN foram calculadas de acordo por Costa et al. (2008) em adequação a metodologia de Ørskov e McDonald (1979):

$$FED = \lim_{t \rightarrow \infty} \int_0^t \left[f(t) \times \left(-\frac{dRt}{dt} \right) \right] dt$$

(IX)

em que: FED = fração efetivamente degradada da FDN (%); f(t) = função relativa ao deslocamento de sólidos no ambiente ruminal. Para definição da função descrita em (IX), assumiu-se deslocamento ruminal de sólidos de ordem gama-1 (ELLIS et al., 1994), à qual foram alocado valores hipoteticamente, 0,020, 0,035 e 0,050.

Desta forma, calculou-se FED, no contexto das equações (X), respectivamente, por:

$$FED = U \times \frac{\lambda^2}{(\lambda + k)^2}$$

(X)

Os modelos foram ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes níveis de substituição e foram comparados de forma descritiva. Os valores de concentração de N-NH₃ e proteína microbiana obtidos nos tempos de 0 e 48 horas de incubação foram avaliados análise de variância e regressão e os critérios utilizados na escolha do modelo foi a significância dos coeficientes de regressão a 5% de probabilidade pelo teste Tukey e o coeficiente de determinação (r²), obtido pela relação entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados dos tratamentos e do fenômeno biológico.

Os dados de AGV e lactato foram submetidos à análise de variância e regressão. Os critérios para escolha de modelos de regressão foram a significância dos parâmetros

da regressão, valores do coeficiente de determinação e interpretação biológica das curvas de regressão. A análise estatística das variáveis foi realizada pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

O desvio padrão assintótico (DPA), foi calculado a partir da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo de cada modelo. Todas as análises estatísticas, tanto lineares, como não-lineares, foram realizadas por intermédio do programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios observados em relação amônia ruminal, no tempo de 48 horas de incubação (Tabela 2), em todos os tratamentos encontram-se acima do patamar mínimo de 4 a 5 mg/dL recomendado por Satter e Slyter (1974) para degradação da FDN e também acima do recomendado por Van Soest (1994), que preconiza valores por volta de 10 mg/dL, para um adequado crescimento microbiano sobre carboidratos e para os valores ótimos para degradação da FDN. No presente estudo, todos os tratamentos forneceram aporte suficiente de amônia para os microrganismos que degradam celulose e hemicelulose. Às 48 h de incubação os valores de amônia apresentaram comportamento linear decrescente ($P < 0,05$), variando de 26,0 a 19,25 mg/dL de amônia ruminal, respectivamente para os tratamentos 0 e 100% de substituição.

Tabela 2 – Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre a concentração de nitrogênio amoniacal e proteína microbiana as 0 e 48 horas de incubação *in vitro*

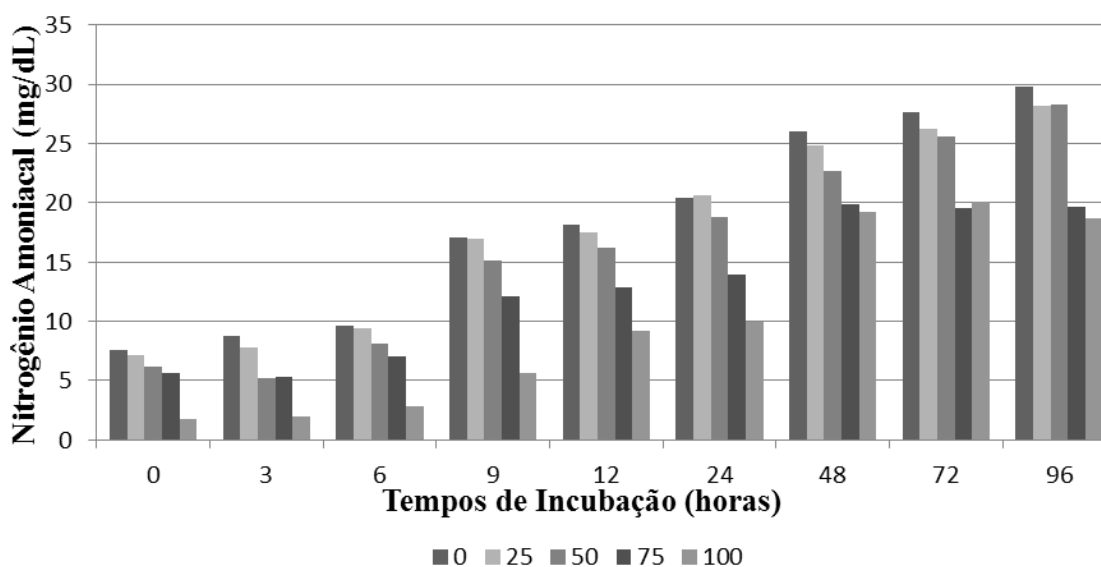
Parâmetro	% de substituição de NNP por PV					CV(%) ¹	R ²	<i>p-value</i>	
	0	25	50	75	100			L	Q
	N-NH ₃ , mg/dL								
0 horas ²	7,58	7,15	6,17	5,63	1,69	13,55	0,80	0,01	Ns
48 horas ³	26,0	24,80	22,64	19,91	19,25	17,34	0,97	0,02	Ns
Ptn microbiana, mg/L									
0 horas ⁴	161,33	162,00	162,05	163,03	161,33	31,51	-	ns	Ns
48 horas ⁵	463,33	536,01	622,66	494,65	442,54	10,76	0,79	ns	0,02

¹CV = coeficiente de variação, probabilidade significativa ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$ pelo teste Tukey); NS = não significativo; L = linear; Q = quadrático, R^2 = Coeficiente de determinação. ² $\hat{Y}=8,3+0,053X$; ³ $\hat{Y}= 26,20-0,073X$; ⁴ $\hat{Y}=161,9$; ⁵ $\hat{Y}= 462,11+4,97X-0,053X^2$.

Segundo Leng (1990), para gramíneas tropicais, de baixa qualidade são necessários 10 a 20 mg N-NH₃/dL para que se maximize a degradação ruminal. Esta concentração de N-NH₃ melhora a eficiência da síntese microbiana de 15 a 28%, independente da fonte de nitrogênio (KANJANAPRUTHIPONG e LENG, 1998). No presente estudo o tratamento com 100% de substituição do NNP obteve o maior tempo de incubação para alcançar o valor mínimo necessário de N-NH₃ para máxima degradação da FDN.

A concentração de 10 mg/dL de N-NH₃ foi atingindo com 24 horas de incubação, enquanto os demais proporções atingiram esta concentração mínima com 9 horas de incubação (Figura 1a). Isto refletiu no crescimento microbiano, que foi menor em todo o período de incubação, quando se tinha no meio nitrogênio advindo somente de proteína verdadeira (Figura 1b). Uma possível explicação seria pelo fato da uréia ser mais eficiente em efetuar maiores níveis de nitrogênio amoniacal em relação à caseína em circunstâncias de suplementação semelhante em termos proporcionais proteicos (ZORZI et al., 2009).

(a)



(b)

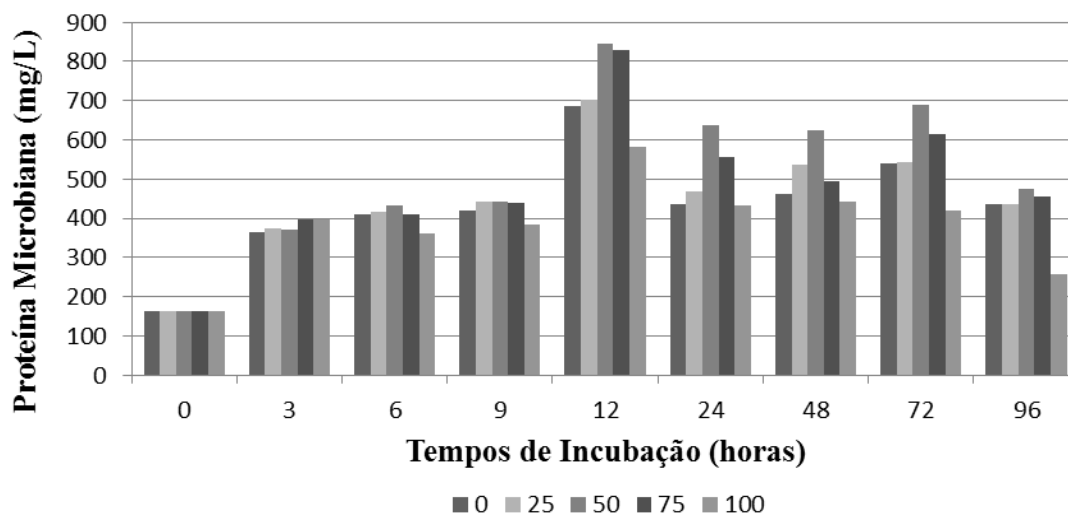


Figura 1- Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre a concentração de amônia (a) e proteína microbiana (b) ao longo de 96 horas de incubação in vitro.

Em relação à proteína microbiana no tempo de incubação de 0 hora, não foi observado diferença estatística entre os tratamentos ($P>0,05$), com média geral de 161,9 mg/L de proteína microbiana. Entretanto, no tempo de incubação de 48 horas foi observado ajuste dos tratamentos ao modelo quadrático ($P<0,05$) com ponto máximo para proteína microbiana de 46,88% de substituição do NNP por proteína verdadeira, pela derivação da equação de segundo grau.

Dietas formuladas com diferentes fontes de nitrogênio, que supram a necessidade de proteína degradável no rúmen, podem melhorar o aporte de nutrientes para os mais diferentes grupos de microrganismos ruminais, melhorando a eficiência e produção na síntese de proteína microbiana. Além disso, como pode-se observar na Figura 1, permite uma liberação mais sincronizada de fontes de nitrogênio para o crescimento microbiano. Visando determinar o efeito da quantidade e da fonte de compostos nitrogenados na eficiência da síntese de proteína microbiana, Bowen et al. (2016) utilizando gramínea tropical de baixa qualidade não encontraram diferença quanto a fonte utilizada (uréia ou caseína). Entretanto, estes mesmos autores encontraram diferença na quantidade utilizada de caseína, para maximizar a eficiência de síntese de proteína microbiana que foi, somente, aumentada quando foi fornecido um maior aporte de matéria orgânica digestível, e esta melhora foi associada com um aumento de quatro vezes na

concentração de N-NH₃, no líquido ruminal, em decorrência de uma maior degradação da proteína dietética. A presença de proteína verdadeira é importante na síntese de aminoácidos pelas bactérias celulolíticas, como fonte de ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (Bowen et al. 2016).

Não foram observados efeitos significativos na substituição ou no tempo de incubação ($P>0,05$) sobre o pH do meio (Tabela 3), obtendo valor médio de 7,15 para o tempo de incubação de 0 hora e 7,26 para o tempo de incubação de 48 horas. Todos os valores encontrados permaneceram acima dos limites mínimos para a atividade fibrolítica (STROBEL e RUSSELL, 1986; ORSKOV, 1988). Para Martins et al. (2006), valores de pH acima de 6,0 favorecem a manutenção do meio ruminal adequado para a aderência das bactérias celulolíticas às partículas, assim como todos os valores encontram-se acima do mínimo recomendado para a atividade de enzimas fibrolítica (CYSNEIROS et al., 2013). Rasmussen et al. (1989), não observaram efeitos da mudança do pH entre 6,0 e 8,0 sobre a aderência bacteriana, o que pode indicar que valores de pH ligeiramente superiores a 7,0 pode favorecer a degradabilidade da FDN.

Tabela 3 - Efeito da substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) sobre o pH do meio as 0 horas e 48 horas de incubação *in vitro*

Parâmetro	% de substituição de NNP por PV					CV(%) ¹	R ²	<i>p-value</i>	
	0	25	50	75	100			L	Q
	pH								
0 horas	7,10	7,14	7,17	7,16	7,19	1,94	-	ns	ns
48 horas	7,29	7,26	7,28	7,22	7,25	0,47	-	ns	ns

¹ Coeficiente de Variação;

Não foi observado efeito ($P>0,05$) para as concentrações ruminais de acetato, propionato, lactato e na relação acetato/propionato nas diferentes relações de substituição da uréia por caseína, com média de 51,5; 21,4; 0,45 e 2,46 mM, respectivamente. As porcentagens em proporção molar apresentadas para acetato e propionato foram de 68,8% e 28,2%, respectivamente, dentro da faixa de normalidade

apresentada por Silva e Leão (1979) conforme citado por Valadares Filho e Pina (2011), entre 54 e 74%, para o acetato, e 16 e 27%, para propionato.

Segundo Stradiotti Júnior et al. (2004), com a menor produção de amônia espera-se que ocorra aumento na produção de propionato, com conseqüente redução na relação acetato/propionato no rúmen, entretanto, no presente trabalho não foi observado tal efeito. Apesar das diferentes concentrações de N-NH₃ nos diferentes relações, o pH não sofreu alterações e sendo este determinante na proliferação de microrganismos celulolíticos (RUSSELL e WILSON, 1996), que são os principais produtores de acetato, acarretando uma uniformidade na fermentação do substrato utilizado independente da relação NNP e PV.

Tabela 4. Concentrações dos ácidos graxos voláteis e lactato em função à substituição de nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).

AGV ²	% de substituição de NNP por PV				
	0%	25%	50%	75%	100%
Acetato	51,6	51,8	53,5	50,4	50,2
Propionato	20,8	21,30	24,9	20,0	20,0
Butirato	0,87	0,94	1,56	1,61	2,05
Lactato	0,39	0,49	0,47	0,41	0,47
A/B ³	2,48	2,43	2,16	2,62	2,60
AGVs	73,27	74,04	79,96	72,01	72,20
Totais					
Parâmetro	Equação Regressão	CV (%)	L	Q	R ²
Acetato	$\hat{Y} = 51,5$	8,4	0.317	0.326	-
Propionato	$\hat{Y} = 21,4$	14,8	0.491	0.152	-
Butirato	$\hat{Y} = 0,81 + 0,01X$	24,2	0.001	0.88	0,90
Lactato	$\hat{Y} = 0,45$	23,6	0,707	0,500	-
A/B ³	$\hat{Y} = 2,46$	20,6	0,634	0,488	-
AGVs Totais	$\hat{Y} = 73,3 + 0,2X - 0,002X^2$	1,1	0,001	0,001	0,58

¹Níveis de substituição da uréia por caseína; ²Concentração de AGVs em milimolar (mM); ³Relação Acetato/Propionato.

As concentrações de butirato apresentaram comportamento linear crescente ($P < 0,05$) com a substituição da uréia pela caseína, variando de 0,87 mM a 2,05 mM, respectivamente para os tratamentos com 0 e 100% de substituição. Apesar, que o presente estudo, ter sido realizado em um sistema fechado e restrito (*in vitro*) e o rúmen ser um ambiente dinâmico, com passagem de sólidos e líquidos, e entrada de saliva e de alimentos. Os resultados corroboram com trabalhos *in vivo* (HELDT et al., 1999a; LAGUNA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015).

Isto porque, as bactérias que utilizam a rota do butirato para reoxidação do NADH_2 , geralmente apresentam apenas esta rota para produção de AGV, não tendo enzimas capazes de fazer outro mecanismo para produção de outro produto final (MOSS et al., 2000). Assim, provavelmente, as bactérias celulolíticas produtoras de butirato apresentam afinidade na utilização dos produtos da fermentação de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da degradação da proteína verdadeira, como por exemplo, AGV de cadeia ramificada.

Os resultados do presente estudo em relação à concentração de AGVs totais e as quantidades individuais de cada AGV, contradiz com o estudo realizado por Xin et al. (2010), que compararam dietas com diferentes fontes proteicas (proteína isolada da soja, uréia pecuária e uréia encapsulada) e não observaram diferenças na concentração de AGV totais entre os três tratamentos, mas as porcentagens molares dos AGV individuais foram significativamente alterados pelos tratamentos, em que dietas a base de uréia resultaram em uma maior proporção de acetato e menores de propionato em relação a dieta com farelo de soja, proporcionando um aumento na relação acetato/propionato.

Os níveis de N-NH_3 e o fornecimento de uma fonte de proteína verdadeira exercem influência direta na fermentação dos substratos presentes no rumen, uma vez que estes compostos servem para a síntese das bases nitrogenadas e como doadores de esqueletos de carbono, respectivamente, justificando um aumento na concentração de AGVs totais quando ocorre uma combinação destes compostos, na base de substituição de 50%.

A maior concentração de AGVs totais foi observada na substituição de 50% de de NNP com 80,57 mM de concentração. O fornecimento de proteína verdadeira, como a caseína, compondo uma parte da suplementação, demonstra ser importante tanto para

fermentação como para o crescimento microbiano, uma vez que os aminoácidos são fornecedores do esqueleto carbônico, quando degradados, e juntamente com amônia, gerada pela hidrólise da uréia, são utilizadas para a síntese de proteína microbiana (RIBEIRO et al., 2014). A suplementação com 50% de PV aumentou a degradação da fração fibrosa (FDNpd), que consequentemente promoveu uma maior concentração de AGV totais. Detmann et al. (2011), evidenciaram um incremento na degradação da fibra de 24% e 96% com o fornecimento de 1/3 de PV em comparação aos tratamentos com adição de uréia e sem adição de nenhum composto nitrogenado, respectivamente.

Segundo Kozloski (2011), o catabolismo dos aminoácidos e sua conversão aos ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutirato, isovalerato), são realizados por bactérias com alta atividade desaminativa, e são substratos essenciais para o crescimento das bactérias que degradam os carboidratos fibrosos, aumentando o potencial da fermentação da FDNpd, gerando uma maior concentração de AGVs, que são responsáveis por 70-80% da energia pelo ruminante.

A substituição do nitrogênio não proteico (uréia) por uma fonte de proteína verdadeira (caseína) elevou a taxa de degradação da FDNpd, até o nível de substituição de 50% em comparação ao tratamento sem substituição. O tratamento com 50% de substituição apresentou uma maior taxa fracional de degradação resultante da transformação do parâmetro λ , observando-se um aumento de 17,42% em comparação ao tratamento sem substituição. Foi observado, também, que a taxa de degradação da FDNpd decresceu nos tratamentos com 75 e 100% de substituição de NNP por PV, em 6,53 e 13,57%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da fibra em detergente neutro potencialmente degradável e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função das substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).

Parâmetro ¹	Níveis de Substituição				
	0%	25%	50%	75%	100%
U (%)	43,6	40,99	38,8	41,5	37,8
λ (h ⁻¹)	0,1955	0,2134	0,2295	0,1826	0,1689
c' (h ⁻¹) ²	0,1165	0,1272	0,1368	0,1089	0,1007

VRTD(%) ³	100	109,18	117,42	93,47	86,43
L (h)	8,79	8,05	7,48	9,41	10,18
DPA	9,60	9,01	8,61	9,25	9,87

U = fração potencialmente degradável da FDN (FDNpd); λ = taxa fracional comum de latência e degradação; c' = taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ ; VRTD = valor relativo da taxa de degradação; L = latência discreta (L).²Estimado segundo propriedades da distribuição gama-2: $c' = 0,59635\lambda$. ³Valor relativo da taxa de degradação em relação à forragem (0 mg/dl).

Segundo Franco et al. (2004), o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal favorece a proliferação de bactérias que degradam carboidratos fibrosos. A amônia é de fundamental importância para degradação de carboidratos uma vez que é utilizada pelos microrganismos que degradam a celulose e hemicelulose da parede celular dos vegetais, para crescimento e multiplicação celular (RUSSELL et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, além de dependerem da amônia, os mesmos necessitam também de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) (isovalerato, isobutirato) provenientes da degradação da proteína de cadeia ramificada, como a leucina, isoleucina e valina, para síntese de proteínas microbianas (HARAGUCHI et al., 2006). Diante disto, pode-se afirmar que a interação da uréia e caseína proporcionou as melhores condições para degradação da FDN, visto que o tratamento com 50% de ambos os compostos nitrogenados tiveram as melhores taxas de degradação.

Resultado semelhantes foi encontrado por Zorzi et al. (2009), que observaram um efeito deletério na inclusão da caseína, onde o acréscimo de 0,5 mg/mL aumentou em 1,1 % a taxa de degradação da FDNpd. Porém, o uso da caseína em níveis maiores de 1,0 e 2,0 mg/mL ocasionou efeito inibitório sobre as estimativas deste parâmetro em comparação ao tratamento somente com forragem, onde as reduções foram de 6,4 e 9,1 %. Os mesmos autores constataram que somente a suplementação com uréia, independentemente do nível de suplementação, aumentou a taxa de degradação da FDNpd.

Segundo Detmann et al. (2011), os valores máximos encontrados para a FDN potencialmente degradável e eficiência microbiana foram conseguidos quando a relação era 2/3 de nitrogênio não proteico e 1/3 de proteína verdadeira. Estes autores afirmam que o balanceamento do suplemento proteico otimiza a degradação da FDN de forragem de baixa qualidade para bovinos.

Outro parâmetro que pode-se associar a melhoria no aproveitamento da FDN em relação à utilização NNP e PV é a latência discreta (L). Detmann et al. (2011), descrevem como latência discreta a estimativa, por aproximação, do tempo requerido para os preparatórios iniciais referentes as atividades de degradação da FDN, envolvendo hidratação, fixação ao substrato e síntese de enzimas. Observou-se que o tratamento com 50% de substituição de NNP e PV obteve uma redução na estimativa de latência discreta de 1,31 em comparação ao tratamento com 0% de substituição e uma redução de 2,7 horas em comparação ao tratamento com 100% de substituição. Foi observada uma redução no tempo de latência até o nível de 50% de substituição da NNP por PV, causando uma redução de 0,99 horas na latência discreta.

Segundo Detmann et al. (2009), a ineficiência na concentração de amônia no meio ruminal pode causar uma deficiência microbiana na síntese de compostos necessários para a aderência microbiana na fibra ou na produção de enzimas para iniciar a degradação de fibra. Outro fator importante que pode-se mencionar para uma possível explicação a maior taxa de degradação da FDNpd em situações de suplementação combinada, é a manutenção constante de valores elevados da amônia no meio, propiciando as bactérias que degradam celulose e hemicelulose e o atendimento das exigências das diversas espécies do meio ruminal. Geralmente, as bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas, fermentadoras de carboidratos fibrosos utilizam o nitrogênio amoniacal como principal fonte de nitrogênio para crescimento microbiano. Entretanto, as bactérias fermentadoras de carboidratos não fibrosos utilizam aminoácidos como fonte de nitrogênio. Como o meio de incubação, do presente estudo, era rico em carboidrato fibroso (Tabela 1), os tratamentos que forneciam maiores quantidades de PV, tiveram comprometimento na eficiência da degradação da fibra.

A suplementação com os diferentes compostos nitrogenados teve elevação de somente 4,5% na taxa de crescimento específico de microrganismos até a substituição de 50% da NNP por PV (Tabela 6). Entretanto, ocorreu um decréscimo de 10,9 a 24,9% para os níveis de substituição de 75 e 100%, respectivamente. Para eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd a substituição com 50% obteve os melhores resultados, sendo 17,4% mais eficiente em relação ao tratamento com 100% de NNP. Quando a substituição do NNP por PV passou a ser de 100%, ocorreu um decréscimo de 13,7% na taxa de crescimento específico dos microrganismos.

Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a fibra em detergente neutro potencialmente degradável em função das substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).

Parâmetro	Níveis de Substituição				
	0%	25%	50%	75%	100%
μ^1	3,13	3,22	3,27	2,79	2,35
Sgr	0,0719	0,0785	0,0844	0,0671	0,0621
EFM	312,95	348,78	363,37	308,15	302,55

¹ μ = máxima taxa de degradação (h-1); Sgr = taxa de crescimento específico de microrganismos (h-1); EFM = eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd (g MS microbiana/kg de carboidrato degradado).

Foi encontrado comportamento similar aos demais parâmetros avaliados em relação eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd (g MS microbiana/kg de carboidrato degradado). A substituição em até 50% proporcionou um crescimento microbiano em torno de 16,1% mais eficiente com 363,37g (g MS microbiana/kg de carboidrato degradado). Enquanto a substituição total NNP por PV provocou uma redução de 3,3% em comparação ao tratamento sem substituição.

O fornecimento de aminoácidos, oriundo da proteína verdadeira, compondo uma parte da suplementação, demonstra ser importante tanto para degradação como para o crescimento microbiano, uma vez que os aminoácidos são fornecedores do esqueleto carbônico, formados pela degradação do mesmo, e juntamente com amônia, gerada pela hidrólise do NNP, são utilizados para a síntese de proteína microbiana (RIBEIRO et al., 2014). Sampaio et al. (2009), citam que a exigência de compostos nitrogenados pelos microrganismos ruminais é de aproximadamente 7% de PB e que valores inferiores a este, deixam de atender as exigências dos microrganismos ruminais, comprometendo assim o crescimento microbiano. Tendo em vista que os valores basais de PB encontrados na forragem utilizada neste experimento foi de 4,98%, abaixo do recomendado por Sampaio et al. (2009), podemos considerar que todos os tratamentos supriram as recomendações de PB, uma vez que os tratamentos com 0; 25; 50; 75 e 100% de substituições da uréia por caseína obtiveram 19,9; 10,8; 9,6; 8,4 e 7,2% de PB, respectivamente.

Fernandes et al. (2014), citam que a proteína microbiana é considerada de alto valor biológico, apresentando 62,5% de proteína bruta, sendo que 60% desta é verdadeira e disponível e com perfil aminoacídico completo para ruminantes, além de representar cerca de 50 a 80% da proteína absorvível no intestino (BACH et al., 2005). Diante do exposto, os dados demonstram a importância do fornecimento adequado da suplementação com NNP e fontes de proteína verdadeira para os microrganismos ruminais, pois estes serão responsáveis por boa parte da resposta biológica animal, uma vez que a maior quantidade de microrganismos presente, além de ajudar na degradação do alimento serve como fonte de proteínas para o animal hospedeiro.

As maiores estimativas da degradação efetiva da FDNpd foram observadas no tratamento com 0% de substituição do NNP por PV, com incrementos, considerando-se taxa de passagem de $0,035 \text{ h}^{-1}$, de 20,7% sobre a fração efetivamente degradada da FDNpd, comparada ao tratamento com 100% de substituição e chegando a 22,6% de incremento usando a taxa de passagem de $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 7).

Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função das substituições do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV).

Tratamento	Taxa de passagem ruminal (h^{-1}) ¹		
	0,020	0,035	0,050
0%	35,88	31,36	27,65
25%	34,27	30,26	26,91
50%	32,85	29,22	26,17
75%	33,73	29,24	25,59
100%	30,28	25,99	22,55

¹ Assumindo-se cinética de deslocamento ruminal de sólidos com ordem gama-1.

A fração efetivamente degradada da FDNpd, por se tratar de um parâmetro diretamente derivado da taxa de degradação da FDNpd, deveria apresentar um comportamento similar aos demais parâmetros estudados, entretanto tal comportamento não foi verificado no presente trabalho. Apesar da fração potencialmente degradável da FDN (U) ser uma característica única e exclusiva do substrato (forragem) (DETMANN

et al., 2011), são atribuídos diferentes valores para cada tratamento de acordo com o tipo e a utilização da suplementação nitrogenada, visando aumentar a fração potencialmente degradável e consequentemente diminuir fração indegradável. Tal fato ocorre, pois a suplementação com os diferentes tipos de compostos nitrogenados modifica o meio ruminal, favorecendo ou não um ambiente que propicie uma melhor degradação da FDN. Portanto, observa-se uma diferença na fração efetivamente degradada da FDNpd em relação as taxas de degradação, onde foi observado que a suplementação com nitrogênio não protéico e proteína verdadeira traz benefícios na digestão da fibra do capim-buffel, tanto na extensão de sua degradação pelos microrganismos ruminais, como também na síntese de proteína microbiana (COSTA *et al.*, 2008).

A degradação da FDN, ao término do ensaio de incubação, demonstrou efeito quadrático com ponto de máxima degradação da FDN, pela derivação da equação, em torno de 42,03% de substituição de nitrogênio não proteico por proteína verdadeira (Figura 2).

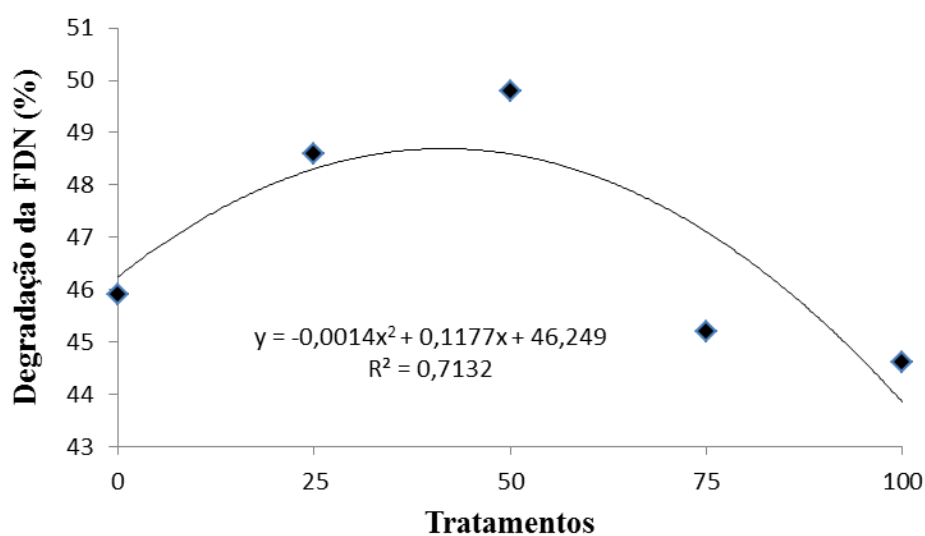


Figura 2- Degradação da FDN (%) em relação a substituição das fontes de compostos nitrogenados.

CONCLUSÕES

A utilização, como fonte de nitrogênio, para microrganismos ruminais, de 50% de nitrogênio não protéico e 50% de proteína verdadeira otimiza a degradação da fibra em detergente neutro do capim-buffel com baixo teor protéico e o crescimento microbiano *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 19th.ed., Gaithersburg, MD, USA, 2610p, 2012.

ARRUDA, A. M. V.; ALBUQUERQUE NETO, M. C.; LINHARES, P. C. F.; COSTA, M. R. G. F.; PEREIRA, E. S. Digestibilidade *In Vitro* da Jitirana com Inóculo Cecal de Avestruzes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, p.474-483, 2010.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.9-21, 2005.

BARROS, I.C. **Composição bromatológica de cultivares do Capim-buffel em diferentes estações do ano submetidos à adubação nitrogenada**. Montes Claros: UNIMONTES, 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Montes Claros, 2010.

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.

BOWEN, M. K.; POPPI, D. P.; McLENNAN, S. R. Effect of quantity and source of rumen nitrogen on the efficiency of microbial protein synthesis in steers consuming tropical forage. **Animal Production Science**, Online Early, 2016.

BURKE, J. L.; WAGHORN, G. C.; BROOKES, I. M.; CHAVES, A. V.; ATTWOOD, G. T. In vitro production of volatile fatty acids from forages. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.66, p. 50-54, 2006.

CAMURÇA, D.A.; NEIVA, J.N.M.; PIMENTEL, J.C.M.; VASCONCELOS, V.R., LÔBO, R.N.B. Desempenho produtivo de ovinos alimentados com dietas à base de feno de gramíneas tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. p.2113-2122, 2002.

COSTA, V. A. C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; HENRIQUES, L. T.; MANTOVANI, H. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.494-503, 2008

CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p. 426-435, 2013.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SAMPAIO, C. B.; SOUZA, M. A.; LAZZARINI, I.; DETMANN, K. S. C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136–146, 2009.

DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; ZORZI, K.; MANTOVANI, H. C.; BAYÃO, G. F. V.; GOMES, M. P. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1272-1279, 2011.

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**. Madison: American Society of Agronomy, p.682-756. 1994.

FERNANDES, R. M. **Relação nitrogênio não proteico e proteína verdadeira em suplementos na recria de bezerros Nelore**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) UNESP, Jaboticabal, p.75, 2014.

FRANCO, A. V. M.; FRANCO, G. L.; ANDRADE, P. Parâmetros ruminais e desaparecimento da MS, PB e FDN da forragem em bovinos suplementados em pastagem na estação seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1316-1324. 2004.

GONÇALVES, A. P.; NASCIMENTO, C. F. M.; FERREIRA, F. A.; GOMES, R. C.; MANELLA, M. Q.; MARINO, C.T.; DEMARCHI, J. J. A. A.; RODRIGUES, P. H. M. Slow-release urea in supplement fed to beef steers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.58, n.1, p. 22-30, 2015.

GOULARTE, S. R.; ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; ÍTAVO, C. C. B. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; FAVARO, S. P.; DIAS, A. M.; TORRES JUNIOR, R. A. A.; BITTAR, C. M. M. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1479-1486, 2011.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p. 479-488, 2006.

HELDT, J. S.; COCHRAN, R. C.; MATHIS, C. P.; WOODS, B. C.; OLSON, K. C.; TITGEMEYER, E. C.; NAGARAJA, T. G.; VANZANT, E. S.; JOHNSON, D. E. Effects of level and source of carbohydrate and level of degradable intake protein on intake and digestion of low-quality tallgrass-prairie hay by beef steers. **Journal of Animal Science**, v.77, n.10, p. 2846-2854, 1999a.

HELDT, J. S.; COCHRAN, R. C.; STOKKA, G. L.; FARMER, C. G.; MATHIS, C. P.; TITGEMEYER, E. C.; NAGARAJA, T. G. Effects of different supplemental sugars and starch fed in combination with degradable intake protein on low-quality forage use by beef steers. **Journal of Animal Science**, v.77, n.10, p.2793-2802, 1999b.

KANJANAPRUTHIPONG, J.; LENG R. A. A comparison of ammonia and preformed protein as a source of nitrogen for microbial growth in the rumen of sheep given oaten chaff. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.11, n.4, p. 351-362, 1998.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3º ed. Santa Maria: Editora da UFSM, p. 212, 2011.

LAGUNA, J. G.; RODRIGUES, A. N.; SATURNINO, H. M.; RUAS, J. R. M.; COELHO, S. G.; REI, R. B. Alimentação de vacas F1 Holandês x Zebu com suplementos nitrogenados e monensina sódica: avaliação do consumo, parâmetros ruminais e produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.3, p.841-846, 2013.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303. 1990.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.

MALLMANN, G.M.; PATINO, H.O.; SILVEIRA, A.L F.; MEDEIROS, F.S.; KNORR, M. Consumo e digestibilidade de feno de baixa qualidade suplementado com nitrogênio não protéico em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.331-337, 2006.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; CANESIN, R. C.; SETTI, M. C. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.3, p.1186-1193, 2006.

MONÇÃO, F. P.; OLIVEIRA, E. R.; TONISSI, R. H.; GOES, B. O capim-buffel, **Revista Agrarian**, v.4, n.13, p.258-264, 2011.

MOSS, A. R; JOUANY J. P; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales Zootechnie**, v.49, n.3, p.231-253, 2000.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**. v.8, n.6, p.1-12, 2007.

ORSKOV, E. R. **Nutrición proteica de los ruminantes**. Zaragoza: Acribia, p. 178, 1988.

ORSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements of feed in weighted according to rate passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.

PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society**, Series B, v.163, p.224-231, 1965.

RASMUSSEN, M. A.; WHITE, B. A.; HESPELL, R. B. Improved assay for quantitating adherence of ruminal bacteria to cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2089-2091, 1989.

RIBEIRO, P. R.; MACEDO JUNIOR, G. L.; SILVA, S. P. Aspectos nutricionais da utilização da proteína pelos ruminantes. **Veterinária Notícias**, v.20, n.2, p.1-14, 2014.

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.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v. 79, n.8, p.1503-1509, 1996.

SANTOS, G. R. A.; GUIM, A.; SANTOS, M. V. F.; FERREIRA, M. A.; LIRA, M.de A.; DUBEUX JÚNIOR, J.C. B.; SILVA, M. J. Caracterização do pasto de Capim-buffel diferido e da dieta de bovinos, durante o período seco no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.454-463, 2005.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; LAZZARINI, I.; SOUZA, M. A.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p. 560-569, 2009.

SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 32, n. 2, p.199-208, 1974.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**.v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

SOUZA, R.A.; VOLTOLINI, T.V.; ARAÚJO, G.G.L.; PEREIRA, L.G.R.; MORAES, S.A.; MISTURA, C.; BELEM, K.V.J.; MORENO, G.M.B. Consumo, digestibilidade aparente de nutrientes e balanços de nitrogênio e hídrico de ovinos alimentados com silagens de cultivares de capim-búfel. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.526-536, 2013.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.11, p.2941-2947, 1986.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. **Fermentação ruminal**. In. BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). Nutrição de ruminantes 2 ed. Jaboticabal: Funep, 616 f. p. 161-189, 2011.

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. Development of a comprehensive system of feeds analysis and its applications to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press. 476p. 1994.

VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephantgrass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.

XIN, H. S.; SCHAEFER, D. M.; LIU, Q. P.; AXE, D. E. MENG, Q. X. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v.23, p. 491-500, 2010.

ZORZI, K.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, MÁRIO FONSECA, MANTOVANI, HILÁRIO CUQUETTO, e BAYÃO, GERALDO FÁBIO. In vitro degradation of neutral detergent fiber of high-quality tropical forage according to supplementation with different nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.5, p.964-971, 2009.

CAPÍTULO 4

COMPOSTOS NITROGENADOS ASSOCIADOS A UMA FONTE DE CARBOIDRATO NÃO FIBROSO SOBRE A DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DA FDN DE CAPIM-BUFFEL

Compostos nitrogenados associados a uma fonte de carboidrato não fibroso sobre a degradação *in vitro* da fdn de capim-buffel

Resumo - Objetivou-se com este trabalho avaliar a degradação *in vitro* dos carboidratos fibrosos do capim-buffel, em função de suplementação com compostos nitrogenados associados a uma fonte de carboidrato não fibroso. Os tratamentos tiveram as seguintes constituições: 100% de nitrogênio não proteico (NNP) e 65 mg de amido; 75% de NNP e 25% de proteína verdadeira (PV) e 65 mg de amido; 50% de NNP e 50% PV e 65 mg de amido; 25% de NNP e 75% PV e 65 mg de amido; 100% de PV e 65 mg de amido; 0% de fonte de nitrogênio e 65 mg de amido. Os níveis foram avaliados por incubação *in vitro* em diferentes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos com três repetições. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de FDN e interpretados pelo modelo logístico não-linear. O tratamento com 0% de PV apresentou um valor mais elevado de proteína microbiana, 545,8 mg/L, enquanto o tratamento com 100% de PV obteve o menor valor entre todos os níveis de substituição, 426,6 mg/L de líquido ruminal, valor próximo ao tratamento sem adição de compostos nitrogenados, 423,1 mg/L. A substituição do NNP pela PV afetou ($P>0,05$) as concentrações de acetato. A maior concentração de ácidos graxos voláteis (AGVs) Totais foi observada no tratamento com 100% de NNP. A substituição do NNP pela PV em 100% provocou um decréscimo de 28,98% na taxa de degradação em comparação ao tratamento sem com 0% de NNP. A adição da PV em substituição ao NNP em 100% diminuiu em 29,02% a taxa de crescimento específico de microrganismos e em 8,86% a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd no tratamento com 100% de PV. A utilização do NNP, como única fonte de nitrogênio para microrganismos ruminais, associado a uma fonte de carboidrato não fibroso, otimiza a degradação da fibra em detergente neutro e o crescimento microbiano do Capim-buffel com baixo teor protéico *in vitro*. A utilização de nitrogênio não protéico, como única fonte de nitrogênio para microrganismos ruminais, associado a uma fonte de carboidrato não fibroso, otimiza a degradação da fibra em detergente neutro e o crescimento microbiano do capim-buffel com baixo teor protéico *in vitro*.

Palavras-chave: amido; caseína; proteína microbiana; uréia

Effect of NNP substitution by TP, associated to a non-fibrous carbohydrate source on the degradation of Buffel Grass NDF *in vitro*

Abstract - The objective of this work was to evaluate the *in vitro* degradation of the fibrous carbohydrates of the Buffel Grass, as a function of nitrogen supplementation with a non-fibrous carbohydrate source. The treatments had the following constitutions: 100% of non-protein nitrogen (NPN) and 65 mg of starch; 75% NPN and 25% true protein (TP) and 65 mg starch; 50% NPN and 50% TP and 65 mg starch; 25% NPN and 75% TP and 65 mg starch; 100% TP and 65 mg starch; 0% nitrogen source and 65 mg starch. The levels were evaluated by *in vitro* incubation at different times: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours. The experiment was done in a completely randomized design, with five treatments with three replicates. The incubation residues were evaluated for the NDF content and interpreted by the nonlinear logistic model. The treatment with 0% of TP had a higher value of microbial protein, 545.8 mg / L, while the treatment with 100% of TP obtained the lowest value among all substitution levels, 426.6 mg/L of liquid Ruminant, value close to the treatment without addition of nitrogen compounds, 423.1 mg/L. The substitution of NPN by TP affected ($P > 0.05$) the concentrations of acetate. The highest concentration of total VFA was observed in the treatment with 100% NPN. The replacement of NPN by TP in 100% caused a decrease of 28.98% in the rate of degradation compared to the treatment without 0% of NPN. The addition of TP in substitution to NPN in 100% decreased the specific growth rate of microorganisms by 29.02% and in microbial growth efficiency by 8.86% on the NDF in the treatment with 100% of TP. The use of NPN, as the only source of nitrogen for ruminal microorganisms, associated with a non-fibrous carbohydrate source, optimizes the degradation of neutral detergent fiber and the microbial growth of Buffel Grass with low *in vitro* protein content. The use of non-protein nitrogen, as the only source of nitrogen for ruminal microorganisms, associated to a non-fibrous carbohydrate source, optimizes the degradation of neutral detergent fiber and the microbial growth of Buffel grass with low protein content *in vitro*.

Keywords: casein; microbial protein; starch; urea

INTRODUÇÃO

No período seco do ano na região Nordeste do Brasil, as plantas forrageiras nativas ou adaptadas são as principais fontes de nutrientes para os caprinos. Entretanto, estas forrageiras apresentam baixo valor nutricional, com elevados teores de fibra e baixos teores de proteína bruta. Esses fatores limitam a digestão da fibra no rúmen, porém algumas medidas podem ser tomadas visando melhorar a eficiência na utilização dessas fontes de energia, estimulando o crescimento dos microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos.

Em tempos de déficit hídrico, as forrageiras apresentam valores abaixo de 7% de proteína, valor este, limitante para degradação e até para o consumo da fibra, uma vez que os microrganismos ruminais necessitam de fontes de compostos nitrogenados para utilização dos carboidratos fibrosos da forrageira (LAZZARINI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2009). Baroni et al. (2010) trabalhando com a suplementação com compostos nitrogenados em pastagens de *Panicum maximum* “Tanzânia”, verificaram incrementos lineares no consumo total de MS e de FDN. A adição de compostos nitrogenados resultou em aumentos significativos na digestibilidade da FDN (49,9 e 54,3%, respectivamente para 11 e 13% de PB) (SILVA et al., 2009). A adição de 2% de uréia ao feno de *C. dactylon* 'Coast Cross' afetou positivamente a taxa de degradação ($0,06 \times 0,11 \text{ h}^{-1}$) e a degradabilidade efetiva da FDN ($30,12 \times 41,07\%$) (LOPES et al., 2010).

Sabe-se que a maioria das espécies bacterianas ruminais podem utilizar amônia para síntese de seus compostos nitrogenados. Outrossim, para as bactérias que degradam os carboidratos fibrosos, a amônia é essencial para seu crescimento. Quando se estimula o crescimento desses microrganismos ocorre maior fermentação de celulose e hemicelulose, tendo maior produção dos ácidos graxos voláteis, que são utilizados como fonte de energia pelos ruminantes. Segundo Detmann et al. (2009), os níveis de amônia ruminal para a otimização da degradação e ingestão dos componentes fibrosos

em dietas com forragem de baixa qualidade, ocorre quando concentrações de nitrogênio amoniacal, no rúmen, alcançam os valores de 8 e 15 mg/dL, respectivamente.

Entretanto, a concentração de nitrogênio amoniacal não é condição única para os microrganismos ruminais para otimizem a degradação da forragem. O fornecimento de fontes de energia na dieta para ruminantes parece ser importante, pois, não havendo disponibilidade adequada de carboidratos no momento da liberação da amônia no rúmen, ela não será aproveitada pelos microrganismos ruminais, sendo absorvida pelo rúmen e transportada para corrente sanguínea e, posteriormente, eliminada pela urina como uréia. A sincronização entre as fontes de carboidratos não fibrosos e fibrosos e a amônia ruminal pode acarretar maximização da eficiência microbiana e diminuição da perda de N em forma de amônia e da energia dos carboidratos, promovendo melhoria na digestão da fração fibrosa (COSTA et al., 2015).

Ter o conhecimento da concentração de amônia combinada com uma fonte de energia fermentescível no rúmen de caprinos é de suma importância, pois permite utilizar de forma mais eficiente não só a forragem, mas também as fontes de nitrogênio. Ao se determinar a concentração de amônia no rúmen dos animais para otimização da digestão da fibra, se evitará também, a utilização em excesso de fontes de proteína, diminuindo o custo na alimentação animal e a excreção de nitrogênio.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro do capim-buffel com baixo teor protéico, em função de suplementação com compostos nitrogenados associados com uma fonte de carboidrato não fibroso.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio *in vitro* foi realizado no Laboratório do Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia pertencente à Universidade Federal de Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, no município de Areia/PB. Foi utilizado um caprino fistulado no rúmen como doador de líquido ruminal, este foi alimentado exclusivamente com capim-elefante por sete dias consecutivos, antes da realização da coleta do líquido ruminal, para diminuir a concentração de compostos nitrogenados no líquido ruminal.

O trabalho foi executado obedecendo às normas técnicas de biossegurança e ética, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (protocolo: 0209/14).

O capim-buffel (*Cenchrus Ciliaries*), foi coletado de uma pastagem deferida, onde a gramínea apresentava-se em estado fenológico avançado e após a coleta foi seco sob ventilação forçada (60° C), foi processado em moinho de facas com peneiras de 2 mm para uso nas incubações e processadas em moinho de facas com peneiras de 1 mm para quantificar os teores de matéria seca (MS) (método 930.15), proteína bruta (PB) (método 968.06), extrato etéreo (EE) (954.05), matéria mineral (MM) (método 942.05), de acordo com metodologia descrita pela AOAC (2012). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram estimados por metodologia de Van Soest (1967) e expressos na forma corrigida para cinzas e compostos nitrogenados e o teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro em relação ao nitrogênio total (NIDN/NT) segundo os procedimentos de Licitra et al., (1996). Os valores de carboidratos totais (CHOT) foram obtidos pela equação $CHOT (\%) = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$, e os carboidratos não fibrosos (CNF) = $100 - (\%PB + \%FDN_{cp} + \%MM + \%EE)$, onde FDN_{cp} é o FDN livre de cinzas e proteínas como descrito por Sniffen et al. (1992). (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição da forragem e dos componentes dos suplementos

Item	Forragem	Uréia	Caseína	Amido
Matéria seca (g/kg)	854,4	982,1	900,0	936,8
Matéria orgânica (g/kg MS)	905,2	997,6	972,4	994,6
Cinzas (g/kg MS)	94,8	2,4	27,6	5,4
Proteína Bruta (g/kg MS)	49,8	2610,0	889,7	3,2
Extrato Etéreo (g/kg MS)	16,6	-	3,2	-
CHOT (g/kg MS)	838,8	-	-	991,4
FDN (g/kg MS)	857,0	-	-	-
FDN _{cp} (g/kg MS)	799,7	-	-	-
FDA (g/kg MS)	348,1	-	-	-
CNF (g/kg MS)	39,1	-	-	-
NT (g/kg MS)	8,0	-	-	-

NIDN (g/kg MS)	195,6	-	-	-
Lignina (g/kg MS)	76,6	-	-	-

.¹Fibra em Detergente Neutro; ² FDN livre de cinzas e proteínas; ³Fibra em Detergente Neutro; ⁴Carboidratos não Fibrosos; ⁵Nitrogênio Total; ⁶Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro.

Foi coletado líquido ruminal do caprino, três horas após o arraçoamento, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa. No laboratório, o líquido foi saturado com dióxido de carbono (CO₂), colocado em repouso a 39°C e após formação das interfaces do líquido procedeu a retirada da fração intermediária que foi centrifugado a 500 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (RUSSELL e MARTIN, 1984). O resíduo da centrifugação (pellet), foi ressuspensão mais duas vezes em tampão de McDougall (9,80g de NaHCO₃; 4,65g de Na₂HPO₄*2H₂O; 0,57g de KCl; 0,12g de MgSO₄*7H₂O e 0,04g de CaCl₂, diluídos com água destilada até o volume de 1000ml) autoclavado.

O experimento foi constituído de seis diferentes relações de nitrogênio não proteico (uréia), proteína verdadeira (caseína) e uma fonte de carboidratos não fibroso (amido). A fonte de nitrogênio não proteico foi a uréia, a de proteína verdadeira foi a caseína P.A. (DINÂMICA QUÍMICA CONTEMPORÂNEA) e a fonte de carboidrato não fibroso foi o amido solúvel P.A. (SYNTH). Foi utilizado 9,58 mg de uréia para chegar as concentrações de 17,76 mg/dL de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, sendo este, o tratamento com 100% de nitrogênio não proteico, tendo como base a quantidade de uréia utilizada para alcançar as concentrações de nitrogênio que otimizou a digestão da FDN do capim-buffel em pesquisa anterior. A concentração de amido no meio foi 65 mg e de capim-buffel foi 285 mg, simulando condições de suplementação de caprinos com concentrado (81,5% de forragem e 18,5% de concentrado) para garantir o nível de energia para aproveitamento do nitrogênio não-proteico pela população microbiana do rúmen. Os tratamentos tiveram as seguintes constituições: 1) 0% de substituição do NNP por PV; 2) 25% de substituição do NNP por PV; 3) 50% de substituição do NNP por PV; 4) 75% de substituição do NNP por PV; 5) 100% de substituição do NNP por PV; 6) 0% de fonte de nitrogênio.

Cada frasco foi então saturado com CO₂, tampado e lacrado. Os frascos foram incubados a 39 °C, em estufa incubadora de BOD durante 96 horas. Durante a

incubação foram retirados de todos os frascos os gases produzidos através de seringas a cada 3 horas. Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da estufa incubadora de BOD e o resíduo filtrado para determinação da degradabilidade da FDN. Foi retirado de cada unidade experimental 2,0 ml de amostra do meio de cultura que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugados na microcentrífuga a 5200 x g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análise posterior da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), o pelete ressuspenso em solução de NaCl (0,9% p/v), centrifugado a 5200 x g, por 10 minutos, descartado o sobrenadante, ressuspenso novamente em solução de NaCl (0,9% p/v), e congelado para posterior determinação de proteína microbiana. A concentração de amônia foi determinada através do método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962) e proteína microbiana pelo método de Bradford (1976).

Os resíduos da FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram analisados pelo algoritmo de Gauss-Newton e ajustado ao modelo logístico não linear descrito por Van Milgen et al. (1991) e Detmann et al. (2011).

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

(I)

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

A função descrita em (I) é considerada simétrica em relação às taxas fracionais de degradação c e p , sendo frequentemente reconhecido que os menores valores estão associados a c (VIEIRA et al., 1997). Entretanto, quando as taxas fracionais c e p tendem à mesma estimativa, indeterminação matemática será observada e o modelo re-parametrizado segundo a regra de L'Hôpital (VAN MILGEN et al., 1991):

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

(II)

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h⁻¹). Nesta circunstância, devido o parâmetro λ descrever simultaneamente as taxas de latência e degradação, determinou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ utilizando as propriedades da distribuição gama-2 (ELLIS et al., 1994):

$$c' = 0,59635 \times \lambda$$

(III)

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDNpd (h⁻¹) para os casos em que o modelo re-parametrizado for utilizado (Equação II).

A latência discreta foi obtida segundo modelos de Vieira et al. (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(ti)}{\mu} + ti$$

(IV)

em que: L = latência discreta (h); $R(0)$ = resíduo de FDN não degradada em $t = 0$ (%); $R(ti)$ = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de degradação (%); μ = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h⁻¹); ti = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de ti foram calculados segundo as observações de Van Milgen et al. (1991) (Equações I e II, respectivamente):

$$ti = \frac{\ln(c) - \ln(p)}{(c - p)}$$

(V)

$$ti = \frac{1}{\lambda}$$

(VI)

A taxa específica de crescimento microbiano em relação a FDNpd foi calculada segundo hipótese proposta por Beuvink e Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{\mu}{U}$$

(VII)

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1}). Com as estimativas de Sgr calculadas, estimou-se as eficiências de crescimento microbiano em relação a FDNpd, segundo teorias de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{Sgr} + \frac{1}{Ym}$$

(VIII)

em que: Y = eficiência microbiana ($g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$); m = exigência para manutenção dos microrganismos ($g \text{ carboidratos} \times g^{-1} \text{ células} \times h^{-1}$); e Ym = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato ($g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$). O parâmetro Ym foi adotado como referência com o valor de $0,4 g \text{ células} \times g^{-1} \text{ carboidratos degradados}$ e para m o valor de $0,05 g \text{ carboidratos} g^{-1} \text{ células} \times h^{-1}$, conforme recomendações de Russell et al. (1992).

As frações efetivamente degradadas da FDN foram calculadas de acordo por Costa et al. (2008) em adequação a método de Ørskov e McDonald (1979):

$$FED = \lim_{t \rightarrow \infty} \int_0^t [f(t) \times \left(-\frac{dRt}{dt}\right)] dt$$

(IX)

em que: FED = fração efetivamente degradada da FDN (%); $f(t)$ = função relativa ao deslocamento de sólidos no ambiente ruminal. Para definição da função descrita em (IX), assumiu-se deslocamento ruminal de sólidos de ordem gama-1 (ELLIS et al., 1994), à qual foram alocado valores hipoteticamente, 0,020, 0,035 e 0,050.

Desta forma, calculou-se FED, no contexto das equações (X), respectivamente, por:

$$FED = U \times \frac{\lambda^2}{(\lambda + k)^2}$$

(X)

Para análise dos ácidos graxos voláteis (AGV), foi retirado de todas as unidades experimentais no tempo de 48 horas de incubação, 2,0 ml de amostra do meio de cultura que foram colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a $5200 \times g$, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análises de ácidos graxos voláteis (AGV), em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) com um comprimento de ondas: 210 nm, utilizando uma coluna C18 marca SHIMADZU com 30

cm x 7.9 mm de diâmetro, com fluxo na coluna de 0,6 mL/minuto. Sobre uma pressão de 69 kgf, sendo a fase móvel água em 1% de ácido orto fosfórico e o volume injetado 20 ul. Foram analisadas as concentrações dos ácidos graxos voláteis; acetato, propionato e butirato, bem como a relação acetato/propionato, AGVs totais e a concentração de lactato. Foram incubados também frascos considerados branco, contendo as soluções de incubação sem substrato, para o ajuste das variações existentes. Os frascos foram fechados utilizando-se rolhas de borracha e em seguida agitados para homogeneização das amostras.

Os modelos foram ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes níveis de substituição e foram comparados de forma descritiva. Os valores de concentração de N-NH₃ e proteína microbiana obtidos nos tempos de 0 e 48 horas de incubação foram avaliados a análise de variância e a regressão e os critérios utilizados na escolha do modelo foi a significância dos coeficientes de regressão a 5% de probabilidade pelo teste Tukey e o coeficiente de determinação (r²), obtido pela relação entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados dos tratamentos e do fenômeno biológico.

Os dados de AGV e lactato foram submetidos à análise de variância e regressão. Os critérios para escolha de modelos de regressão foram, a significância dos parâmetros da regressão, os valores do coeficiente de determinação e a interpretação biológica das curvas de regressão. A análise estatística das variáveis foi realizada pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

O desvio padrão assintótico (DPA), foi calculado a partir da raiz quadrada do quadrado médio do resíduo de cada modelo. Todas as análises estatística, tanto lineares, como não-lineares, foram realizadas por intermédio do programa SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substituição do nitrogênio não protéico (NNP) por proteína verdadeira (PV) alterou as concentrações de nitrogênio amoniacal no meio ruminal ($P < 0,05$) nos tempos de 0 e 48 horas de incubação. No tempo experimental de 0 horas ocorreu ajuste no modelo linear, as concentrações de nitrogênio amoniacal variaram de 5,20 a 2,11 mg/dL

de líquido ruminal, respectivamente para o tratamento 0% e 100% de substituição, enquanto o tratamento sem adição de NNP ou PV, apresentou uma concentração de nitrogênio amoniacal 2,0 mg/dL de líquido ruminal, valor próximo ao tratamento com 100% de substituição, evidenciando o lento desdobramento da PV em N-NH₃ (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados sobre a concentração de nitrogênio amoniacal e proteína microbiana as 0 hora e 48 horas de incubação *in vitro*

Parâmetro	Níveis de Substituição ¹						CV(%) ²	R ²	p-value	
	0%	25%	50 %	75%	100%	CNF ⁵			L	Q
N-NH ₃ , mg/dL										
0 horas ³	5,20	3,66	2,99	2,56	2,11	2,00	22,41	0,91	0,02	ns
48 horas ⁴	28,06	25,19	22,88	16,97	14,06	8,75	16,02	0,97	0,01	ns
Ptn microbiana, mg/L										
0 horas	133,2	124,6	126,1	129,9	135,1	128,4	46,4	-	ns	ns
48 horas	545,8	464,4	441,6	433,0	426,6	423,1	18,16	-	ns	ns

0% , 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira; ²CV = coeficiente de variação, probabilidade significativa ao nível de 5% de probabilidade (p < 0,05) pelo teste Tukey); NS = não significativo; L = linear; Q = quadrático, R²= Coeficiente de determinação. ³ $\hat{Y} = 4,76 - 0,029X$; ⁴ $\hat{Y} = 28,68 - 0,14X$; ⁵ Tratamento sem adição de uréia ou caseína, apenas com amido como fonte de CNF.

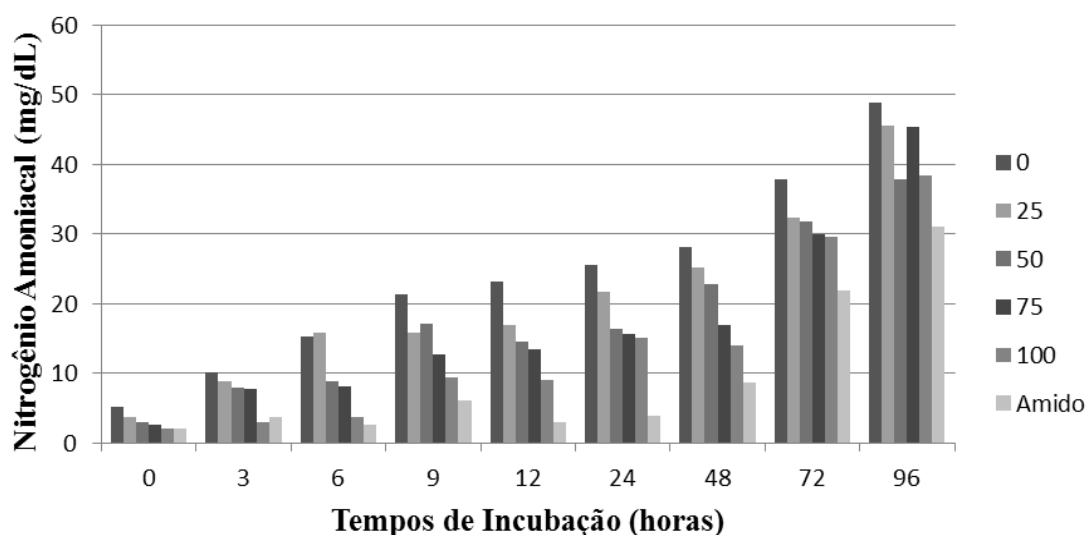
Apesar do lento desdobramento da PV em N-NH₃, era esperado, em algum momento, que a PV (100% de substituição) fosse ter uma maior concentração de N-NH₃ e proteína microbiana nos tempos de 72 e 96 horas em comparação ao tratamento sem adição de compostos nitrogenados, entretanto tal fenômeno não foi observado (Figura 1).

No tempo experimental de 48 horas de incubação, ocorreu ajuste ao modelo linear decrescente (P<0,05), onde os valores de N-NH₃ variaram de 28,06 a 14,06, respectivamente para os tratamentos com 0 e 100% de substituição de NNP por PV.

O tratamento somente capim-buffel e amido (0% de fonte de nitrogênio) observou-se uma concentração de nitrogênio amoniacal de 8,75mg/dL de líquido

ruminal, valor inferior ao tratamento com 100% de PV. Apesar da lenta liberação de amônia a partir da caseína (PV) no início da incubação, com o passar do tempo, os microrganismos proteolíticos conseguiram desdobrar a caseína, transformando-a em amônia, proporcionando melhores condições para degradação das frações fibrosas (Figura 1a). Bowen et al. (2016), destaca que independente da fonte do composto nitrogenado, o mais importante é a concentração de N-NH_3 no meio ruminal, uma vez que os autores não encontraram diferença na digestibilidade da FDN ou na extensão da fração potencialmente degradável em comparação com um fornecimento de fontes de nitrogênio degradável no rúmen, como a uréia e a caseína.

(a)



(b)

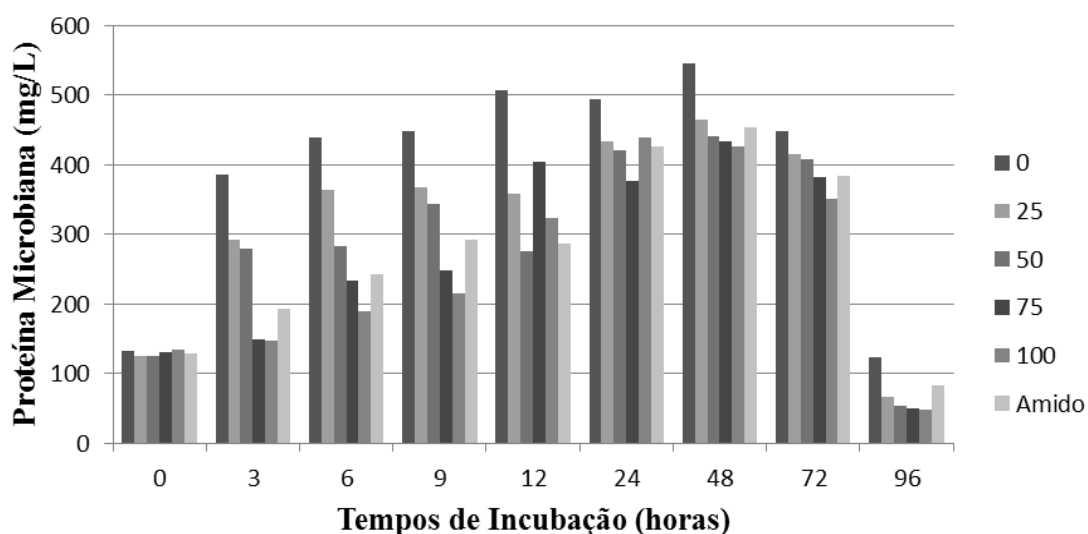


Figura 1- Efeito de níveis de substituição da uréia por caseína associado a uma fonte de carboidrato não fibroso sobre a concentração de amônia (a) e proteína microbiana (b) ao longo de 96 horas de incubação *in vitro*

A proteína microbiana não foi alterada no tempo experimental de 0 hora ($P>0,05$), apresentando media geral de 129,55 mg/L de líquido ruminal. A adição de PV em substituição a NNP associado ao CNF não alterou a proteína microbiana ($P>0,05$) as 48 horas de incubação. O fornecimento de fontes de energia na dieta para ruminantes parece ser importante, pois, não havendo disponibilidade adequada de carboidratos não fibrosos no momento da liberação da amônia no rúmen, ela não será aproveitada pelos microrganismos ruminais, sendo absorvida pelo rúmen e transportada para corrente sanguínea e, posteriormente, eliminada pela urina como uréia ou segue ciclo da uréia. Entretanto, a presença de CNF, permite que ao invés da amônia ser perdida na urina, a mesma poderá ser aproveitada pelos microrganismos fermentadores de CNF para síntese de proteína microbiana (RIBEIRO et al., 2001). Assim, a sincronização entre as fontes de carboidratos e a amônia ruminal pode acarretar maximização da eficiência microbiana e diminuição da perda de N em forma de amônia (COSTA et al., 2015).

Segundo inferências de Tedeschi et al. (2000), se a energia fermentável é o limitante, a produção de proteína microbiana é ditada pela energia, e não pelo nitrogênio disponível no rúmen. Isto porque os carboidratos fornecem o esqueleto de carbono necessário para a síntese de aminoácidos a partir da amônia para os microrganismos ruminais (BACH et al., 2005). Por outro lado, se o nitrogênio for limitante, o rendimento microbiano é reduzido pela diferença entre a energia permissível e o crescimento bacteriano permitido pela proteína.

A presença no meio de CNF e aminoácidos advindos da degradação da PV, favoreceu o crescimento dos microrganismos fermentadores de CNF em detrimento aos fermentadores de CF, justificando a ausência de efeito dos níveis de PV sobre a concentração de proteína microbiana (Figura 1b). As bactérias amilolíticas utilizam aminoácidos para sintetizar proteína (RUSSELL et al., 1992), diferentemente de bactérias fermentadoras de CF.

O pH a 0 hora de incubação não sofreu alteração ($P>0,05$), com média geral de 7,14. As 48 horas de incubação, o pH sofreu alterações, com ajuste ao modelo linear

decrecente ($P < 0,05$), onde a adição da PV resultou em diminuição nos valores de pH. O pH de 48 horas variou de 6,99 a 6,90, acima dos valores mínimos aceitáveis para degradação da fibra, segundo Molde et al. (1983), que preconizam que o pH do rúmen tem de ser mantido acima de 6,0-6,1, em dietas a base de forragens e suplementadas com um carboidrato prontamente fermentável, como o amido. Mesmo quando não houve adição de compostos nitrogenados (100% PV), não foram observados valores de pH considerados deletérios à atividade celulolítica e consequentemente da degradação da fibra. Segundo Farenzena et al. (2014), a atividade máxima das enzimas fibrolíticas e adesão microbiana se dá em pH 6,0. Valores inferiores a 6,0 ou acima de 7,0 são prejudiciais a adesão e consequentemente a degradação da fibra

Tabela 3 - Efeito das diferentes fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso sobre o pH do meio as 0 horas e 48 horas de incubação *in vitro*.

Parâmetro	Níveis de Substituição						CV(%) ¹	R ²	p-value	
	0%	25%	50%	75%	100%	CNF ⁴			L	Q
	pH									
0 horas	7,14	7,16	7,16	7,12	7,12	7,15	0,46	-	ns	ns
48 horas ²	6,99	6,98	6,97	6,96	6,90	6,88	0,43	0,76	0,004	ns

¹Coefficiente de Variação; probabilidade significativa ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste Tukey); NS = não significativo; L = linear; Q = quadrático, R²= Coeficiente de determinação. ² $\hat{Y} = 7,00 - 0,0008X$.

A adição da PV reduziu as concentrações de acetato nos diferentes níveis de substituição do NNP associados a uma fonte de carboidrato não fibroso ($P < 0,05$) (Tabela 4). A concentração de acetato apresentou comportamento linear decrescente variando de 72,7 a 62, 8 mM, quando se substituíu NNP por PV. Observou-se uma redução de 0,11 mM para cada unidade percentual de PV adicionada no meio.

Tabela 4. Médias das concentrações dos ácidos graxos voláteis e lactato em relação à fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.

AGV ²	Tratamentos ¹					
	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %	CNF ⁴
Acetato	72,7	72,6	69,9	64,1	62,8	60,7
Propionato	36,0	36,5	36,1	35,6	38,6	37,9
Butirato	9,1	7,6	7,1	7,6	9,1	10,8
Lactato	0,40	0,49	0,42	0,52	0,42	0,47
A/P ³	2,01	1,96	1,95	1,83	1,61	1,6
AGV Totais	121,8	116,9	113,7	111,2	108,1	109,9
Parâmetro	Equação Regressão	CV (%)	L	Q	R ²	
Acetato	$\hat{Y} = 72,9 - 0,11X$	6,58	0,006	0,588	0,90	
Propionato	$\hat{Y} = 36,56$	7,86	0,611	0,084	-	
Butirato	$\hat{Y} = 9,1 + 0,08X - 0,00157 X^2$	7,82	0,897	0,001	0,94	
Lactato	$\hat{Y} = 0,45$	14,5	0,653	0,185	-	
A/P ³	$\hat{Y} = 2,06 - 0,0037X$	7,34	0,028	0,029	0,83	
AGV Totais	$\hat{Y} = 120,45 - 0,12X$	5,77	0,028	0,373	0,82	

¹0% , 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira;

²Concentração de AGVs em milimolar (mM); ³Relação Acetato/Propionato; ⁴ Tratamento sem adição de compostos nitrogenados, os dados foram plotados dentro de cada tabela para comparação de sua equivalência com os níveis suplementação.

O tratamento com adição do amido e sem a suplementação com compostos nitrogenados, apresentou uma concentração de acetato inferior aos demais tratamentos (60,7 mM). Tal acontecimento se deve ao efeito carboidrato, uma vez que não houve saturação com CNF, no meio de incubação (ARROQUY et al., 2005; REZAI et al., 2011). O efeito carboidrato promove a competição por nutrientes essenciais entre microrganismos fibrolíticos e aqueles que degradam os CNF, a qual se agrava em meios com deficiência em compostos nitrogenados (El-SHAZLY et al., 1961). A suplementação com fontes de nitrogênio, como uréia e caseína, pode indicar redução do efeito carboidrato, reduzindo as competições por substratos essenciais entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas ou concomitante a suplementação conjunta com carboidratos, permitindo a redução dos efeitos deletérios à fermentação em comparação à suplementação isolada com esses compostos. (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2009).

A concentração de propionato não foi influenciada pela substituição do NNP por PV ($P>0,05$), com concentração média de 36,6 mM. Os resultados corroboram com Martínez et al. (2010), que trabalharam com quatro dietas experimentais contendo diferentes proporções forragem/concentrado (70:30 ou 30:70), e encontraram interação significativa entre a relação de concentrado para concentrações molares de acetato, onde o aumento na quantidade de concentrado resultou em menores concentrações de acetato, entretanto, as concentrações de propionato não foram significativas. O aumento na proporção de propionato é mais evidente na adição de carboidratos fibrosos (NOGUEIRA et al., 2005; CHAPAVALL et al., 2008). Neste contexto inclusões de CNF em níveis acima de 15 % da MS parece provocar mudanças na proporção de AGV, o que poderia justificar os resultados obtidos no presente estudo, quando foi adicionado amido na proporção de 18,5% na MS, causando efeito nas proporções de acetato e propionato.

A concentração de butirato apresentou efeito quadrático ($P<0,05$), com o ponto médio de 25,47%, corroborando com os resultados de Fernandes (2014), que constatou uma redução na concentração ruminal média de butirato 14% inferior em animais suplementados com menores quantidades de nitrogênio não proteico.

A relação acetato/propionato se ajustou ao modelo linear decrescente ($P<0,05$), onde a relação foi estimada entre 2,01 e 1,61 mM de acetato para cada mM de propionato, respectivamente para os tratamentos com 0 e 100% de substituição da NNP por PV (Tabela 4). O tratamento que continha apenas suplementação com CNF, sem compostos nitrogenados, apresentou uma relação acetato/propionato semelhante ao tratamento com 100% de substituição de NNP por PV. No presente trabalho, a inclusão da fonte de CNF, aparentemente, favoreceu a degradação dos carboidratos, o que é indicado pelos menores valores de pH (Tabela 3), o que reflete em uma menor relação acetato/propionato (PEDREIRA et al., 2005).

As bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais que degradam a celulose e hemicelulose da parede celular dos vegetais apresentam uma taxa de crescimento relativamente mais lenta (OLIVEIRA et al., 2007). O crescimento das bactérias amilolíticas tem maior velocidade de crescimento em comparação com as bactérias celulolíticas, favorecendo a concentração das amilolíticas no meio a proporção que aumentava a quantidade de PV, fonte de nitrogênio para as mesmas. A baixa velocidade

de crescimento dos microrganismos celulolíticos pode ser verificada na Tabela 5, em que proporcionalmente a substituição de NNP por PV ocorria a diminuição de acetato no meio. Isso porque, os microrganismos que utilizam a beta-glicose, presente em polissacarídeos como a celulose, como fonte de energia, geralmente utilizam a rota do acetato ao invés da rota do propionato para reoxidação do NADH, em condições adequadas de pH (MOSS, et. al 2000).

A amônia favorece a produção de acetato, quanto menos amônia menor será a produção de acetato, enquanto uma maior participação de CNF na dieta favorece a produção de propionato, assim como a PV. Afirmarões estas que corroboram com o presente estudo, onde no tratamento com 100% de substituição do NNP por PV e no tratamento sem adição de compostos nitrogenados, as concentrações de acetato foram menores em relação aos demais tratamentos, assim como houve uma maior concentração de propionato nestes tratamentos citados.

A concentração de AGVs total apresentou comportamento linear decrescente ($P < 0,05$). A adição de cada unidade percentual de PV reduziu 0,12 mM de AGVs. Estes resultados diferem com os encontrados por Devant et al. (2001) e Oliveira Júnior et al. (2004) que não encontraram diferença na concentração de AGVs nas diferentes concentrações de PB na dieta. Entretanto, Imaizumi et al. (2002), inferiram que as dietas com maiores teores de PB levam os animais a produzirem maiores concentrações médias diárias de AGV totais, sugerindo que tais dietas permitam uma maior fermentação da matéria orgânica pelos microrganismos ruminais.

A adição de uma fonte de PV associada à uma fonte de CNF, reduziu as estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd do capim-buffel de baixo teor proteico (Tabela 5). Em valores relativos da taxa de degradação da FDN, o tratamento com 100% de PV, proporcionou uma redução de 28,98% em relação ao tratamento 0% de PV (quando se tinha 100% de NNP como fonte de nitrogênio). O tratamento sem PV e NNP, teve redução de 23,01% na degradação da FDNpd. Costa et al. (2009), evidenciaram, na ausência de PV e com adição de amido, uma redução em 22,9% em relação a taxa de degradação da FDNpd.

Na Tabela 5 encontram-se as estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd. Observa-se que o tratamento exclusivo de amido, sem compostos nitrogenados adicionados ao meio de incubação apresentou uma inibição na degradação

da FDNpd, com redução de 23,01% na taxa de degradação. No tratamento com 100% de substituição do NNP pela PV ocorreu um decréscimo de 28,98% na taxa de degradação. Pode-se observar que a adição de PV, em qualquer nível de substituição, resultou em redução no valor relativo da taxa de degradação da FDNpd. Segundo Arroquy et al. (2005) tais efeitos de inibição da degradação se dar por três efeitos principais, efeito: pH, efeito carboidrato e efeito proteína.

A ausência de efeito ou a pouca expressividade do amido no meio de incubação indica uma natureza prioritária em compostos nitrogenados e não na energia (amido) na degradação de forragens de baixa qualidade. A extração de energia a partir carboidratos basais é limitada pela ausência de nitrogênio não proteico ou proteína verdadeira e não por mais energia no sistema (LAZZARINI et al., 2013; DETMANN et al., 2014).

Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.

Parâmetro ²	Tratamentos ¹					
	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %	CNF
c (h ⁻¹)	-	-	-	-	-	-
p (h ⁻¹)	-	-	-	-	-	-
λ (h ⁻¹)	0,1742	0,1493	0,1304	0,1274	0,1238	0,1342
c' (h ⁻¹) ³	0,1039	0,0890	0,0777	0,0759	0,0738	0,0800
VRTD(%)	100	85,66	74,78	73,05	71,02	76,99
L (h)	9,86	11,51	13,17	13,48	13,88	12,80
DPA	10,42	10,92	11,07	10,85	11,03	11,45

¹ substituição de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira; ²c = taxa fracional de degradação; p = taxa de latência (p); λ = taxa fracional comum de latência e degradação; c' = taxa fracional de degradação obtida a partir da conversão do parâmetro λ; VRTD = valor relativo da taxa de degradação; L = latência discreta (L). ³Estimado segundo propriedades da distribuição gama-2: c' = 0,59635λ.

A variável VRTD mostra a natureza prioritária da amônia em relação a PV para degradação da fibra, observando assim a importância de maiores concentrações da amônia ruminal para os microrganismos que degradam fibra no rúmen. Observa-se

aumento no período de latência, quando se aumentava a proporção de PV no meio, demonstrando retardo na colonização da fibra e crescimento das bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos.

A utilização de uma fonte de CNF foi usada para fornecer um sincronismo entre energia e nitrogênio para produção de bactérias celulolíticas, não havendo quantidades suficientes de glicídios de rápida degradação para modificação da flora ruminal. Assim, ocorreu à diminuição do efeito deletério sobre o crescimento dos microrganismos fermentadores de celulose e hemicelulose (COSTA et al., 2009).

Assim, no presente estudo, pode-se observar um efeito negativo na degradação da FDN em respostas a inclusão da PV no meio de incubação, quando da presença de carboidrato não fibroso, devido a competição entre microrganismos amilolíticos e fermentadores de carboidratos fibrosos (COSTA et al., 2008). Segundo Paez-Bernal (2007) este efeito pode-se chamar de “efeito proteína” podendo ser atribuído a interações amensais ou antibiose, tipo de interação desigual na qual microrganismos não fibrolíticos secretam substâncias que inibem o crescimento de microrganismos fibrolíticos, estas substâncias são conhecidas como bacteriocinas e são mais efetivas contra bactérias gram-positivas, inibindo a atividade das bactérias fermentadoras de carboidrato fibroso prejudicando a degradação da FDN (RUSSELL e MANTOVANI, 2002; ARROQUY et al., 2005).

Em relação ao desvio padrão assintótico (DPA), observou-se que os tratamentos com 50; 75 e 100% de PV obtiveram os maiores valores, e pior ajuste ao modelo utilizado, e o tratamento com 0% de PV obteve o menor valor e melhor ajuste, refletindo as melhores estimativas dos parâmetros da degradação ruminal da FDNpd.

A substituição de NNP por PV diminuiu em 29,02% a taxa de crescimento específico de microrganismos e em 8,86% a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd. Assim, quando se tinha 0% de PV estimou-se 304,87g de MS microbiana/kg de carboidrato degradado e quando se tinha 100% de PV estimou-se 277,86g de MS microbiana/kg de carboidrato degradado (Tabela 6). Os resultados de crescimento específico de microrganismos corroboram com os achados de Paez-Bernal (2007), que achou reduções quando a caseína foi adicionado ao meio, semelhante aos resultados de Costa et al. (2009), onde a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd reduziu em 5,6% com a adição de caseína ao meio.

Tabela 6 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a FDNpd em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.

Parâmetro ²	Tratamentos ¹					
	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %	CNF
M	3,32	2,96	2,64	2,57	2,54	2,64
Sgr	0,0641	0,0549	0,0479	0,0468	0,0455	0,0493
EFM	304,87	293,19	282,17	280,24	277,86	284,56

¹% de substituição de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira; ² μ = máxima taxa de degradação (h-1); Sgr = taxa de crescimento específico de microrganismos (h-1); EFM = eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd (g MS microbiana/kg de carboidrato degradado).

É importante ressaltar que o amido adicionado em todos os tratamentos mostrou efeitos deletérios sobre a degradação da FDNpd na presença de PV no meio de incubação. Provavelmente, a adição de fontes energéticas de rápida degradação pode reduzir a degradação dos carboidratos fibrosos do capim-buffel.

Observa-se na Tabela 7, que as maiores frações efetivamente degradadas foram constatadas no tratamento com 0% de PV nas taxas de passagem 0,035 e 0,05 h⁻¹. Na taxa de passagem 0,020 h⁻¹ os tratamentos mais eficientes foram 25 e 75% de PV. O NNP advindo da uréia apresenta como característica a rápida degradação no rúmen, podendo assumir que este composto é 100% degradado. A maximização na utilização da uréia em associação com carboidratos de rápida a média fermentação resulta em um aumento da fração degradada da FDN em taxas de passagens menores, uma vez que a fibra fica mais tempo retida no rúmen, favorecendo um maior ataque pelos microrganismos ruminais. Em taxas de passagens mais elevadas ocorre um menor tempo de retenção da partícula da fibra no rúmen, havendo um menor tempo para que os microrganismos ruminais degradem a fibra. Uma elevação na taxa de passagem naturalmente reduz a digestibilidade dos componentes mais resistentes à degradação, como fibra e amido de baixa degradabilidade ruminal (RUSSEL e WILSON, 1996).

Tabela 7 - Estimativas da fração efetivamente degradada da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (% da FDNpd) em função de fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.

Tratamento ²	Taxa de passagem ruminal (h ⁻¹) ¹		
	0,020	0,035	0,050
0%	41,66	35,90	31,26
25%	41,94	35,39	30,26
50%	41,45	34,27	28,81
75%	40,94	33,72	28,26
100%	41,38	33,93	28,33
CNF	40,56	33,69	28,42

¹0% , 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de nitrogênio não protéico por proteína verdadeira;¹ Assumindo-se cinética de deslocamento ruminal de sólidos com ordem gama-1. ² 100% de uréia e amido; 75% de uréia e 25% de caseína e amido; 50% de uréia e 50% e amido; 25% de uréia e 75% caseína e amido; 100% de caseína e amido; Amido: 0% de fonte de nitrogênio mais amido.; Amido: 0% de fonte de nitrogênio mais amido.

De forma geral, observa-se no presente trabalho, que a degradação dos componentes fibrosos foi mais acentuada quando o amido foi combinado com maiores proporções de NNP, contrariamente, foram observadas menores taxas de degradação quando o amido foi combinado com maiores concentrações de PV, reduzindo a degradação da fibra. Quando grande quantidade de energia é degradada ultrapassando a velocidade de assimilação da amônia, gerada pela degradação da proteína dietética ou pelo hidrólise da uréia, o crescimento microbiano e a eficiência no aproveitamento dos componentes fibrosos decrescem, devido a fermentação incompleta, onde os microrganismo que utilizam amônia para crescimento celular, utilizavam ATP para acumulo de carboidrato e não para síntese de proteína microbiana (HOOVER, 1986; NOCECK e RUSSEL, 1988)

A degradação da FDN, ao término do ensaio de incubação, demonstrou efeito linear decrescente com degradação máxima da FDN quando se tinha somente NNP (65,71% DFDN) e menor degradação quando se tinha 100% de PV (61,92% DFDN) como fonte de nitrogênio). O ponto de intercessão, no gráfico, equivale ao tratamento

sem fonte de composto nitrogenado e com amido, plotado no gráfico para efeito de comparação (Figura 2).

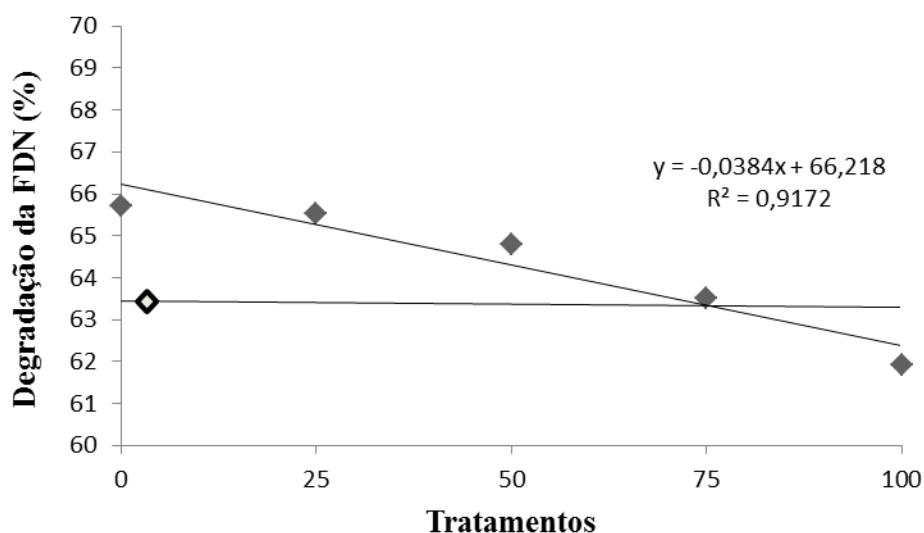


Figura 2- Degradação da FDN (%) em relação a fontes de compostos nitrogenados associado a uma fonte de carboidrato não fibroso.

Na presença de fontes de carboidratos não fibrosos, a inclusão de fontes de proteína verdadeira parece favorecer mais o crescimento dos microrganismos fermentadores de carboidratos não fibrosos do que de fibrosos e, conseqüentemente, ocorre a menor digestão da fibra em detergente neutro advindo do Capim-buffel.

Porém, observa-se, quando se compara as taxas de degradação do carboidrato fibroso do capítulo anterior (Capítulo 3) com o presente, a presença de CNF estimula uma maior degradação da fração fibrosa. Possivelmente, o fornecimento de uma fonte de CNF em sincronização com fontes de nitrogênio maximiza a eficiência microbiana e a diminuição da perda de nitrogênio em forma de amônia e da energia dos carboidratos, promovendo melhoria na digestão da fração fibrosa da forragem de baixa qualidade (COSTA et al., 2015).

CONCLUSÕES

A utilização de nitrogênio não protéico, como única fonte de nitrogênio para microrganismos ruminais, associado a uma fonte de carboidrato não fibroso, otimiza a

degradação da fibra em detergente neutro e o crescimento microbiano do capim-buffel com baixo teor protéico *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 9-21, 2005.

BARONI, C.E.C.; LANA, R.P.; MANCIO, A.B. Consumo e digestibilidade de nutrientes em novilhos suplementados e terminados em pasto, na seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.365-372, 2010.

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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BOWEN, M. K.; POPPI, D. P.; McLENNAN, S. R. Effect of quantity and source of rumen nitrogen on the efficiency of microbial protein synthesis in steers consuming tropical forage. **Animal Production Science**, Online Early, 7p. 2016.

COSTA, N. L.; MONTEIRO, A. L. G.; SILVA, A. L. P; MORAES, A.; GIOSTRI, A. F.; STIVARI, T. S. S.; GILAVERT, S.; BALDISSERA, T. C.; PIN, E. A. Considerações sobre a degradação da fibra em forragens tropicais associada com suplementos energéticos ou nitrogenados. **Archivos de Zootecnia**, v.64, p.31-41, 2015.

COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M. F.; HENRIQUES, L. T.; MANTOVANI, H. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente

neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.494-503, 2008.

COSTA, V. A. C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; HENRIQUES, L. T.; MANTOVANI, H. C. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1803-1811, 2009.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

CHAPAVAL, L.; MELOTTI, L.; ROSSI JÚNIOR, P.; OLIVINDO, C. S; RÊGO, J. P. A. Relação volumoso: concentrado sobre as concentrações ruminais de amônia, pH e ácidos graxos em vacas leiteiras mestiças. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p. 18-28, 2008.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SAMPAIO, C. B.; SOUZA, M. A.; LAZZARINI, Í.; DETMANN, K. S.C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using *Michaelis–Menten* kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136–146, 2009.

DETMANN, E.; VALENTE E. E. L.; BATISTA, E.D.; HUHTANEN, P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, v. 162, p. 141–153, 2014.

DEVANT, M.; FERRET, A.; CALSAMIGLIA, S.; CASALS, R.; GASA, J. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1944-1953, 2001.

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**. Madison: American Society of Agronomy, p.682-756. 1994.

EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B. A.; JONHSON, 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.

FARENZENA, R.; KOZLOSKI, G.V.; MEZZOMO, M.P.; FLUCK, A.C. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, v.152, p.325–332, 2014.

FERNANDES, R.M. **Relação nitrogênio não proteico e proteína verdadeira em suplementos na recria de bezerros Nelore**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 88p. 2014.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal Dairy Science**, v.69, n.10, p.2755-2766, 1986.

IMAIZUMI, H.; SANTOS, F. A. P.; PIRES, A. V.; NUSSIO, C. M. B.; BARNABÉ, É. C.; JUCHEM, S. O. Avaliação de diferentes fontes e teores de proteína na dieta sobre o desempenho, fermentação ruminal e parâmetros sanguíneos de vacas da raça Holandesa em final de lactação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.24, n.4, p.1031-1037, 2002.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumosos ou concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.

LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; DINIZ, R. F.; OLIVEIRA, F. A.; SILVA, P. T.; REIS, W. L. S. Nutritional performance of cattle grazing on low-quality tropical forage supplemented with nitrogenous compounds and/or starch. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 9, p. 664-674, 2013.

LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; SAMPAIO, C.B.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, M.; OLIVEIRA, F. A. Dinâmicas de trânsito e degradação da

fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.61, n.3, p.635-647, 2009.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.

LOPES, L.S.; MACHADO NETO, O.R.; ALVES, M.C.L. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **Pubvet**, v.4: Art 832, 2010.

MALAFAIA, P.A.M., VALADARES FILHO, S.C., VIEIRA, R.A.M.; BORGES, A. Determinação e cinética ruminal das frações protéicas de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1243-1251, 1997.

MARTÍNEZ, M. E.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; RAMOS, S.; CARRO, M. D. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. **Journal Dairy Science**, v.93, n.8, p.3684-3698. 2010.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feeds. I. effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid 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.

MOSS, A. R; JOUANY J. P; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales Zootechnie**, v.49, n.3, p.231-253, 2000.

NOCECK, J. E.; RUSSEL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2070-2107, 1988.

NOGUEIRA, K. A.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LEME, P. R.; VALINOTE, A. C.; LUZ, S.; CUNHA, J. A. Substituição do milho pela polpa de citros sobre a fermentação

ruminal e protozoários ciliados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 123-127, 2005.

OLIVEIRA JUNIOR, R. C.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; FERNANDES, J. J. R.; SANTOS, F. A. P. Digestibilidade de nutrientes em dietas de bovinos contendo uréia ou amiréia em substituição ao farelo de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.173-178, 2004.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements of feed in weighted according to rate passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.

PAEZ-BERNAL, D. M. **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 (Mestrado em Zoorecnia), Universidade Federal de Viçosa (UFV), 52 p. 2007.

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.3, p. 24-32, 2005.

PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society**, Series B, v.163, p.224-231, 1965.

REZAIL, F.; DANESH, M. M.; HERAVI, M. A. Effects of the source of non-fiber carbohydrates on in vitro first order ruminal disappearance kinetics of dry matter and NDF of various feeds. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 12, n.3, p. 222-229, 2011.

RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES, S.C.; CECON, P.R. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de Capim-Tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n.2, p. 581-588, 2001.

RIHANI, N.; GARRET, W.N.; ZINN, R.A. Influence of level of urea and method of supplementation on characteristics of digestion of higher-fiber diets by sheep. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1656-1665, 1993.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

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.; MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.4, p.347-55, 2002.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH. **Journal of Dairy Science**, v.79, p. 1503-1509, 1996.

SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; LAZZARINI, I.; Souza, M. A.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.560-569, 2009.

SILVA, C.V.; LANA, R.P.; CAMPOS, J.M.S. Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de vacas leiteiras em pastejo com dietas com diversos níveis de concentrado e proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1372-1380, 2009.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**.v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

SOUZA, M.A.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; SAMPAIO, C.B.; LAZZARINI, Í.; VALADARES FILHO, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral

detergent fibre in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.6, p.1299-1310, 2010.

TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal Animal Science**, v.78, n.6, p.1648-1658, 2000.

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. Development of a comprehensive system of feeds analysis and its applications to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephantgrass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Os carboidratos representam até 80% da dieta dos ruminantes e são muito importantes para nutrição destes animais, pois atendem boa parte de suas exigências em energia, na forma de AGV e aminoácidos, na forma de proteína microbiana.

Forrageiras tropicais, que se apresentam em estágio de maturidade avançado, têm em sua composição um alto teor de fibra e um baixo teor de proteína, necessitando de adições de compostos nitrogenados para suprir a deficiência de nitrogênio destas forragens, melhorando a degradação dos componentes fibrosos. A fibra representa a fração dos carboidratos de digestão lenta ou indigestível do alimento, ocupando um maior espaço no rumen, impondo algumas limitações ao consumo voluntário de matéria seca.

A adição de compostos nitrogenados proporciona uma melhoria no aporte de suprimentos para os microrganismos ruiminais, principalmente os microrganismos que degradam fibra e utilizam a amônia para crescimento celular, melhorando o ambiente ruminal e otimizando o crescimento microbiano em função da utilização dos compostos fibrosos da forragem.

É importante salientar a necessidade de sincronização entre as fontes de carboidratos não fibrosos e as fontes de nitrogênio, visando a maximização da eficiência microbiana sobre o aproveitamento da fibra com o intuito de reduzir a perda de nitrogênio em forma de amônia e da energia dos carboidratos, promovendo melhoria na digestão da matéria seca e, especialmente, da fração fibrosa da forragem.