

MANUELA ACEVEDO CARDOZO

**AVALIAÇÃO DA FORRAGEM TROPICAL IN VITRO EM FUNÇÃO DA
SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NITROGENADOS E OU AMIDO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A173a
2016

Acevedo Cardozo, Manuela, 1991-

Avaliação da forragem tropical in vitro em função da
suplementação com compostos nitrogenados e ou amido /
Manuela Acevedo Cardozo. – Viçosa, MG, 2016.

x, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cláudia Batista Sampaio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Forragem - Degradação. 2. *Brachiaria decumbens*. 3.
Compostos nitrogenados. 4. Amido . I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação
em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.208554

MANUELA ACEVEDO CARDOZO

**AVALIAÇÃO DA FORRAGEM TROPICAL IN VITRO EM FUNÇÃO DA
SUPLEMENTAÇÃO COM COMPOSTOS NITROGENADOS E OU AMIDO**

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

APROVADO: 20 de julho de 2016.

Stefanie Alvarenga Santos

Mário Fonseca Paulino
(Coorientador)

Cláudia Batista Sampaio
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A **DEUS** por ser minha força em momentos difíceis e guiar meus caminhos, por ser tudo na minha vida.

Em memória do meu pai **Mauricio Acevedo Ocampo** pelo exemplo de força.

A minha mãe **Diana Cecilia Cardozo** pelo amor apoio incondicional, por acreditar sempre em mim, por fazer de meus sonhos os seus.

A minhas irmãs **Sara e Alejandra** por ser o meu maior tesouro.

A minha "filha" **Juliana** por ser minha maior motivação.

A **Juan** pelo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por ser o sentido da minha vida e me dar a força para seguir em frente.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por abrirem as portas e tornarem possível a realização deste trabalho.

À Universidade UNISARC Corporação Universitária Santa Rosa de Cabal.

À minha mãe pelo amor e apoio incondicional, e por fazer dos meus sonhos os seus.

Às minhas irmãs Alejandra e Sara pelo amor e apoio e por serem meu maior tesouro.

À minha sobrinha Juliana pelo amor e por ser minha maior motivação.

Às minhas tias Nena e Dickey pelo apoio quando mais precisei, e por estar sempre em suas orações.

À Professora Claudia Batista pela oportunidade, apoio, excelente orientação, motivação, por me ensinar a importância dos estudos e antes de tudo, por ser um grande ser humano.

Ao Professor Edenio Detmann, pela oportunidade e pelos ensinamentos primordiais para realização deste trabalho.

Ao Professor Mario Fonseca Paulino, pelos ensinamentos primordiais para realização deste trabalho.

À Professora Estefanie pela valiosa participação na banca.

Ao Professor Jose Ivan Montoya pelo apoio e motivação para ir para frente e realizar os meus sonhos.

Aos demais Professores do Departamento de Zootecnia, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos funcionários do departamento, Aline, Pum e especialmente ao senhor Monteiro por todas as ajudas e acolhimento, e por me fazer sentir como em meu país.

Aos colegas do laboratório Malber, Tadeu e Larissa, pela ajuda e boa convivência.

A Endi pela amizade e por fazer deste trabalho como se fosse o seu.

A Luisa, minha grande amiga e companheira de luta, pelo apoio e todos os momentos vividos em Viçosa.

A minha Família "pompis com pompis" pelo amor e apoio, por todas as experiências vividas.

A Zeze e Pam Pam pelo amor e acolhimento e por fazerem sentir-me em casa.

BIOGRAFIA

Manuela Acevedo Cardozo, filha de Mauricio Acevedo e Diana Cecilia Cardozo, nasceu no dia 30 de outubro de 1991, em Pereira Colômbia.

Em fevereiro de 2009 ingressou na Universidade UNISARC de Santa Rosa de Cabal, concluindo o curso de graduação em Zootecnia em outubro 2014.

Iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, em março de 2015, submetendo-se à defesa de dissertação em 20 de julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMO

CARDOZO, Manuela Acevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Avaliação da forragem tropical *in vitro* em função da suplementação com compostos nitrogenados e ou amido.** Orientadora: Cláudia Batista Sampaio. Coorientadores: Edenio Detmann e Mário Fonseca Paulino.

O objetivo da presente dissertação foi avaliar o efeito da suplementação com compostos nitrogenados e/ou energéticos sobre a degradação de carboidratos fibrosos e características fermentativas da forragem tropical. Utilizou-se como forragem basal de baixa qualidade feno de *Brachiaria decumbens*. Os tratamentos experimentais foram constituídos por uma mistura de ureia: sulfato de amônia (U:SA – 9:1) como fonte proteica e ou amido como fonte energética em diferentes proporções. Foram oferecidos os seguintes tratamentos: Feno: tratamento controle a base de feno 68,8 g de PB/kg de matéria seca (MS) sem adição de ureia ou amido; os outros 6 tratamentos foram delineados para elevar o teor de proteína bruta da forragem para 90 e 130 g de PB/kg de matéria e ou adicionar 10 e 20% da matéria seca do feno em amido. O procedimento de incubação foi repetido quatro vezes, para se obter quatro repetições por tempo de incubação para cada tratamento, perfazendo uma avaliação por tempo para cada tratamento em cada rodada incubando um número de 63 amostras, sendo avaliadas em total um número de 252 amostras. Os tratamentos foram avaliados por incubação *in vitro* sendo submetidos a diferentes tempos de incubação: 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas para avaliação da degradação da fibra em detergente neutro (FDN), mensuração do pH e nitrogênio amoniacal (NAR). A produção de ácidos graxos voláteis (AGV) foi avaliada nos tempos 24 e 48 horas e o metano foi avaliado no tempo 24 horas, ambos foram avaliados por cromatografia gasosa a partir das amostras obtidas nos respectivos tempos descritos. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de fibra em detergente neutro (FDN), e interpretados por intermédio de modelo não-linear logístico. Verificou-se que suplementação com compostos nitrogenados aumento as concentrações ($P<0,01$) de NAR primeiramente para tratamentos com elevação 13% de PB e segundo para 9% de PB, e que adição de amido nas diferentes proporções não afeto as concentrações, por outro lado a relação acetato: propionato foi diminuída ($P<0,01$) pela adição de amido em

percentagem de 20 %, aumentando produção de propionato ($P<0,01$) e diminuindo concentrações de acetato ($P<0,01$), as concentrações de pH foram aumentadas ($P<0,01$) pela suplementação com ureia e diminuídas ($P<0,01$) pela adição de amido no meio, com tudo a suplementação não causou efeitos na taxa fracional de degradação, fração potencialmente degradável da FDN e fração potencialmente indegradável da FDN ($P>0,05$). Assim, suplementação com compostos nitrogenados melhorou as características do meio para os microrganismos, aumentando os níveis de NAR, por outro lado a suplementação com carboidratos não fibrosos em percentagem de 20% melhorou as características da fermentação ruminal diminuindo as relações A:P.

ABSTRACT

CARDOZO, Manuela Acevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Evaluation of tropical forages in vitro as a function of supplementation with nitrogenous compounds and or starch** Adviser: Claudia Batista Sampaio. Co-advisors: Edenio Detmann and Mário Fonseca Paulino.

The aim of this thesis was to evaluate the effect of supplementation with nitrogenous and / or energetic compounds on the degradation of fibrous carbohydrates and fermentative characteristics of tropical forage. It was used as basal forage hay low quality *Brachiaria decumbens*. The treatments consisted of a mixture of urea: ammonium sulfate (U: SA - 9: 1) as protein source and starch as an energy source or in different proportions. The treatments were offered: Hay: control treatment hay base 68.8 g of CP / kg of dry matter (DM) without added urea or starch; the other 6 treatments were designed to raise the crude protein content of fodder for 90 and 130 g CP / kg of matter and or add 10 to 20% of the dry matter of hay in starch. The incubation procedure was repeated four times to obtain four replications per incubation time for each treatment, making an evaluation by time for each treatment at each round by incubating a number of 63 samples being evaluated for the total number of 252 samples. Treatments were evaluated by in vitro incubation by being under different incubation times: 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours for evaluation of fiber degradation of neutral detergent fiber (NDF), pH measurement and ammonia nitrogen (RAN). The production of volatile fatty acids (VFA) was evaluated on days 24 and 48 hours and methane was assessed at time 24 hours, both were evaluated by gas chromatography from the samples obtained in the respective times described. The incubation residues were evaluated for fiber content in neutral detergent fiber (NDF), and interpreted through logistic non-linear model. It was found that supplementation with nitrogenous compounds increase the concentrations ($P < 0.01$) of NAR primarily for treatments with high 13% CP and second to 9% CP, and adding starch in different proportions not affect the concentrations, otherwise the acetate: propionate ratio was decreased ($P < 0.01$) by addition of starch in a percentage of 20%, increasing propionate production ($P < 0.01$) and decreased acetate concentrations ($P < 0.01$), pH concentrations were increased ($P < 0.01$) by supplementation with urea and decreased ($P < 0.01$) by addition of starch in

with all supplementation caused no effect on the fractional rate of degradation, potentially degradable fraction NDF and potentially undegradable NDF ($P > 0.05$). Thus, supplementation with nitrogenous compounds through improved characteristics for microorganisms, increasing the levels of NAR other hand supplementation with non-fibrous carbohydrates percentage of 20% improved rumen fermentation characteristics of decreasing the relationship: P.

INTRODUÇÃO

Durante a estação com baixa precipitação as gramíneas tropicais apresentam declínio drástico na qualidade nutricional, refletindo baixa concentração de proteína bruta (PB), e devido ao crescimento e incremento no processo de lignificação da parede celular (Leng 1990; Detmann, 2008; Detmann et al., 2014; Sampaio et al., 2010), apresentando níveis de 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).

Esta deficiência específica, implica baixa utilização da parede celular potencialmente degradável pelos microrganismos ruminais e resulta em comprometimentos sobre o consumo de pasto e sobre o desempenho animal (Egan & Doyle, 1985; Leng, 1990; Paulino et al., 2008). Conseqüentemente, o déficit de PB e os altos níveis de lignificação afetam o consumo de matéria seca (MS), pelas condições desfavoráveis dos substratos oferecidos para os microrganismos ruminais, que dificulta a degradação de carboidratos fibrosos causando enchimento no trato digestório.

Neste contexto, PB em forragens tropicais é normalmente caracterizada pela baixa disponibilidade de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) (Satter & Slyter, 1974; Macrae et al., 1979; Lee et al., 1987; Detmann et al., 2009; Lazzarini et al., 2009; Sampaio et al., 2010), que é utilizado pelos microrganismos fibrolíticos como principal precursor nitrogenado para seu crescimento (Russell, 2002), assim, a deficiência de nitrogênio no rúmen advinda do fornecimento de forragem tropical de baixa qualidade, deve ser vista como o principal entrave ao

consumo e degradação de forragens tropicais de baixa qualidade (Egan & Doyle, 1985; Lee et al., 1987; Souza et al., 2010).

O fornecimento adicional de nitrogênio para animais consumindo forragens de baixa qualidade favorece o crescimento das bactérias fibrolíticas, aumenta a taxa de digestão e a síntese de proteína microbiana, permitindo incrementar o consumo voluntário da forragem e ampliar a extração energética a partir de carboidratos fibrosos da forragem (Paulino et al., 2006), por outro lado, a concentração de 8 mg de NAR/dL de líquido ruminal é requerida pelos microrganismos ruminais para a síntese dos sistemas enzimáticos responsáveis pela degradação dos carboidratos fibrosos da forragem basal, o que equivaleria ao fornecimento de suplementos nitrogenados de forma a elevar o nível dietético de PB a concentrações próximas a 100 g PB/kg MS (Detmann et al., 2010; Detmann et al., 2014).

Estudos em condições tropicais tem evidenciado que suplementação com compostos nitrogenados fornecidos em conjunto com compostos energéticos de rápida degradação, poderia otimizar a fermentação ruminal e a produção de proteína microbiana. Segundo Souza et al. (2010) a associação de fontes energéticas de rápida degradação ruminal aos compostos nitrogenados suplementares, em níveis nos quais não haja restrições significativas sobre o consumo voluntário, podem incrementar o desempenho animal por prover maior quantidade de proteína metabolizável resultante de incremento na assimilação de nitrogênio no rúmen.

Por outro lado, resultados obtidos em condições tropicais indicam que adição de amido em presença e ausência de compostos nitrogenados, não apresenta efeitos benéficos sobre a utilização de carboidratos fibrosos pelos

microrganismos fibrolíticos. Costa et al. (2008) verifico que suplementação com amido, afeto negativamente a degradação da FDNpd, atribuindo este efeito a competição de bactérias fibrolíticas e não fibrolíticas por substrato, chamado efeito carboidrato, aumentando a proliferação de bactérias não fibrolíticas que degradam amido (Carvalho et al., 2011).

Assim, a proporção exata e as interrelações entre compostos nitrogenados e energéticos de rápida degradação nos suplementos, sobre condições tropicais, ainda deverá ser exatamente quantificada, no tocante de não causar efeito deletérios na degradação de carboidratos fibrosos.

O tipo de carboidrato fornecido na dieta e sua degradação vai afetar diretamente a produção de AGVs, variando quantidade e proporção entre acetato:propionato principalmente. Segundo o autor Murphy et al. (1982) o tipo de substrato fermentado é determinante do tipo de AGV produzido. Neste contexto, segundo Black (1990), estudando a nutrição de ruminantes em pastejo, relatou que a proporção dos AGVs produzidos quando o animal alimenta-se somente com forragens, é de 73:20: 7 (acetato: propionato: butirato). Dessa forma, dietas a base de forragem que contem altas quantidades de carboidratos fibrosos, aumentam a proporção de acetato: propionato. Em contrapartida, o aumento na degradação de amido causa aumento na concentração total de ácidos graxos voláteis (Chen et al., 1994; Simas 1995). Em resumo, a produção de AGVs e proporção entre acetato: propionato é aumentada ou diminuída dependendo da velocidade da degradação do tipo de carboidrato oferecido.

Da mesma forma a manutenção do pH é vital para a degradação da parede celular das forrageiras, já que microrganismos ruminais encarregados de degradá-la mantêm sua atividade em ph de 6,8 a 7. Portanto, a digestão da fibra

é extremamente reduzida quando o pH do fluido ruminal for inferior a 6,2, e mínimo, quando os valores apresentados forem inferiores a 6,0 (Dixon & Stockdale, 1999).

Na adição de compostos energéticos de rápida degradação como o amido na dieta, efeitos como queda de pH têm sido relatados (Haddad & Grant, 2000). Suplementação de dietas a base de forragem com carboidratos não fibrosos, usualmente reduzem o pH ruminal e a digestão da fibra. Dessa forma, o baixo pH ruminal diminui a atividade ou o número de microrganismos celulolíticos, e até mesmo uma modesta redução no pH ruminal pode inibir severamente a digestão da celulose (Russel & Wilson, 1996).

Adicionalmente a compreensão dos processos digestivos sobre a emissão de metano também é importante, pois, a intensidade da emissão, proveniente da fermentação ruminal, depende de vários fatores como o tipo de animal, do consumo de alimentos e do grau de digestibilidade da massa ingerida. Segundo Cottle et al. (2011), as indicações para redução das emissões de metano pela pecuária estão ligadas à melhoria da dieta, à melhoria de pastagens, à suplementação alimentar, ao aumento da capacidade produtiva dos animais e à outras medidas que refletem na melhor eficiência produtiva e resultam em ciclos de produção mais curtos. Em forragens de baixa qualidade, a adição de nutrientes para os micro-organismos incrementa a eficiência do crescimento microbiano, pois aumenta a eficiência do processo fermentativo no rúmen, com decréscimo da população das metanogênicas, por unidade de carboidratos degradados. De acordo com a literatura, pode-se inferir que a produção de metano a partir da utilização de forragens tropicais pode ser reduzida pelo incremento na qualidade da dieta por meio de manejo de

pastagens, suplementação alimentar, sistemas alternativos, como integração lavoura-pecuária e todos os processos realizados com intuito de intensificar e reduzir o ciclo de produção.

Dessa forma, faz-se necessária a estimativa dos níveis de carboidratos não fibrosos de rápida degradação, oferecidos em conjunto com compostos nitrogenados nas suplementações, que de forma equilibrada possam atingir as necessidades da microbiota ruminal, melhorando as características fermentativas, sem causar efeitos negativos sobre degradação de carboidratos fibrosos, e que pelo contrário aumentem a utilização da fibra e conseqüentemente diminuam a produção de metano.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com compostos nitrogenados e ou energético em diferentes proporções, sobre as características dos processos fermentativos e degradação ruminal da fibra em detergente neutro *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Rúmen da Universidade federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Ressalta-se que o presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 30/2014.

Para os procedimentos de avaliação *in vitro* foram utilizadas amostras de feno de *Brachiaria decumbens* de baixa qualidade, com nível médio de 6,8 % de PB.

As amostras foram processadas em moinho de faca primeiramente a 1 mm de espessura e posteriormente, procedeu-se à quantificação dos teores de matéria seca (MS) (método INCT-CA G-003/1), matéria orgânica (MO) (método INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB) (método INCT-CA N-001/1), extrato etéreo (EE) (EE; método INCT-CA G-005/1), e lignina (H₂SO₄ 720 g/kg; método INCT-CA F-005/1). As avaliações quanto aos teores de fibra em detergente neutro foram conduzidas segundo recomendações de Mertens (2002). Os teores de FDN foram expressos na forma corrigida para cinzas e compostos nitrogenados (FDN_{cp}; métodos INCT-CA F-002/1, INCT-CA M-002/1 e INCT-CA N-004/1), segundo métodos descritos por Detmann et al. (2012).

Outra alíquota da mesma amostra de feno foi processada em peneira de 2 mm para avaliação quanto ao teor de FDN indigestível (FDN_i; método INCT-CA F-009/1), utilizando-se sacos F57 (Ankom®) em procedimento de incubação *in situ* por 288 horas, segundo recomendações de Detmann et al. (2012).

Os suplementos foram constituídos por uma mistura de ureia:sulfato de amônia (U:SA – 9:1) e amido. As seguintes fontes foram utilizadas: ureia PA (Merck 108487), sulfato de amônio PA (Merck 1012171) e amido solúvel PA (Merck 1012520250).

Tabela 1- Composição química do feno e dos componentes dos suplementos

Item ¹	Componente		
	Feno	Amido	Ureia:SA(9:1)
MS ²	898,5	880,5	934,5
MO ³	939,6	989,1	-
PB ³	68,8	0	2675,0
EE ³	5,7	1,2	-
FDN ³	800,3	-	-
FDNcp ³	768,0	-	-
PIDN ⁴	346,9	-	-
CNF ³	97,0	987,9	-
FDA ³	468,5	-	-
FDACP ³	452,4	-	-
PIDA ⁴	226,4	-	-
Lignina ³	55,1	-	-

¹/MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína. PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; CNF = carboidratos não-fibrosos; FDA = fibra em detergente ácido; FDACP = fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido.²/ g/kg de matéria natural. ³/ g/kg de MS. ⁴/ g/kg de PB.

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

Componente	Tratamentos						
	Feno	Feno + U9	Feno + U13	Feno + A10-U9	Feno + A10-U13	Feno + A20-U9	Feno + A20-U13
Feno (mg) ¹	245	245	245	245	245	245	245
Amido (mg) ¹	-	-	-	24,5	24,5	49	49
U:SA (9:1) (mg) ¹	-	7,9	22,8	7,9	22,8	7,9	22,8
Inoculo Ruminal (ml)	8	8	8	8	8	8	8
Tampão de McDougall (ml)	28	28	28	28	28	28	28

¹/Com base na matéria seca.

Desta forma, tratamentos foram propostos a fim de elevar a concentração de PB da forragem de basal de 68,8 g de PB/kg de MS para 90 g de PB/kg de MS de forragem e 130 g de PB/kg de MS de forragem e com a adição de 10 e 20% da matéria seca da forragem em amido, fonte de carboidrato solúvel. O tratamento controle foi a utilização de forragem sem adição de compostos nitrogenados e/ou carboidrato solúvel.

Alíquotas de feno (245 mg de matéria seca) foram incubadas em frascos de 50 mL, recebendo a fonte proteica e ou energética segundo a estrutura dos tratamentos anteriormente descritos. Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução tampão de McDougall (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 por aspersão com dióxido de carbono. Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C) para prévia hidratação das amostras.

Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de dois bovinos doadores, fistulados no rúmen, mantidos nas proximidades da sala de incubação. Os animais doadores foram alimentados exclusivamente com cana-de-açúcar, caracterizada por possuir baixos teores de PB, sem correção com ureia, sendo submetidos também a um período de jejum de alimentos 12 horas anteriormente à coleta.

A alimentação base dos 2 animais doadores, em conjunto com o período de jejum visou a obtenção de inócuo ruminal com baixo teor de nitrogênio amoniacal, buscando-se simular as condições ruminais de animais mantidos em pastos tropicais durante o período seco, sem suplementação. O animal teve disponibilidade irrestrita quanto a água e mistura mineral completa (6% de fósforo).

O líquido ruminal coletado foi filtrado por uma camada tríplice de gaze e acondicionado em recipiente térmico e imediatamente transportado à sala de incubação. Foram adicionados 8 mL de inóculo ruminal por frasco, ajustando com a previa adição de 28 mL da solução tampão, um total de 36 mL de inóculo por alíquota, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de inoculação com CO₂, e à vedação dos frascos. A relação final, para os tratamentos foi de 100 mg de MS/10 mL de solução e 1 mL de inóculo ruminal/4 mL de solução tampão (Tilley & Terry, 1963). Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm). O procedimento de incubação foi repetido quatro vezes, para se obter quatro repetições por tempo de incubação para cada tratamento, perfazendo uma avaliação por tempo para cada tratamento em cada rodada incubando um número de 63 amostras, sendo avaliadas em total um número de 252 alíquotas durante todo o experimento.

Foram avaliados os tempos de 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação para degradação de FDN, PH, NAR. 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 em cadinhos filtrantes (porosidade grossa).

As frações líquidas amostradas por pipeta automática, foram reservadas em eppendorf (1,5 mL) e armazenadas a -20°C para análise da concentração de nitrogênio amoniacal (NA) e ácidos graxos voláteis das 24 e 48 horas de incubação (acético, butírico e propiônico). Depois de descongeladas, foram centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante analisado quanto aos teores de NAR, pela técnica colorimétrica proposta por Chaney & Marbach (1962). A determinação ácidos graxos voláteis foi realizada por cromatografia

líquida de alto desempenho (HPLC; cromatógrafo Shimadzu, modelo SPD-10A VP), utilizando-se coluna de fase reversa (fase móvel de ácido orto-fosfórico em água, 10 mL/L) e detector ultra-violeta em comprimento de onda de 210 nm.

Para as avaliações das concentrações de gás CH₄ e CO₂, foi coletado após das 24 horas de incubação as amostras para cada tratamento, foi utilizando uma seringa de 20 mL e imediatamente o gas foi transferido para um frasco de vidro com vácuo, para posteriores análises por cromatografia gasosa

Para realização da FDN, os cadinhos foram acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais adicionou-se 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Após serem vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de forma a extraírem-se todos os componentes solúveis em detergente neutro (método de micro-FDN; Pell & Schofield, 1993). Após este tratamento, procedeu-se novamente à filtração sob vácuo e lavagem sequencial com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não-ventilada (105°C/12 horas).

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

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

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

A função descrita em (1) é simétrica em relação às taxas fracionais c e p , sendo comumente assumido que os menores valores estão associados ao

parâmetro c (Vieira et al., 1997). Contudo, para os casos em que c e p tendem à mesma estimativa, uma indeterminação matemática será observada. Assim, para os casos em que isto seja observado, o modelo será reparametrizado, segundo a regra de L'Hôspital (Van Milgen et al., 1991), segundo a equação:

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

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

A matéria seca digerida de forragem foi estimada primeiramente pela estimativa da MS digerida da forragem utilizada:

$$\%MSDF = 0,98X(100 - FDN_{\%MS}) + FDN X \frac{B}{100} X (1 - e^{-kx24}) \quad (3);$$

em que: MSDF = matéria seca diferida da forragem estimada (%); 0,98 = coeficiente de digestibilidade do conteúdo celular; B = fração potencialmente digestível da FDN ajustada; k = taxa de degradação da FDN potencialmente digestível.

Assim estimou-se a MS digerida total após a incubação por:

$$MSD_{gr} = 0,98 x SUP(gr) + \% \frac{MSDF}{100} X FOR (gr) \quad (4);$$

em que: MSD = matéria seca diferida (gramas); 0,98 = coeficiente de digestibilidade do conteúdo celular; Sup (gr) = quantidade de suplemento adicionado (gramas); MSDF = matéria seca diferida da forragem estimada (%); For (gr) = quantidade de forragem adicionado (gramas).

Os valores de pH, NAR, AGVs, dióxido de carbono e metano 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 7 x 10 (sete tratamentos x 10 tempos de incubação). Todos os procedimentos estatísticos 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 com compostos nitrogenados para animais consumindo forragem de baixa qualidade tem o potencial de fornecer substratos ao ambiente ruminal e assim favorecer o crescimento de bactérias fibrolíticas; como consequência aumentando a degradação da fibra e ampliação do consumo voluntário de forragem (Detmann et al., 2009; Souza et al., 2010). Contudo, não foram observados efeitos da suplementação com compostos nitrogenados sobre as estimativas dos parâmetros de degradação da FDN e sobre as dimensões das frações potencialmente degradável (U) e indegradável da forragem (I) ($P>0,05$) (Tabela 3).

Respostas com suplementação nitrogenada para animais consumindo forragem de baixa qualidade sobre a degradação da FDN, deixam de ser percebidos quando os teores de proteína bruta da forragem basal forem maiores a 7-8% PB (Lazzarini et al., 2009), sendo este semelhante ao valor de PB do feno (68 g de PB/ kg MS) utilizado neste estudo (Tabela 1), constituindo assim forragem de qualidade superior ao almejado para este trabalho e talvez por esta razão sem resultados não significativos sobre os parâmetros avaliados.

A suplementação com amido não foi capaz de alterar a taxa de degradação dos compostos fibrosos (Tabela 3), sendo isto visualizado pela falta de efeito entre tratamentos. Ao contrário do presente estudo, trabalhos na literatura apresentam efeitos negativos da inclusão do amido sobre a degradação da FDNpd, seja somente o uso com forragem basal ou em conjunto com fontes nitrogenadas suplementares (Carvalho et al., 2011; Costa et al., 2008).

A queda na degradação ruminal da fibra com adição de suplementos compostos por carboidratos não- fibroso (CNF), pode ser atribuída a dois efeitos distintos, denominados efeito ph e efeito concentrado ou efeito carboidrato (Mould et al., 2005; Arroquy et al., 2005). O efeito carboidrato, tem sido evidenciado com suplementação de carboidratos não fibrosos, sendo assim, a competição entre os diferentes grupos de bactérias, a primeira razão para a inibição da celulólise, principalmente, quando uma fonte de amido é adicionado a dieta, estimulando o crescimento das bactérias amilolíticas, inibindo as celulolíticas e afetando negativamente a digestão da fibra, (Grigsby et al., 1993). Por outro lado, Silveira (2002) concluíram que a suplementação com ureia sobre feno de media qualidade, reverteu parcial ou totalmente os efeitos negativos da suplementação energética, sobre os coeficientes de digestibilidade.

Tabela 3- Estimativas da fração potencialmente degradável da FDN (U-%), fração indegradável da FDN (I-%) e taxa fracional de degradação da fração potencialmente degradável da FDN ($k-h^{-1}$) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamentos							EPM	Valor P
	Feno	Feno+ U9	Feno+ U13	Feno+ A10- U9	Feno+ A10- U13	Feno+ A20- U9	Feno+ A20- U13		
U	54,0	54,2	53,7	50,6	57,4	50,3	53,4	3,50	0,429
I	45,9	45,7	46,2	49,3	42,5	49,6	46,5	3,50	0,429
k	0,032	0,048	0,039	0,038	0,034	0,050	0,041	0,011	0,568

A avaliação do pH, NAR (mg/dL), concentração total de ácidos graxos voláteis (mmol/dL), proporção de acetado, proprionato e butirato (%) e relação

acetato:propionato foram realizadas com base nos tratamentos, tempo de amostragem e interação entre tratamento e tempo de amostragem (Tabela 4).

Foram observados efeitos de tratamento ($P < 0,0001$) e tempo ($P < 0,0001$) mas não foi verificado efeito para a interação entre tratamento x tempo ($P = 1,000$). Tipicamente observa-se que, na adição de compostos energéticos de rápida degradação como o amido na dieta, o pH pode decrescer (Haddad & Grant, 2000), o que diminuíram a atividade ou o número de microrganismos celulolíticos, e até mesmo uma modesta redução no pH ruminal pode inibir severamente a digestão da celulose (Russel & Wilson, 1996).

Tabela 4 - Efeitos para tratamento, tempo e interação tratamento e tempo para as variáveis pH, nitrogênio amoniacal ruminal (mg/dL), concentração total de ácidos graxos voláteis (mmol/dL), proporção de acetato, propionato e butirato (%) e relação acetato:propionato (A:P)

Variável	Efeito		
	Tratamento	Tempo	Tratamento x tempo
pH	<0,0001	<0,0001	1,000
NAR	<0,0001	<0,0001	0,0001
AGV	0,0386	0,0006	0,165
Acetato	<0,0001	0,0014	0,685
Propionato	0,037	0,002	0,862
Butirato	<0,0001	<0,0001	0,883
A:P	0,0047	0,0011	0,766

Os efeitos dos tratamentos e a variação do tempo sob valores de pH podem ser melhor observados na Tabela 5. Independente da fonte suplementar, ao longo do tempo de incubação, para todos os tratamentos os valores de pH reduziram. Por outro lado, os tratamentos que tiveram inclusão de amido

obtiveram médias inferiores de pH aos encontrados nos tratamentos apenas com nitrogênio suplementar ($P < 0,0001$) (Tabela 5).

Segundo Detmann et al. (2005), o uso de uréia, em suplementos múltiplos, provoca elevação do pH ruminal em função do poder alcalinizante da amônia produzida, justificando assim neste estudo o pH mais alto ($P < 0,05$) para tratamentos suplementados com ureia em comparação ao controle. Efeitos de pH semelhantes com suplementação com ureia também foram relatados por Acedo et al. (2007).

Tabela 5 – Concentração de pH em função dos diferentes tratamentos e tempos de amostragem

Tempo	Tratamentos							Média
	Feno	Feno+ U9	Feno+ U13	Feno+ A10- U9	Feno+ A10- U13	Feno+ A20- U9	Feno+ A20- U13	
3	6,77	6,84	6,96	6,79	6,83	6,83	6,87	6,84 ^a
6	6,68	6,83	6,87	6,74	6,85	6,80	6,87	6,81 ^{ab}
9	6,63	6,77	6,86	6,68	6,83	6,67	6,84	6,75 ^b
12	6,58	6,67	6,82	6,57	6,81	6,58	6,75	6,68 ^{bc}
24	6,50	6,54	6,71	6,52	6,64	6,46	6,59	6,56 ^d
36	6,47	6,57	6,72	6,50	6,66	6,43	6,62	6,57 ^d
48	6,42	6,46	6,64	6,45	6,66	6,40	6,57	6,52 ^d
72	6,42	6,53	6,69	6,51	6,62	6,39	6,54	6,53 ^d
96	6,43	6,56	6,80	6,45	6,61	6,45	6,61	6,56 ^d
Média	6,54 ^d	6,64 ^{bc}	6,78 ^a	6,58 ^{cd}	6,72 ^{ab}	6,56 ^{cd}	6,69 ^b	EPM=0,015

Na adição de compostos energéticos de rápida degradação como o amido na dieta, efeitos como queda de pH têm sido relatado (Haddad & Grant, 2000). Observando-se neste estudo como o poder alcalinizante da ureia foi

afetado negativamente pelo efeito do amido em atuar na queda de pH, quando foram oferecidos em conjunto.

Adicionalmente, as diferentes variações nos níveis de pH ao longo do tempo de incubação e entre tratamentos encontrados neste estudo, ainda refletiram em níveis de pH que não afetariam as atividades das bactérias fibrolíticas na digestão da fibra (Dixon & Stockdale, 1999).

A concentração de NAR foi influenciada pelos tratamentos ($P < 0,0001$), pelo tempo ($P < 0,0001$) e também foi verificado neste estudo efeito da interação tratamento x tempo ($P = 0,0001$) (Tabela 4 e 6). Foi verificado que a concentração de NAR aumentou após o tempo 36 e que o padrão não foi influenciado pela adição de amido, mas sim pela concentração de nitrogênio suplementar (Gráfico 1).

Tabela 6 – Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR – mg/dL) em função dos diferentes tratamentos e tempos de amostragem

Tempo	Tratamentos							Valor P
	Feno	Feno+ U9	Feno+ U13	Feno+ A10- U9	Feno+ A10- U13	Feno+ A20- U9	Feno+ A20- U13	
3	1,77	2,51	2,74	1,95	3,20	3,00	3,35	0,9842
6	2,28	3,09	5,32	3,37	5,80	3,90	6,46	0,3477
9	3,14	4,13	6,32	5,15	7,73	4,30	7,12	0,2430
12	3,49	6,74	8,08	5,60	8,61	5,96	5,32	0,2673
24	2,74	4,43	10,09	5,72	6,24	4,81	7,11	0,0978
36	2,44 ^c	5,99 ^{bc}	8,65 ^b	6,54 ^b	9,91 ^{ab}	6,50 ^{bc}	13,39 ^a	<0001
48	4,59 ^d	8,38 ^{cd}	12,59 ^{abc}	9,65 ^{bc}	13,45 ^{ab}	8,82 ^c	14,15 ^a	<0001
72	5,21 ^d	10,44 ^{cd}	17,06 ^{ab}	10,88 ^{bc}	19,28 ^{ab}	10,84 ^c	19,39 ^a	<0001
96	4,49 ^c	11,48 ^b	17,55 ^a	10,70 ^b	19,47 ^a	12,51 ^b	19,08 ^a	<0001
Valor P	0,5575	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001	<0001	

Considerando-se que os microrganismos fibrolíticos utilizam o nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) como principal precursor nitrogenado para crescimento (Russell, 2002), aumento nas concentrações de NAR no rúmen, melhoraria o meio para micro-organismos e sua atividade, aumentando degradação de carboidratos fibrosos.

Os efeitos benéficos da suplementação com compostos nitrogenados foram verificados e confirmados em estudos *in vitro* anteriores (Costa et al., 2008; Paez- Bernal, 2007, Zorzi et al., 2009).

A partir do 36 horas de incubação as concentrações de NAR ficaram mais elevadas ($P < 0,05$) para os tratamentos que tiveram elevação de 13 % de PB, segundo ($P < 0,05$) pelos tratamentos com elevação para 9% de PB independente da proporção de amido adicionado (10 ou 20% da matéria seca da forragem), sendo que o tratamento controle manteve a mesma concentração ao longo do tempo de incubação (Gráfico 1) ($P > 0,05$). Zorzi et al. (2009) trabalhando em experimento *in vitro*, suplementando forragem tropical de alta qualidade com diferentes níveis e fontes de compostos nitrogenados, concentrações mais elevadas com o tempo de incubação.

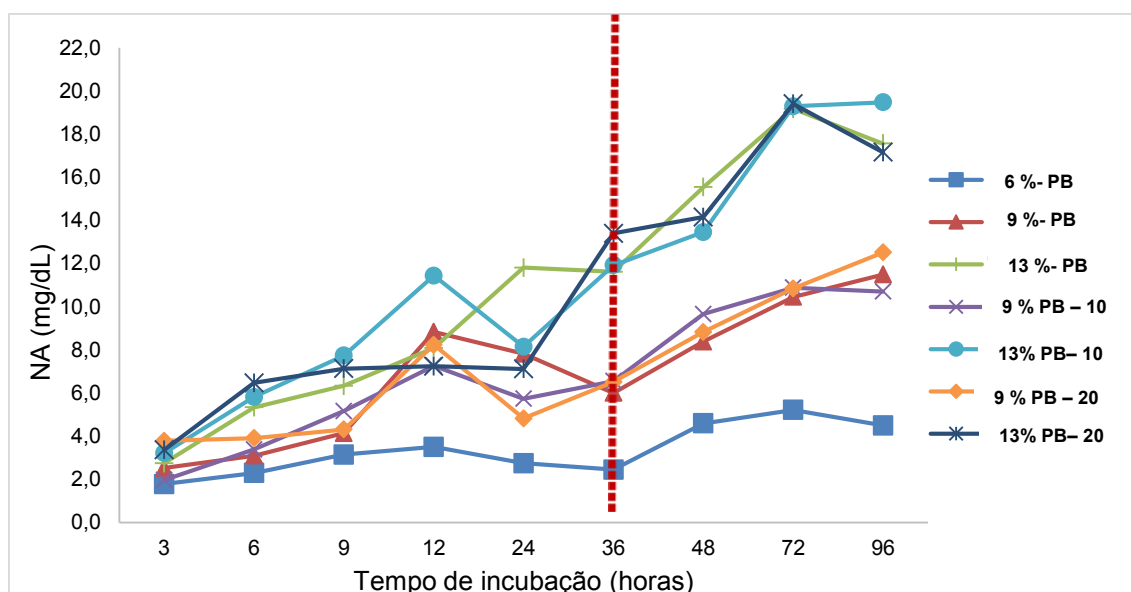


Gráfico 1 – Concentração de nitrogênio amoniacal (NA - mg/dL) em função do tempo de incubação e tratamentos.

Sampaio et al. (2009), suplementando forragem de baixa qualidade com adição de compostos nitrogenados, concluiu que 6,24 mg /dL de NAR pode ser entendido como a concentração mínima necessária para a manutenção adequada da atividade microbiana sobre a FDN da forragem basal.

Neste contexto, se tratando de experimento *in vitro*, onde não ocorrem processos de reciclagem de NA no ambiente ruminal como *in vivo*, menores estimativas de NAR em condições de forragem de baixa qualidade *in vitro* devem ser esperadas.

Contudo, observou-se neste trabalho níveis de NAR abaixo do recomendado por Sampaio et al. (2009) para o tratamento controle, necessários para a manutenção adequada da atividade microbiana sobre a FDN da forragem basal. Da mesma forma, verificou-se que a suplementação nitrogenada proporcionou maiores concentrações de NAR melhorando as características do meio respeito ao tratamento controle (Tabela 6). Além disso, não foram percebidos efeitos nas estimativas dos parâmetros de degradação da FDN do feno respeito ao tratamento controle (Figura 3).

Em contrapartida, Zhang et al. (2015) em estudos *in vitro* avaliaram dietas proteicas isonitrogenadas com 3 diferentes níveis de carboidratos, perceberam redução de concentrações de NAR ($P < 0,05$) e conseqüentemente aumentos na produção de proteína microbiana ($P < 0,05$), indicando maior eficiência de utilização de NAR em proteína microbiana, com o aumento da proporção de amido adicionado.

Neste contexto Souza et al. (2010), avaliando os efeitos da suplementação com compostos nitrogenados e ou amido, sobre animais consumindo forragem de baixa qualidade, verificou redução nas concentrações de NAR quando compostos nitrogenados e amido foram oferecidos em conjunto, indicando um aumento da síntese de proteína microbiana e consequentemente reduzindo perdas de nitrogênio na urina.

Constataram-se neste estudo que adição de amido em conjunto com compostos nitrogenados nos diferentes níveis, não causou nenhum efeito nas concentrações de NAR (Tabela 6) onde possivelmente as proporções adicionadas não foram suficientes para provocar efeitos.

Os principais produtos da fermentação microbiana ruminal da degradação de carboidratos fibrosos e não fibrosos da forragem são os ácidos graxos voláteis: acético, butírico e propiônico (AGVs), responsáveis por ser a principal fonte de energia para os ruminantes. Produzidos principalmente na fermentação de carboidratos provenientes das plantas, tais como, celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares (Bergman, 1990).

A avaliação das concentrações totais de AGVs nos diferentes tratamentos em função do tempo de amostragem, independentemente do tratamento avaliado, resultou em elevação das concentrações totais de 24 horas de incubação para as 48 horas (Tabelas 4 e 8), possivelmente pelo acúmulo dos produtos durante o procedimento de incubação, pois in vivo, estes ácidos seriam prontamente absorvidos através da parede ruminal (Bergman, 1990).

Tabela 7 – Concentração de ácidos graxos voláteis totais (mmol/dL), proporções para acetato, propionato e butirato (%) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos

Item	Tratamento							EPM
	Feno	Feno+ U9	Feno+ U13	Feno+ A10- U9	Feno+ A10- U13	Feno+ A20- U9	Feno+ A20- U13	
Variável								
AGV	35,9 ^b	38,3 ^b	46,0 ^{ab}	43,0 ^{ab}	37,8 ^b	47,4 ^{ab}	47,8 ^a	3,95
Acetato	64,0 ^a	63,8 ^a	64,5 ^a	63,5 ^a	63,4 ^a	53,2 ^b	61,9 ^b	1,04
Propionato	21,7 ^b	21,8 ^b	21,5 ^b	21,7 ^b	22,1 ^b	22,5 ^{ab}	23,2 ^a	0,69
Butirato	11,4 ^c	11,5 ^{bc}	11,3 ^c	12,2 ^b	12,0 ^b	12,8 ^a	12,4 ^{ab}	0,71
A:P	2,97 ^a	2,94 ^{ab}	3,01 ^a	2,93 ^{ab}	2,88 ^{ab}	2,76 ^{bc}	2,68 ^c	0,08

O acetato é produzido em maiores proporções em dietas a base de forragem, na degradação de carboidratos fibrosos pelos microrganismos ruminais. Porém, é de se esperar neste experimento altos porcentagens de acetato, que foram verificados ($P < 0,05$) para o tratamento controle e os tratamentos restantes até que foram adicionadas fontes de amido em um percentagem de 20%, onde diminuíram ($P < 0,05$) as concentrações (Tabela 4 e 7). Por outro lado na avaliação dos tempos de amostragem em função dos tratamentos avaliados, independentemente do tratamento, as concentrações de acetato aumentaram ($P < 0,05$) de 24 para 48h, possivelmente pelo motivo explicado anteriormente (Tabela 4 e 8).

Em relação às produções individuais e devidas proporções, a proporção de acetato reduziram com a adição de amido e propionato se elevou ($P < 0,05$), refletindo também nos valores encontrados para a relação acetato:propionato, o que demonstra simplesmente as direções e rotas metabólicas de produção de ácidos graxos voláteis de acordo com o substrato disponível entre tratamentos (Tabela 4 e 7).

Noviandi et al. (2014), avaliaram características ruminais *in vitro* dos efeitos da suplementação energética sobre 4 forrageiras, verificaram que suplementação com milho aumento a produção de propionato diminuindo a produção de acetato e conseqüentemente apresentando uma menor relação A:P, resultados similares a este estudo.

Ao analisarem diferentes proporções de volumoso e concentrado, Chapaval et al. (2008), concluíram que a relação A:P foi maior quando a dieta era predominante em volumoso, enquanto que a relação era diminuída quando os níveis de concentrado na dieta era aumentado.

Por outro lado Nogueira et al. (2005), avaliando a substituição de milho gradativamente pela polpa de cítricos na suplementação de bovinos, perceberam que suplementação exclusiva com milho apresentou a maior proporção de propionato, já que dietas com maior proporção de amido estão associadas a maior produção de propionato.

Neste contexto, Berchielli et al. (2006) relataram que inclusões de açúcares em níveis abaixo de 15 % da MS parecem não provocar grandes mudanças na proporção de AGV. O que poderia justificar os resultados obtidos neste estudo quando foi adicionado amido na proporção de 10% na MS aos suplementos, não causando efeito nas proporções de acetato e propionato (Tabela 7).

As avaliações para concentração de butirato entre tratamentos, verificaram aumentos ($P < 0,05$) das concentrações para os tratamentos suplementados com amido quando este foi adicionado em 20% da matéria seca da forragem (Tabela 4 e 7).

As reações envolvidas na formação de acetato e butirato a partir de piruvato são inter-relacionadas e todas se dão a partir do acetil-CoA. Além disso, acetato e butirato são interconversíveis (Berchielli et al., 2006), justificando-se neste estudo aumentos das proporções de butirato e decréscimos nas proporções de acetato quando foram adicionados 20 % de amido nos tratamentos (Tabela 7).

No que se refere a avaliação da produção de AGVs das 24 para as 48 horas de incubação, em função dos diferentes tratamentos avaliados, foram feitas com o objetivo de se obter características das produções por tratamentos. Assim, resultou que neste experimento, não foi verificada diferença ($P > 0,05$) nas produções e proporções de AGVs totais, acetato, propionato, butirato e na relação acetato:propionato (A:P), em função dos tempos de amostragem (24 e 48 horas) entre os tratamentos avaliados. Consequentemente os resultados apresentados foram obtidos independentemente do tratamento avaliado (Tabela 4 e 8).

Tabela 8 – Concentração de ácidos graxos voláteis totais (mmol/dL), proporções para acetato, propionato e butirato (%) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos tempos de amostragem (24 e 48 horas)

Tempo	Variável				
	AGV	Acetato	Propionato	Butirato	A:P
24	37,9	62,9	22,5	12,3	2,80
48	46,7	63,7	21,6	11,5	2,96
EPM	2,95	1,01	0,61	0,69	0,12

Respeito as avaliações de tempo de amostragem para as relações A:P nos tratamentos, aumentaram ($P < 0,05$) das 24 para as 48 horas de tempo de incubação, possivelmente pelos decréscimos de propionato das 24 para as 48 horas de incubação (Tabela 8).

As diminuições das concentrações ($P < 0,05$) de propionato e butirato das 24 para as 48 horas de incubação para todos os tratamentos, provavelmente foram causadas pela utilização do metabolitos pelos microrganismos ou conversão deles em outros metabolitos (Berchielli et al., 2006).

Contudo, as proporções de acetato, propionato e butirato estiveram dentro da faixa de normalidade apresentada por (Coelho da Silva & Leão 1979) sendo acetato 54% a 74%, propionato 16% a 27%, butirato 6% a 15% (Tabela 7).

Os gases produzidos durante o processo fermentativo são principalmente o CO_2 e o CH_4 , e a sua formação é resultado principalmente da fermentação dos carboidratos dos alimentos à ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Blummel & Orskov, 1993 citado por Getachew et al., 1998). Durante a formação de AGVs no rúmen, o H_2 é liberado, como um composto intermediário, esse H_2 não se acumula, pois geralmente este é rapidamente utilizado pelos microrganismos metanogênicos do rúmen para produzirem o CH_4 e gerarem adenosina trifosfato (ATP) (Kumar et al., 2009).

No presente estudo, adição de compostos nitrogenados ou energéticos nas diferentes proporções, não afetou as estimativas das concentrações de metano e CO_2 em ml/MS incubada e digerida estimada em gramas, apresentando valores semelhantes ($P > 0,05$) ao tratamento controle. Assim, este fenômeno poderia ser justificado pelos resultados obtidos nas estimativas da degradação da FDN, que do mesmo modo não foram afetadas pela adição dos diferentes tratamentos (Tabela 3).

De maneira geral, a produção de dióxido de carbono tende a ser duas ou três vezes superior à produção de metano, segundo Zotti & Paulino, (2009). Pereira et al. (2006), variações nas concentrações de metano e dióxido de

carbono podem acontecer de acordo com o ingrediente utilizado na dieta, conferindo que alimentos fibrosos apresentam teores de metano maiores do que dióxido de carbono. Gastaldi, (2003), atribuíram aos microrganismos metanogênicos a utilização do hidrogênio liberado na redução de dióxido de carbono para produção de metano a dietas compostas de volumoso de baixa qualidade, apresentando também maiores concentrações de metano e menores de dióxido de carbono.

Neste contexto, ressalta-se que neste estudo, foi verificado que as concentrações de metano foram maiores em comparação com as concentrações de dióxido de carbono em todos os tratamentos. Desta forma, pode-se destacar que por se tratar de uma dieta a base de feno, rica em carboidratos fibrosos, como a utilizada neste estudo, podem-se justificar as estimativas obtidas (Tabela 9).

Tabela 9 - Estimativas concentração de Metano e CO₂ (mL/MS incubada em gramas e mL/MS digerida estimada em gramas) em função dos diferentes tratamentos a partir de amostras coletadas após 24 horas de incubação *in vitro*

Item	Tratamentos							EPM	Valor P
	Feno	Feno+ U9	Feno+ U13	Feno+ A10- U9	Feno+ A10- U13	Feno+ A20- U9	Feno+ A20- U13		
mL/MS incubada em gramas									
Metano	0,064	0,100	0,140	0,134	0,150	0,141	0,158	0,033	0,498
CO ₂	0,042	0,043	0,045	0,031	0,027	0,058	0,055	0,012	0,538
mL/MS digerida em gramas									
Metano	4,071	3,810	5,386	4,639	4,550	4,218	4,070	1,207	0,967
CO ₂	1,805	1,600	1,709	1,082	1,105	1,642	1,468	0,215	0,242

Pereira et al. (2006), avaliando diferentes categorias de bovinos e seu potencial na produção de metano e dióxido de carbono *in vitro*, constataram que características bromatológicas do alimento afetariam as relações, afirmando que dietas fibrosas com maior teor de lignina produziram mais metano em comparação a alimentos com baixa fibra e taxa rápida de fermentação.

Segundo Moss et al. (2000), que percentagem de AGVs produzida, influencia a produção de metano no rúmen, e que a produção de acetato e butirato estimularia a produção de metano pela liberação de H₂, por outro lado, produção de propionato poderia estar envolvido na captação de H₂ e competição com bactérias metanogênicas.

Neste contexto, dietas ricas em volumoso favorecem principalmente produção de acetato e butirato que estimularia as produções de metano na liberação de H₂, ao passo que dietas ricas em amido favorecem produção de propionato e diminuem produção de metano que também poderia ser justificadas por queda de ph que afetaria bactérias metanogênicas altamente sensíveis (Moss et al., 2000).

Neste estudo, as afirmações feitas pelos autores anteriores respeito as produção de AGVs, no tocante de diretamente influenciar a proporção de gases produzidos no meio, poderiam justificar, os resultados obtidos, percebendo-se em geral nos tratamentos maiores proporções de acetato, causadas por ser uma dieta a base de feno, que com adição de 20 % de amido apresentaram elevação da produção de propionato. Contudo, não foi suficiente para diminuir as estimativas da produção de metano (Tabela 7 e 9). Porém, pode-se deduzir que em geral as produções de acetato causaram maiores produções de metano e menores produções de dióxido de carbono em todos os tratamentos, que podem

ser explicadas pelas seguintes hipóteses: alta presença bactérias metanogênicas; alta atividade fermentativa das metanogênicas; alta liberação de H₂ no ambiente in vitro, justificadas por aumentos na produção de acetato ou butirato e não de propionato.

CONCLUSÕES

Suplementação com compostos nitrogenados melhorou as características do meio para os microrganismos, aumentando concentrações de NAR. Por outro lado a suplementação com carboidratos não fibrosos em percentagem de 20% influenciou características da fermentação ruminal diminuindo as relações A:P. Os níveis de pH foram aumentados pela adição de compostos nitrogenados e afetados pela adição de carboidratos não fibrosos, contudo, não foram verificados efeitos da suplementação em relação às estimativas de degradação da FDN pela média qualidade da forragem utilizada.

Forragem tropicais de baixa qualidade apresenta maiores concentrações de metano e menores concentrações de dióxido de carbono.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acedo, T. S., Paulino, M. F., Detmann, E., de Campos Valadares Filho, S., de Moraes, E. H. B. K., & de Figueiredo, D. M. (2007). Níveis de uréia em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante a época seca-DOI: 10.4025/actascianimsci. v 29i3. 560. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 29(3), 301-308.
- Berchielli, T. T. (2006). Nutrição de ruminantes. A. V. Pires, & S. G. de Oliveira (Eds.). Funep.
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*, 70(2), 567-590.
- Black, J. L. (1990). Nutrition of the grazing ruminant. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production (New Zealand)*.
- Blu, M., & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2), 109-119.
- Carvalho, I. P. C. D., Detmann, E., Mantovani, H. C., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. D. C., Costa, V. A. C., & Gomes, D. I. (2011). Growth and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from rumen fluid according to energy or nitrogen source. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(6), 1260-1265.
- Chaney, A. L., & Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry*, 8(2), 130-132.
- Chapaval, L., Melotti, L., Rossi Júnior, P., de Souza Olivindo, C., & Arcelino Rêgo, J. P. (2008). Relação volumoso: concentrado sobre as concentrações ruminais de amônia, pH e ácidos graxos em vacas leiteiras mestiças. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9(1).
- Chen, K. H., Huber, J. T., Theurer, C. B., Swingle, R. S., Simas, J., Chan, S. C., ... & Sullivan, J. L. (1994). Effect of steam flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. *Journal of dairy science*, 77(4), 1038-1043.
- Coelho da Silva, J. F., & LEÃO, M. I. (1979). *Fundamentos de nutrição dos ruminantes*. Piracicaba: Livroceres.
- Costa, V. A. C., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Paulino, M. F., Henriques, L. T., & Mantovani, H. C. (2008). 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*, 37(3), 494-503.
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., & Wiedemann, S. G. (2011). Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science*, 51(6), 491-514.
- Detmann, E., Paulino, M. F., VALADARES FILHO, S. D. C., Cecon, P. R., Zervoudakis, J. T., Cabral, L. D. S., ... & Valadares, R. F. D. (2005). 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*, 34(4), 1380-1391.
- Detmann, E., Paulino, M. F., & VALADARES FILHO, S. D. C. (2008). Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. *Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 6, 21-52.
- Detmann, E., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. D. C., Sampaio, C. B., de Souza, M. A., ... & Detmann, K. S. (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. *Livestock Science*, 126(1), 136-146.
- Detmann, E., Paulino, M. F., & Valadares Filho, S. C. (2010). Otimização do uso de recursos forrageiros basais. *Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 7, 191-240.
- Detmann, E., Souza, M. D., Valadares Filho, S. C., Queiroz, A. D., Berchielli, T. T., Saliba, E. O. S., ... & Azevedo, J. A. G. (2012). Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214.
- Detmann, E., Valente, É. E., Batista, E. D., & Huhtanen, P. (2014). An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Livestock Science*, 162, 141-153.
- Dixon, R. M., & Stockdale, C. R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Crop and Pasture Science*, 50(5), 757-774.
- Egan, J. K., & Doyle, P. T. (1985). Effect of intraruminal infusion of urea on the response in voluntary food intake by sheep. *Crop and Pasture Science*, 36(3), 483-495.
- Gastaldi, K. (2003). Produção «in vitro» de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações. 2003.104 f (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3), 261-281.]
- Grigsby, K. N., Kerley, M. S., Paterson, J. A., & Weigel, J. C. (1993). Combinations of starch and digestible fiber in supplements for steers consuming a low-quality bromegrass hay diet. *Journal of animal science*, 71(4), 1057-1064.
- Haddad, S. G., & Grant, R. J. (2000). Influence of nonfiber carbohydrate concentration on forage fiber digestion in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 86(1), 107-115.
- Kumar, S., Puniya, A. K., Puniya, M., Dagar, S. S., Sirohi, S. K., Singh, K., & Griffith, G. W. (2009). Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1557-1566.
- Lazzarini, I., Detmann, E., Sampaio, C. B., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. C., Souza, M. A., & Oliveira, F. A. (2009). Dinâmicas de trânsito e degradação

da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. *Arq. bras. med. vet. zootec*, 61(3), 635-647.

- Lee, G. J., Hennessy, D. W., Nolan, J. V., & Leng, R. A. (1987). Responses to nitrogen and maize supplements by young cattle offered a low-quality pasture hay. *Crop and Pasture Science*, 38(1), 195-207.
- Leng, R. A. (1990). Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition research reviews*, 3(01), 277-303.
- MacRae, J. C., Milne, J. A., Wilson, S., & Spence, A. M. (1979). Nitrogen digestion in sheep given poor-quality indigenous hill herbage. *British Journal of Nutrition*, 42(03), 525-534.
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43(1), 99.
- Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 85(6), 1217-1240.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. (2000, May). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. In *Annales de zootechnie* (Vol. 49, No. 3, pp. 231-253). EDP Sciences.
- Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., & Mauricio, R. M. (2005). In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 31-50.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., & Koong, L. J. (1982). Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 55(2), 411-421.
- Nogueira, K. A., Nogueira Filho, J. C. M., Leme, P. R., Valinote, A. C., da Luz, S., & Cunha, J. A. (2005). Substituição do milho pela polpa de citros sobre a fermentação ruminal e protozoários ciliados. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 27(1), 123-127.
- Noviandi, C. T., Eun, J. S., Peel, M. D., Waldron, B. L., Min, B. R., ZoBell, D. R., & Miller, R. L. (2014). Effects of energy supplementation in pasture forages on in vitro ruminal fermentation characteristics in continuous cultures. *The Professional Animal Scientist*, 30(1), 13-22.
- Paez-Bernal, D. M. (2007). Dinâmica de degradação in vitro da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos. 2007. 49f Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.).
- Paulino, M. F., Detmann, E., & Valadares Filho, S. C. (2006). Suplementação animal em pasto: energética ou protéica. *Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem*, 3, 359-392.
- Pell, A. N. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro.- p. 1063-1073 (No. HEM). En: *Journal of Dairy Science*.- Vol. 76, no. 4 (Apr 1993).

- Pereira, E. M. O., Ezequiel, J. M., Biagioli, B., & Feitosa, J. (2006). Determinação in vitro do potencial de produção de metano e dióxido de carbono de líquido ruminal proveniente de bovinos de diferentes categorias. *Arch Latinoam Prod Anim*, 14, 120-127.
- Russell, J. B., & Wilson, D. B. (1988). Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. *The Journal of nutrition*, 118(2), 271-279.
- Russell, J. B., & Wilson, D. B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *Journal of dairy science*, 79(8), 1503-1509.
- Russell, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Cornell University.
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Lazzarini, I., Souza, M. A. D., Paulino, M. F., & Valadares Filho, S. D. C. (2009). Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(3), 560-569.
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. C., de Souza, M. A., Lazzarini, I., ... & de Queiroz, A. C. (2010). Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Tropical Animal Health and Production*, 42(7), 1471-1479.
- Satter, L. D., & Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British journal of nutrition*, 32(02), 199-208.
- Silveira, A. (2002). Avaliação nutricional da adição de uréia ao feno suplementado com milho moído. 2002. 79p (Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre).
- Simas, J. M. C. D. (1995). Effect of sorghum grain processing and fat supplementation on performance and nutrient utilization in lactating dairy cows.
- Souza, M. A., Detmann, E., Paulino, M. F., Sampaio, C. B., Lazzarini, Í., & Valadares Filho, S. C. (2010). 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*, 42(6), 1299-1310.
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18(2), 104-111.
- Van Milgen, J., Murphy, M. R., & Berger, L. L. (1991). A compartmental model to analyze ruminal digestion. *Journal of Dairy Science*, 74(8), 2515-2529.
- Vieira, R. A., Pereira, J., Malafaia, P. A., & de Queiroz, A. C. (1997). The influence of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* Schum., Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 67(2), 151-161.
- Zhang, X., Zhang, H., Wang, Z., Zhang, X., Zou, H., Tan, C., & Peng, Q. (2015). Effects of dietary carbohydrate composition on rumen fermentation characteristics and microbial population in vitro. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3), 3366.

- Zorzi, K., Detmann, E., Queiroz, A. C. D., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., & Bayão, G. F. (2009). In vitro degradation of neutral detergent fiber of high-quality tropical forage according to supplementation with different nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(5), 964-971.
- Zotti, C. A., & Paulino, V. T. (2009). Metano na produção animal: Emissão e minimização de seu impacto. *Ecologia de Pastagens*, Curso de Pósgraduação em Produção Animal Sustentável. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1259324182.pdf>. Acesso em 10/07/2016.