



## 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<sup>1</sup>

Edenio Detmann<sup>2</sup>, Augusto César de Queiroz<sup>2</sup>, Karina Zorzi<sup>3</sup>, Hilário Cuquetto Mantovani<sup>4</sup>,  
Geraldo Fábio Viana Bayão<sup>3</sup>, Matheus Pinto Coelho Gomes<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq, FAPEMIG (PPM) e INCT Ciência Animal.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. Pesquisador do CNPq e do INCT-Ciência Animal.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.

<sup>4</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Pesquisador do CNPq.

<sup>5</sup> Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar a dinâmica da degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com compostos nitrogenados em diferentes relações proteína verdadeira:nitrogênio não-proteico (NNP). Amostra de capim-braquiária colhida durante a estação seca foi utilizada como forragem basal. Como fontes de proteína verdadeira e NNP, utilizaram-se a caseína e a mistura ureia:sulfato de amônia (U:SA; 9:1), respectivamente. O suplemento base para a definição dos demais foi constituído da adição de caseína ao meio de incubação de forma a elevar o teor de proteína bruta (PB) da forragem basal até 8%, com base na matéria seca. Os demais suplementos foram construídos a partir da substituição fracional (0, 1/3, 2/3 e 1) da PB da caseína por equivalentes proteicos da mistura U:SA, incluindo-se tratamento controle (forragem). Os tratamentos foram avaliados em ambiente ruminal simulado por incubação *in vitro* em diferentes tempos de incubação: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. O procedimento foi repetido três vezes, totalizando três avaliações por tempo de incubação para cada tratamento. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de FDN e interpretados por intermédio de modelo logístico não-linear. A suplementação proteica elevou em 56,8 a 96,0% a taxa de degradação da FDN potencialmente degradável (kFDNpd) em comparação ao suplemento controle e reduziu de 4,5 a 7,4 horas as estimativas de latência discreta. A utilização exclusiva de ureia elevou em 15,9% a estimativa de kFDNpd em relação à suplementação exclusiva com caseína. Contudo, valores máximos de kFDNpd e eficiência microbiana foram verificados sob a relação 2/3 PB U:SA:1/3 PB caseína. O balanceamento do suplemento de forma a prover 1/3 da PB a partir de proteína verdadeira e 2/3 da PB a partir de nitrogênio não-proteico otimiza a degradação da FDN de forragem de baixa qualidade.

Palavras-chave: capim-braquiária, caseína, taxa de degradação, ureia

## *In vitro* degradation of neutral detergent fiber of low-quality tropical forage according to supplementation with true protein and (or) non-protein nitrogen

**ABSTRACT** - The objective was to evaluate *in vitro* degradation of neutral detergent fiber (NDF) of low quality tropical forage according to supplementation with nitrogenous compounds at different true protein:non-protein nitrogen (NPN) ratios. A sample of signal grass harvested at dry season was used as basal forage. Casein and the mixture urea:ammonium sulfate (U:AS, 9:1) were used as true protein and NPN source, respectively. The basal supplement for the other was defined by adding casein the incubation medium, in order to raise crude protein (CP) level of the basal forage up to 8%, on dry matter basis. The other supplements were defined from the fractional replacement (0, 1/3, 2/3 and 1) of casein CP by U:AS protein equivalents. A control treatment (forage without supplementation) was also evaluated. The treatments were evaluated by *in vitro* simulated ruminal environment, following the incubation times: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 hours. The procedure was repeated three times, totaling three evaluations by incubation time for each treatment. Incubation residues were evaluated for NDF contents and interpreted through a non-linear logistic model. Protein supplementation increased 56.8 to 96.0% the degradation rate of potentially degradable NDF (kpdNDF) in relation to control and decreased discrete lag around 4.5 to 7.4 hours. The exclusive supplementation with urea increased by 15.9% the kpdNDF estimates compared to exclusive supplementation with casein. It was observed maximum kpdNDF and microbial growth at 2/3 CP of U:AS:1/3 CP of casein. Supplements which provide 1/3 of CP protein from true protein and 2/3 from non-protein nitrogen can optimize the degradation of NDF of low-quality forage.

Key Words: ammonia nitrogen, casein, degradation rate, signal grass, urea

## Introdução

Os pastos tropicais, especialmente na época da seca, raramente constituem dieta balanceada, no senso que seus constituintes orgânicos e inorgânicos estejam presentes em concentrações e proporções que melhor satisfaçam às necessidades dos animais (Paulino et al., 2001). Neste período do ano, a forragem apresenta baixa qualidade nutricional, com alta lignificação da fibra e baixos teores de proteína bruta (PB), geralmente abaixo de 7 a 8%, valor limitante para que os microrganismos ruminais apresentem plena capacidade de utilização dos carboidratos fibrosos da forragem basal (Lazzarini et al., 2009; Sampaio et al., 2009).

Nessa situação, na qual a dieta ou a reciclagem endógena de nitrogênio não atendem aos requerimentos microbianos, ocorre limitação no crescimento e na atividade dos microrganismos (Sniffen et al., 1993), com conseqüente queda na digestibilidade da fibra, o que resulta em redução no consumo de matéria seca (MS) e baixo desempenho animal (Detmann et al., 2009; Figueiras et al., 2010).

Em tal condição, os animais passam por carências múltiplas (Paulino et al., 2008), sendo que a proteína (ou compostos nitrogenados) assume papel prioritário, tornando-se necessária a suplementação dos animais, a qual implica mudanças no consumo de forragem, na disponibilidade de energia dietética, na magnitude dos *pools* de precursores bioquímicos do metabolismo e no desempenho animal. Desta forma, amplia-se a taxa de degradação ruminal e a síntese de proteína microbiana, resultando assim em maior aporte de nutrientes para o intestino e ácidos graxos voláteis para o metabolismo energético (Detmann et al., 2004).

Contudo, em recentes estudos conduzidos em condições tropicais verificou-se que a alteração do perfil de origem dos compostos nitrogenados presentes nos suplementos (proteína verdadeira ou nitrogênio não-proteico) pode implicar alterações sobre a utilização da fibra em detergente neutro (FDN) da forragem basal (Paez-Bernal, 2007), sobre o consumo voluntário e produção microbiana, bem como sobre o desempenho animal durante o período seco do ano (Acedo et al., 2007; Moraes et al., 2009). Este comportamento parece refletir melhor adequação do perfil dos compostos nitrogenados suplementares no tocante às exigências microbianas (Maeng & Baldwin, 1976; Paez-Bernal, 2007; Zorzi et al., 2009).

Todavia, há necessidade de mais estudos para se avaliar os benefícios da suplementação com compostos nitrogenados de diferentes origens sobre a dinâmica de degradação da FDN quando a produção se baseia em forragens de baixa qualidade.

De acordo com os pressupostos aqui apresentados, definiu-se como objetivo neste trabalho avaliar a dinâmica da degradação *in vitro* da FDN de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) de baixa qualidade em função da suplementação com compostos nitrogenados em diferentes relações proteína verdadeira:nitrogênio não-proteico.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A forragem utilizada nos procedimentos de avaliação *in vitro* foi proveniente de amostras de *Brachiaria decumbens* Stapf. coletadas por intermédio de cortes rente ao solo em piquetes sob pastejo contínuo do setor de Gado de Corte do DZO-UFV, entre os meses de julho a setembro de 2007 (período da seca).

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

Os suplementos foram constituídos por diferentes fontes de compostos nitrogenados, sendo utilizado como fonte de proteína verdadeira a caseína e de nitrogênio não-proteico a mistura ureia:sulfato de amônia (U:SA – 9:1). As seguintes fontes foram utilizadas: caseína oriunda do leite bovino (pó purificado; Sigma C-5890), ureia PA (Merck 108487) e sulfato de amônio PA (Merck 101217) (Tabela 1).

O suplemento base para a definição dos demais foi constituído da adição de caseína ao meio de incubação de forma a elevar-se o teor de PB da forragem basal ao nível de 8%, com base na MS. Este patamar foi definido em função das recomendações de Lazzarini et al. (2009) e Sampaio et al. (2009), como sendo o nível mínimo de compostos nitrogenados para que os microrganismos apresentem plenas condições para degradação dos carboidratos fibrosos da forragem basal.

A partir desta definição, os suplementos foram construídos a partir da substituição fracional (0, 1/3, 2/3 e 1)

Tabela 1 - Composição da forragem e dos componentes dos suplementos

Item	Forragem	Caseína	Ureia:sulfato de amônio (9:1)
Matéria seca (% matéria natural)	47,91	90,13	98,21
Matéria orgânica (% MS)	92,82	97,87	99,76
Proteína bruta (% MS)	4,13	87,89	261,00
Extrato etéreo (% MS)	0,49	0,56	-
Fibra em detergente neutro (% MS)	74,27	-	-
FDNcp (% MS)	69,02	-	-
PIDN (% PB)	49,23	-	-
Carboidratos não-fibrosos (% MS)	19,18	9,42	-
Fibra em detergente ácido (% MS)	42,05	-	-
FDAcP (% MS)	38,22	-	-
PIDA (% PB)	21,38	-	-
Lignina (% MS)	7,21	-	-

FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína. PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; FDAcp = fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido.

da PB oriunda da caseína por PB oriunda da mistura U:SA, acrescendo-se, ainda, tratamento controle (somente forragem). Desta forma, cinco foram os tratamentos avaliados: forragem (controle); forragem + caseína; forragem + 2/3 da PB oriunda da caseína e 1/3 da PB oriunda da mistura U:SA; forragem + 1/3 da PB oriunda da caseína e 2/3 da PB oriunda da mistura U:SA; forragem + U:SA.

Alíquotas de forragem (350 mg de MS) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Cinco alíquotas de 300 mL de solução de McDougall (McDougall, 1949) foram preparadas em frascos erlenmeyer, procedendo-se ao ajustamento do pH para 6,8 por aspersão com dióxido de carbono. A cada frasco, adicionou-se caseína ou U:SA de forma a se fornecer os níveis de compostos nitrogenados referentes a cada tratamento. Procedeu-se à transferência de 28 mL de solução tampão para cada frasco contendo forragem, segundo os tratamentos (Tabela 2), os quais foram mantidos em sala climatizada (39°C) para hidratação das amostras.

Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de um bovino doador, fistulado no rúmen, mantido nas proximidades da sala de incubação. O animal doador foi alimentado *ad libitum* com silagem de cana de açúcar, sendo submetido a jejum de alimentos (12 horas) anteriormente à coleta. A alimentação base do

animal doador, em conjunto com o período de jejum, visou à obtenção de inóculo ruminal com características similares a animais mantidos em pastos tropicais durante o período seco, sem suplementação. O animal teve disponibilidade irrestrita de água e mistura mineral completa (6% de fósforo).

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

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

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

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidos à mensuração do pH com potenciômetro digital, sendo o conteúdo filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes (porosidade grossa). A fração líquida foi reservada em recipientes de polietileno, aos quais acrescentou-se 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1), sendo armazenados a -20°C para posterior análise da concentração de nitrogênio amoniacal (NA).

Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais se adicionaram 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Depois de vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de forma a se extrair todos os componentes solúveis em detergente neutro (método de micro extração; Pell & Schofield, 1993). Após esse tratamento, procedeu-se novamente à filtração

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

Fonte proteica	Relação proteica				
	Forragem	1	2/3	1/3	0
Caseína					
Ureia		0	1/3	2/3	1
Forragem (mg) <sup>1</sup>	350	350	350	350	350
Caseína (mg) <sup>1</sup>	0	15,4	10,2	5,1	0
U:SA (9:1) (mg) <sup>1</sup>	0	0	1,7	3,5	5,2
Inóculo ruminal (mL)	7	7	7	7	7
Tampão de McDougall (mL)	28	28	28	28	28

<sup>1</sup> Com base na matéria seca.

sob vácuo e lavagem seqüencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não-ventilada (105°C/16 horas).

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

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

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

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

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

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h<sup>-1</sup>).

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

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

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDNpd (h<sup>-1</sup>) para os casos em que o modelo re-parametrizado for utilizado (Equação 2).

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

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

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

Os valores de t<sub>i</sub> foram obtidos segundo as descrições de Van Milgen et al. (1991) (Equações 1 e 2, respectivamente):

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

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

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

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

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h<sup>-1</sup>).

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

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

em que: Y = eficiência microbiana (g células × g<sup>-1</sup> carboidratos degradados); m = exigência de manutença das bactérias (g carboidratos × g<sup>-1</sup> células × h<sup>-1</sup>); e Y<sub>m</sub> = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato (g células × g<sup>-1</sup> carboidratos degradados).

Adotou-se como referência ao parâmetro Y<sub>m</sub> o valor de 0,4 g células × g<sup>-1</sup> carboidratos degradados e para m o valor de 0,05 g carboidratos g<sup>-1</sup> células × h<sup>-1</sup>, conforme especificações de Russell et al. (1992).

Ressalta-se que as estimativas para o parâmetro Sgr foram obtidas com base nos valores médios gerais das frações U (46,81 ± 3,24) e I (53,19 ± 3,24), sob o pressuposto de estas serem características únicas e exclusivas do substrato (forragem) (Detmann et al., 2008).

As amostras da fração líquida, depois de descongeladas, foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante analisado quanto aos teores de NA, segundo método colorimétrico de Chaney & Marbach (1962).

Os modelos ajustados para os perfis de degradação em função dos diferentes suplementos foram comparados de forma descritiva. Por sua vez, os valores de pH e concentração de NA obtidos para os diferentes tempos de incubação foram avaliados segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando-se cada partida de incubação como bloco, em esquema fatorial 5 × 10 (cinco tratamentos e dez tempos de incubação). Quando pertinente, as médias de pH e concentração de NA foram comparadas pelo teste Tukey-Kramer. Todos os procedimentos estatísticos, tanto lineares, como não-lineares, foram conduzidos por intermédio do programa SAS (*Statistical Analysis System*), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

## Resultados e Discussão

A suplementação proteica elevou de 56,8 a 96,0% (média de 76,5%) a taxa de degradação da FDNpd em comparação ao controle. De forma similar, a suplementação

proteica causou redução de 4,5 a 7,4 horas sobre as estimativas de latência discreta (Tabela 3).

Em experimento similar *in vitro*, Costa et al. (2008) verificaram aumento de 68,5% sobre a taxa de degradação da FDNpd de capim-braquiária de baixa qualidade com a suplementação exclusiva com caseína, corroborando os resultados aqui obtidos.

O incremento na taxa de degradação da FDNpd por intermédio da adição de compostos nitrogenados reitera a natureza prioritária destes na suplementação de animais mantidos em pastagens durante a estação seca, situação na qual a extração de energia a partir dos carboidratos fibrosos torna-se limitada por deficiência de compostos nitrogenados para a síntese dos sistemas enzimáticos dos microrganismos ruminais (Lazzarini et al., 2009; Sampaio et al., 2009; Detmann et al., 2009).

Por outro lado, a latência discreta estima por aproximação o tempo necessário para que os eventos preparatórios às atividades de degradação ocorram, envolvendo aspectos físicos (e.g. hidratação) e microbiológicos (e.g. fixação ao substrato, síntese de enzimas, etc). Desta forma, a redução na latência confirma que o meio se torna mais adequado ao crescimento microbiano com a inclusão de compostos nitrogenados (Detmann et al., 2009).

Os efeitos sobre a degradação ruminal da fibra de forragem tropical de baixa qualidade com a suplementação com compostos nitrogenados caracterizam a dinâmica de degradação da FDN no ambiente ruminal como processo de segunda ordem (ou processo cinético de *Michaelis-Menten*) (Lazzarini et al., 2009; Sampaio et al., 2009), ou seja, a carência de sistemas enzimáticos em níveis inferiores a 7-8% de PB (referência adotada neste trabalho para a suplementação) implica reações de ordem zero (definidas pela deficiência de enzimas), as quais são convertidas em reações de primeira ordem (definidas pelas características do substrato) à medida que compostos nitrogenados são adicionados ao meio. Desta forma, a suplementação com compostos nitrogenados implica ampliação dos sistemas enzimáticos microbianos no ambiente ruminal (Detmann et al., 2009).

De fato, a suplementação com compostos nitrogenados elevou em 55,9 a 95,2% a taxa de crescimento específico de microrganismos e em 34,4 a 52,8% a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd (Tabela 4), o que indica indiretamente maior disponibilidade enzimática para a degradação da fibra basal.

Um dos aspectos envolvidos na melhor adequação do meio de crescimento no tocante à produção de enzimas microbianas é a disponibilidade de nitrogênio amoniacal

Tabela 3 - 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 dos tratamentos

Fonte proteica <sup>1</sup>	Relação proteica				
	Forragem	1	2/3	1/3	0
Caseína		1	2/3	1/3	0
Ureia		0	1/3	2/3	1
c (h <sup>-1</sup> )	—	—	0,0232 ± 0,0156	—	0,0246 ± 0,0334
p (h <sup>-1</sup> )	—	—	0,1028 ± 0,1105	—	0,0610 ± 0,0932
λ (h <sup>-1</sup> )	0,0227 ± 0,0048	0,0356 ± 0,0080	—	0,0445 ± 0,0049	—
c' (h <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0,0135 ± 0,0028	0,0212 ± 0,0047	—	0,0265 ± 0,0029	—
VRTD (%) <sup>3</sup>	100,0	156,8	171,4	196,0	181,7
VRTD (%) <sup>4</sup>	—	100,0	109,3	125,0	115,9
L (h)	12,4	7,9	5,0	6,3	6,9
DPA	3,67	5,41	3,42	3,60	3,28

<sup>1</sup> c = 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).

<sup>2</sup> Estimado segundo propriedades da distribuição gama-2: c' = 0,59635λ.

<sup>3</sup> Valor relativo da taxa de degradação em relação à forragem.

<sup>4</sup> Valor relativo da taxa de degradação em relação à caseína.

Tabela 4 - Parâmetros secundários associados ao crescimento microbiano sobre a fibra em detergente neutro potencialmente degradável em função dos tratamentos

Fonte proteica	Relação proteica <sup>2</sup>				
	Forragem	1	2/3	1/3	0
Caseína		1	2/3	1/3	0
Ureia		0	1/3	2/3	1
μ <sup>1</sup>	0,4330(100,0)	0,6790(156,8)	0,7794(180,0)	0,8488(196,0)	0,6904(159,4)
Sgr <sup>1</sup>	0,0084(100,0)	0,0131(155,9)	0,0150(178,6)	0,0164(195,2)	0,0133(158,3)
EFM <sup>1</sup>	117,8(100,0)	158,3(134,4)	171,6(145,7)	180,0(152,80)	159,9(135,7)

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

<sup>2</sup> Os valores entre parênteses indicam o valor relativo em relação ao tratamento controle (forragem).

(Detmann et al., 2009), o qual é utilizado preferencialmente como precursor para síntese de proteína pelos microrganismos fibrolíticos (Russell et al., 1992). Neste contexto verificou-se que a suplementação proteica elevou ( $P<0,05$ ) a disponibilidade de nitrogênio amoniacal no meio de incubação (Tabela 5; Figura 1).

Os valores médios observados encontram-se abaixo do patamar mínimo de 4 a 5 mg/dL recomendado por Satter & Slyter (1974) para o adequado crescimento microbiano sobre carboidratos. Contudo, em se tratando de experimento *in vitro*, ressalta-se que não são observados eventos de reciclagem de nitrogênio amoniacal como no ambiente ruminal *in vivo*. Assim, menores estimativas de nitrogênio amoniacal em condições de forragem de baixa qualidade *in vitro* podem ser esperadas. Contudo, afirma-se que os aspectos comparativos entre tratamentos (precisão experimental) foram mantidos, garantindo a validade das inferências comparativas. Não foram observados, no entanto, efeitos de suplementos ou tempo de incubação ( $P>0,05$ ) sobre o pH. Todos os valores observados

permaneceram acima dos limites mínimos para a atividade fibrolítica (Russell & Dombrowski, 1980; Mould et al., 1983).

Nos tratamentos com suplementação, a utilização exclusiva de ureia elevou em 15,9% a estimativa da taxa de degradação da FDNpd em relação à suplementação exclusiva com caseína (Tabela 3). Uma das possíveis causas deste comportamento são as melhores estimativas de concentração de nitrogênio amoniacal no meio produzidas pela ureia, em comparação à caseína (Tabela 5). Segundo Zorzi et al. (2009), a ureia é mais efetiva em implementar níveis de nitrogênio amoniacal em comparação à caseína em condições de suplementação similar em termos de equivalentes proteicos.

A menor taxa de degradação da FDN utilizando-se proteína verdadeira em comparação à ureia (Tabela 3) é denominada “efeito proteína”, sendo comumente relatado em condições de forragens tropicais de alta qualidade (Paez-Bernal, 2007; Paulino et al., 2008; Costa et al., 2009; Zorzi et al., 2009).

Contudo, segundo Costa et al. (2009), a ocorrência do efeito proteína, embora evidente sobre forragens de alta qualidade, não seria observada em forragem de baixa qualidade, tendo em vista a deficiência global de compostos nitrogenados no meio. Assim, a adição de proteína verdadeira nessas condições geraria maior benefício pelo fornecimento de compostos nitrogenados, em comparação ao estímulo para o crescimento de espécies produtoras de inibidores.

Contudo, os resultados aqui obtidos evidenciam que o “efeito proteína” também é observado sob condições de forragem de baixa qualidade. Contudo, corroborando parcialmente as afirmativas de Costa et al. (2009), o efeito positivo da suplementação com proteína verdadeira sob o controle quanto à taxa de degradação da FDNpd (+56,8%)

Tabela 5 - Concentração de nitrogênio amoniacal do meio em função dos tratamentos

Relação proteica		Nitrogênio amoniacal (mg/dL)
Caseína	Ureia	
Forragem		0,14d
1	0	1,63c
2/3	1/3	2,54b
1/3	2/3	3,21a
0	1	3,77a
CV (%)		35,3

<sup>1</sup> Médias na coluna, seguidas por letras diferentes, são diferentes ( $P<0,05$ ) pelo teste Tukey-Kramer.

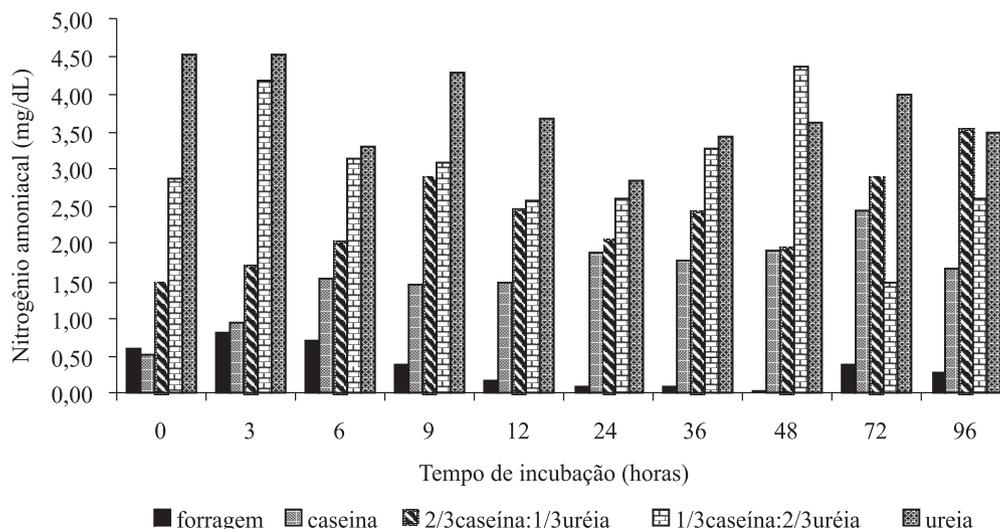


Figura 1 - Nitrogênio amoniacal no meio (mg/dL) em função dos tratamentos.

apresenta-se de maior magnitude em relação à substituição completa da proteína verdadeira por ureia (+15,9%).

Alguns autores teorizaram em trabalhos prévios que as possíveis causas do “efeito proteína” poderiam residir sobre a produção de compostos inibidores (bacteriocinas) por microrganismos não-fibrolíticos, a qual seria favorecida pelo aumento no suprimento de aminoácidos no meio (Paez-Bernal, 2007; Costa et al., 2009; Zorzi et al., 2009). Por outro lado, alterações na participação de sistemas enzimáticos ATP-dependentes para assimilação de amônia do meio poderiam interferir sobre o crescimento microbiano a partir da menor concentração de amônia propiciada pela suplementação com proteína verdadeira (Paulino et al., 2008).

Contudo, em trabalho recente direcionado à avaliação das causas do “efeito proteína”, Carvalho (2009) não verificou produção de compostos inibidores no meio. Segundo os resultados obtidos por este autor, a ocorrência do “efeito proteína” estaria associada à maior proliferação de microrganismos não-fibrolíticos causada pelo maior suprimento de proteína verdadeira. Isso favoreceria o crescimento destas espécies em detrimento aos microrganismos fibrolíticos, que são dependentes de fontes de compostos nitrogenados de mais fácil assimilação, como amônia e aminoácidos livres. Assim, a assimilação de peptídeos pelas bactérias não-fibrolíticas diminui a competitividade das fibrolíticas por compostos nitrogenados (Carvalho, 2009).

Embora a substituição total da caseína por ureia tenha elevado a taxa de degradação da FDNpd, a avaliação do perfil de substituição permitiu evidenciar valores máximos de taxa de degradação e de eficiência microbiana sob a relação 2/3 U:SA:1/3 caseína (Tabelas 3 e 4).

De forma similar, Paez-Bernal (2007) encontrou valores máximos de taxas de degradação da FDNpd de forragem tropical de alta qualidade na mesma relação observada neste estudo.

Os processos fibrolíticos e do crescimento das bactérias que os realizam devem ser enfatizados na importância das interações com outras espécies microbianas, as quais provêm compostos essenciais, como vitaminas do complexo B e ácidos graxos de cadeia ramificada, os quais funcionam como precursores de aminoácidos essenciais, ácidos graxos estruturais e alguns aldeídos (Bryant, 1973).

Assim, em comparação direta, os suplementos com a suplementação exclusiva com ureia ou com 1/3 da PB oriunda da caseína, mesmo conferindo concentrações similares de NA (Tabela 5), implicaram diferenças sobre a taxa de degradação da FDNpd, com vantagens para a relação 2/3 U:SA: 1/3 caseína. Isto pode indicar que haveria no meio pequena deficiência de proteína verdadeira degradável,

cujas adições à dieta poderia levar a melhorias na produção microbiana (Hoover & Stockes, 1991), pela maior disponibilidade de substratos para síntese microbiana, como ácidos graxos de cadeia ramificada.

Assim, o equilíbrio entre fontes nitrogenadas nos suplementos pode otimizar a utilização da FDNpd de forragens tropicais de baixa qualidade, ao permitir, além do fornecimento global de compostos nitrogenados, o suprimento de peptídeos degradáveis no rúmen que permitam a ocorrência de interações positivas e/ou redução de eventos competitivos entre espécies microbianas, favorecendo o suprimento de substratos essenciais ao crescimento das bactérias fibrolíticas.

## Conclusões

A suplementação proteica melhora os aspectos relacionados à dinâmica de degradação da fibra em detergente neutro de forragem de baixa qualidade. O balanceamento do suplemento, de forma a prover um terço da proteína bruta a partir de proteína verdadeira e dois terços a partir de nitrogênio não-proteico, otimiza a degradação e o crescimento microbiano sobre a fibra em detergente neutro.

## Referências

- ACEDO, T.S.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E. et al. Níveis de uréia em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante a época seca. *Acta Scientiarum (Animal Sciences)*, v.29, p.301-308, 2007.
- BEUVINK, J.M.W.; KOGUT, J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated in ruminal fluid. *Journal of Animal Science*, v.71, p.1041-1046, 1993.
- BRYANT, M.P. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Federation Proceedings*, v.32, p.1809-1813, 1973.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, v.8, p.130-137, 1962.
- CARVALHO, I.P.C. **Avaliação causal do “efeito proteína” sobre a atividade microbiana em substratos fibrosos insolúveis**. 2009. 40f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. 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. et al. 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, p.1803-1811, 2009.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação de novilhos mestiço em pastejo durante época seca: desempenho produtivo e característica de carcaça. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.169-180, 2004.

- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6., 2008, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C. et al. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146, 2009.
- FIGUEIRAS, J.F.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F. et al. Intake and digestibility in cattle under grazing during dry season supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1303-1312, 2010.
- ELLIS, W.C., MATIS, J.H., HILL, T.M. et al. 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, 1994. p.682-756.
- HOOVER, W.H.; STOKES S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3630-3644, 1991.
- LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; SAMPAIO, C.B. et al. 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, p.635-647, 2009.
- LICITRA, G.; HERNANDES, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardizations of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MAENG, W.J.; BALDWIN, R.L. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. **Journal of Dairy Science**, v.59, p.648-655, 1976.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MORAES, E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; MORAES, K.A.K. et al. Uréia em suplementos protéico-energéticos para bovinos de corte suplementados durante o período da seca: variáveis nutricionais e ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.770-777, 2009.
- MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R.; MANN, 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.
- 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**. 2007. 49f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T. Suplementos múltiplos para recria e engorda de bovinos em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 2., 2001, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: DZO-UFV, 2001. p.187-233.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, E.E. et al. Nutrição de bovinos em pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 4., 2008, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: DZO-UFV, 2008. p.131-169.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073.
- PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society, Series B**, v.163, p.224-231, 1965.
- RUSSELL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.604-610, 1980.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; LAZZARINI, I. et al. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.560-569, 2009.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v.32, p.199-208, 1974.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.
- SNIFFEN, C.J.; BEVERLY, R.W.; MOONEY, C.S. et al. Nutrient requirements versus supply in the dairy cow: strategies to account for variability. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3160-3178, 1993.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 2515-2529, 1991.
- VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. The influence of elephant grass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.
- ZORZI, K.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C. et al. *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, p.964-971, 2009.