INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE COLETA DE FLUIDO RUMINAL SOBRE OS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO, EM BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA

OTÁVIA ELISA NOGUEIRA MENDES LAVEZZO
Engenheiro Agrônomo

Orientador : Prof. Dr. VIDAL PEDROSO DE FARIA

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia. Área
de Concentração: Nutrição Animal e
Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro — 1986

INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE COLETA DE FLUIDO RUMINAL SOBRE
OS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO, EM BOVINOS ALIMENTADOS
COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA

OTÁVIA ELISA NOGUEIRA MENDES LAVEZZO

Aprovada em: 30.12.1986

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Vidal Pedroso de Faria	ESALQ/USP
Prof. Dr. Wilson Roberto Soares de Mattos	ESALQ/USP
Prof. Dr. Raul Dantas d'Arce	ESALQ/USP

Prof. Dr. Vidal Pedroso de Faria
Orientador

Ao meu amado filhinho Marcelo, razão principal da
minha existência, esperando que dignifique,
no futuro, o amor e a esperança em sua pes-
soa depositados.

Ao querido Rafael, para que sinta, nesta lembr
ança, o meu profundo carinho e estima.

Ao meu querido Wagner, em cujos atribu-
tos como profissional, pessoa hu-
mana e companheiro da minha vida,
procuro me inspirar,

OFEREÇO.

A amizade está na alma
E a alma não morre...
À memória de meus queridos pais
Plínio e Laudelina,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vidal Pedroso de Faria, pela orientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Soares de Mattos, pelo apoio, auxílio na coleta dos dados e por oferecer todos os recursos necessários à condução do trabalho experimental.

Ao Prof. Dr. Wagner Lavezzo, pelas valiosas sugestões, incentivo e auxílio na coleta dos dados e nas análises bromatológicas.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Machado, pelo auxílio na coleta dos dados.

Ao Prof. Dr. Cássio Roberto de Melo Godoi, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Flávio Baccari Jr., pela colaboração prestada.

Ao Dino Potiens Filho e Solange Aparecida Ferreira de Souza, pelos trabalhos datilográficos.

À Cristina Mafalda Cândido Mulford, pela elaboração dos gráficos deste trabalho.

Ao Orlando Baggio e Dirce Aparecida Baggio, pela colaboração nas análises laboratoriais.

Ao Departamento de Melhoramento Zootécnico e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pelas facilidades concedidas.

Ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, pelo oferecimento das instalações para condução do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiv
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Métodos de coleta.....	4
2.2. Dietas experimentais.....	10
2.3. Tempos de amostragem.....	18
2.4. Animais utilizados.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Plano experimental.....	22
3.2. Amostragem do conteúdo ruminal via sonda esofagiana.....	26
3.3. Amostragem do fluido ruminal via fístula ruminal.....	27
3.4. Mensurações do pH do fluido ruminal.....	27
3.5. Mensurações das concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal.....	27
3.6. Mensurações das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) no fluido ruminal.....	31
3.7. Análises de laboratório.....	32
3.8. Parâmetros analisados.....	33
3.9. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	36
5. DISCUSSÃO.....	81
5.1. Métodos de coleta.....	81
5.2. Dietas experimentais.....	97

5.3. Interações entre dietas experimentais e tempos de amostragem.....	109
5.4. Interações entre dietas experimentais e animais utilizados.....	127
5.5. Tempos de amostragem.....	132
5.6. Animais utilizados.....	141
6. CONCLUSÕES.....	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Seqüência de tratamentos atribuídos aos animais.....	23
Quadro 2 - Composição das dietas experimentais fornecidas a cada animal por dia.....	24
Quadro 3 - Composição nutritiva dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais.....	25
Quadro 4 - Composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas.....	25
Quadro 5 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	36
Quadro 6 - Índice pH em fluido ruminal em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais....	37
Quadro 7 - Índice pH em fluido ruminal coletado sob dois métodos experimentais em quatro bovinos.....	37
Quadro 8 - Índice pH em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	38
Quadro 9 - Índice pH em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	38

Quadro 10 - Análise de variância referente aos Quadros 5, 6, 7, 8 e 9.....	39
Quadro 11 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	40
Quadro 12 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação de bovinos sob duas dietas.....	41
Quadro 13 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	41
Quadro 14 - Análise de variância referente aos Quadros 11, 12 e 13.....	42
Quadro 15 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	43
Quadro 16 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.....	44

Quadro 17 - Níveis de ácidos graxos voláteis <u>to</u> tais em fluido ruminal de quatro bo vinos alimentados com duas dietas ex perimentais.....	44
Quadro 18 - Análise de variância referente aos Quadros 15, 16 e 17.....	45
Quadro 19 - Níveis de ácido acético em fluido ru minal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	46
Quadro 20 - Níveis de ácido acético em fluido ru minal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	47
Quadro 21 - Análise de variância referente aos Quadros 19 e 20.....	47
Quadro 22 - Níveis de ácido propiônico em flui do ruminal amostrado em nove horá rios após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bo vinos sob duas dietas experimentais....	48
Quadro 23 - Níveis de ácido propiônico em flui do ruminal de bovinos sob duas die tas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	49
Quadro 24 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos alimenta dos com duas dietas experimentais.....	49
Quadro 25 - Níveis de ácido propiônico em flui do ruminal de quatro bovinos amos trado em nove horários após a ali mentação.....	50

Quadro 26 - Análise de variância referente aos Quadros 22, 23, 24 e 25.....	51
Quadro 27 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro <u>bo</u> vinos sob duas dietas experimentais.....	52
Quadro 28 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	53
Quadro 29 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	53
Quadro 30 - Análise de variância referente aos Quadros 27, 28 e 29.....	54
Quadro 31 - Níveis de ácido isovalérico em <u>flui</u> do ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro <u>bo</u> vinos sob duas dietas experimentais.....	55
Quadro 32 - Níveis de ácido isovalérico em <u>flui</u> do ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	56
Quadro 33 - Níveis de ácido isovalérico em <u>flui</u> do ruminal de quatro bovinos <u>alimen</u> tados com duas dietas experimentais.....	56
Quadro 34 - Análise de variância referente aos Quadros 31, 32 e 33.....	57

Quadro 35 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	58
Quadro 36 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	59
Quadro 37 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	59
Quadro 38 - Análise de variância referente aos Quadros 35, 36 e 37.....	60
Quadro 39 - Correlação entre os parâmetros referentes à fermentação ruminal.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 - Solução padrão.....	30
Gráfico 2 - Amostra do fluido ruminal.....	30
Gráfico 3 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	62
Gráfico 4 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.....	63
Gráfico 5 - Índice pH em fluido ruminal coletado sob dois métodos experimentais em quatro bovinos.....	63
Gráfico 6 - Índice pH em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação....	64
Gráfico 7 - Índice pH em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	64
Gráfico 8 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	65

Gráfico 9 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação de bovinos sob duas dietas.....	66
Gráfico 10 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	66
Gráfico 11 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	67
Gráfico 12 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.....	68
Gráfico 13 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	69
Gráfico 14 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	70
Gráfico 15 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	71

Gráfico 16 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	72
Gráfico 17 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	73
Gráfico 18 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	73
Gráfico 19 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos amostrado em nove horários após a alimentação.....	74
Gráfico 20 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	75
Gráfico 21 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	76

Gráfico 22 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais	76
Gráfico 23 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais....	77
Gráfico 24 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	78
Gráfico 25 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	78
Gráfico 26 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.....	79
Gráfico 27 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.....	80
Gráfico 28 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.....	80

INFLUENCIA DE MÉTODOS DE COLETA DE FLUIDO RUMINAL SOBRE OS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO, EM BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA

Autora: Otávia Elisa Nogueira Mendes Lavezzo

Orientador: Prof. Dr. Vidal Pedroso de Faria

RESUMO

Com o objetivo de verificar a influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação, foi conduzido um experimento, utilizando sonda esofagiana e fístula ruminal como as vias para amostragem do conteúdo do rúmen. O ensaio foi feito com duas repetições (blocos) e num esquema fatorial $2 \times 2 \times 9 \times 4$ tratamentos. Os fatores foram: métodos de coleta do fluido ruminal (sonda esofagiana e fístula ruminal); dietas isoproteicas (levedura de fermentação alcoólica e farelo de algodão); tempos de amostragem do fluido ruminal (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação); animais utilizados (quatro vacas com fístula no rúmen).

Estabeleceram-se dois períodos experimentais, cada um com duração de 15 dias e sendo antecedido por um período preliminar de adaptação de 21 dias. No quinto e décimo segundo dias de cada período experimental, foram feitas as coletas de fluido ruminal pelos dois métodos, primeiro via sonda esofagiana e, em seguida, via fístula ruminal, nos nove horários pós-alimentação, nos quatro bovinos, estando dois sob a dieta com levedura (D_1) e dois sob a dieta com farelo de algodão (D_2).

As dietas experimentais foram administradas uma vez por dia, na forma de ração completa e com um consumo fixo e restrito de 1,41 kg MS/100 kg PV/dia.

As amostras de fluido ruminal foram destinadas às mensurações dos parâmetros de fermentação ruminal: pH, concentração (mg/100 ml de fluido) de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e nível (mM) de ácidos graxos voláteis (AGV).

As amostras obtidas via sonda esofagiana apresentaram valor médio de pH maior (7,28), teor médio de N-NH₃ menor (9,75 mg/100 ml) e concentrações médias de AGV, igualmente, menores (respectivamente, 66,59; 44,11; 12,62; 8,08; 0,93 e 0,85 mM, para AGV totais e ácidos acético, propiônico, n-butírico, isovalérico e n-valérico), em relação às coletadas através de fístula ruminal, cujos resultados foram: 6,75 (pH); 10,77 mg/100 ml (N-NH₃); 85,38 mM (AGV totais); 56,04 mM (ácido acético); 16,48 mM (ácido propiônico); 10,65 mM (ácido n-butírico); 1,14 mM (ácido isovalérico) e 1,08 mM (ácido n-valérico).

Em todos os horários de coleta, as amostras obtidas via sonda esofagiana apresentaram valores de pH superiores ($P < 0,01$), enquanto, para os AGV totais, os níveis mensurados foram inferiores ($P < 0,01$), devido, em ambos os casos, a interferência da saliva ser grande nas amostras coletadas por este método.

As inferências a serem feitas, a partir dos estudos de ruminologia devem ser cuidadosas dada às interferências do método de coleta sobre as mensurações dos parâmetros indicativos da atividade ruminal. Pelo observado na presente pesquisa, deve-se preferir o método de coleta por fístula ruminal, pois parece refletir melhor os valores reais dos parâmetros de fermentação.

Ambas as dietas apresentaram boa disponibilidade de N-NH₃, o que deve ter favorecido a atuação dos microorganismos. As produções altas e iguais de ácido acético, nas 24 horas de observação, demonstram que as bactérias celulolíticas foram beneficiadas, desenvolvendo-se, provavelmente, mais que as outras. Com relação aos valo-

res mais baixos de pH e mais altos de N-NH₃, de AGV totais e individuais, registrou-se, na presente pesquisa, uma tendência de ocorrência dos mesmos no período diurno. Nas dietas utilizadas, deve ter ocorrido um processo de fermentação, predominantemente, celulolítico, visto que, nos tempos 4 a 8 horas, foram registrados os maiores valores da maioria dos parâmetros da avaliação da fermentação ruminal, portanto, dentro da faixa de 6 a 12 horas, referida pela literatura, para que o processo de digestão de celulose seja intensificado.

Os dados colhidos, neste trabalho experimental, mostraram que pH, N-NH₃ e AGV apresentaram flutuações, no tempo, indicativas do caráter dinâmico e cíclico da atividade metabólica, no rúmen. Observa-se, assim, a importância da escolha dos horários de amostragem para a representação correta das tendências prevalentes no rúmen, bem como para a indicação da atividade ruminal decorrente da atuação máxima dos microorganismos. A extensão do período de coleta de fluido ruminal para até 10-12 horas após a alimentação pode ser aconselhada em lugar da amostragem restrita até 2 a 4 horas pós-ingestão do alimento.

Pode-se afirmar que as variações observadas entre os animais provêm de diferenças acentuadas no padrão de fermentação por eles apresentado, independentemente de dieta, explicadas, em parte, pela diferença entre vacas quanto à taxa de passagem da ingesta pelo rúmen e incrementada pelo provável efeito da saliva, resultante do "stress" no momento da coleta, sobre a taxa de diluição da fase líquida do rúmen.

A partir das observações feitas na presente pesquisa, deve-se recomendar cautela com as inferências feitas para uma população, com base em estudos de ruminologia realizados com poucos animais, pois os dados obtidos estão sujeitos a uma grande variação, determinada, sobretudo, pelas diferenças individuais, visto que a parcela experimental é o animal e não apenas o rúmen adulto.

INFLUENCE OF METHODS OF COLLECTING RUMINAL LIQUOR ON FERMENTATION PARAMETERS IN CATTLE FED DIFFERENT PROTEIN SOURCES

Author: Otávia Elisa Nogueira Mendes Lavezzo

Adviser: Prof. Dr. Vidal Pedroso de Faria

SUMMARY

The purpose of this work was to study the influence of methods of collecting ruminal liquor on fermentation parameters. The ruminal liquor was collected by means of an esophagian tube and rumen fistula. The work was carried out with 2 replications (blocks) and factorial design $2 \times 2 \times 9 \times 4$ treatments. The factors were: methods of collecting rumen liquor; isoproteic diets (alcohol fermentation yeast and cotton seed meal); rumen liquor sampling time (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 and 24 h after feeding); animals (four cows with rumen fistula).

After an adaptation period of 21 days, two 15-day experimental periods were established. On the 5th and 12th day of each period the rumen liquor was collected by means of two methods, esophagian tube and, after, ruminal fistula, nine sampling times post-feeding in the 4 cows, two on a yeast diet (D_1) and two on a cotton seed meal diet (D_2). In the second period, the procedure was the same but the diets were inverted for the animals.

Cows were fed once daily, in the morning, with a total DM intake of 1.41 DM/100 kg liveweight/day.

The following parameters were measured: pH, ammonia nitrogen concentration (mg/100 ml liquor, N-NH₃) and volatile fatty acids levels (VFA, mM).

Samples collected by means of the esophagean tube showed a higher average value for pH (7.28) and lower average values for N-NH₃ (9.75 mg/100 ml) and VFA average concentration levels (66.59; 44.11; 12.62; 8.08; 0.93 and 0.85 mM for total VFA and acetic, propionic, n-butyric, isovaleric and n-valeric, respectively) when compared to samples collected by means of the rumen fistula: pH, 6.75; N-NH₃, 10.77 mg/100 ml; total VFA, 85.39 mM; acetic acid 56.04 mM; propionic acid, 16.48 mM; n-butyric acid, 10.65 mM; isovaleric acid, 1.14 mM; and n-valeric acid, 1.08 mM, respectively.

Samples obtained by means of the esophagean tube showed higher pH values ($P < .01$) at all sampling times, whereas for total VFA the measured levels were lower ($P < .01$) due, for the both cases, to the great saliva interference on the samples collected by means of this method.

The inferences about rumen studies must be careful due to the interference of methods of collecting ruminal liquor on the measurements of fermentation parameters. It was observed that there are advantages and disadvantages of using the two methods of collection. The rumen fistula method is indicated when one desires more accuracy and the esophagean tube method only for an indication of the behavior of treatments.

Interactions diet x time showed that both diets had a good N-NH₃ availability. Higher and equal acetic acid productions, for the 24 h period, showed that cellulolytic bacteria were favored and had a better development than the others. As for the lower pH and higher N-NH₃, total VFA and each acid values, there was a trend for occurrence during the day. Therefore, a fermentation process must have occurred, the most cellulolytic as long as for times 4 to 8 h, higher values were observed for most of the parameters of evaluating ruminal fermentation,

so within 6 to 12 h, as reported in the literature, so the cellulose digestion process could be intensified.

Collected data from this work showed that pH, N-NH₃ and VFA presented fluctuations at the time indicative of the dynamic and cyclic character of the metabolic activity in the rumen. So it can be emphasized the importance of choosing the sampling time for the correct presentation of trends in the rumen, as well as the indication of ruminal activity as a function of maximum microorganisms activity. The range of the collection ruminal fluid period can be extended to 10-12 h post-feeding instead of sampling restricted up to 2 to 4 h post-feeding.

Individual differences are important and consequently lead to unequal data due to the different behavior of animals under different feeding and management conditions imposed.

It can be said that variations observed between animals originate from great differences in the fermentation pattern, regardless of the diet, and explained, partially, by the difference between cows in the rate of passage of ingesta from the rumen and enhanced by the possible effect of saliva resulting from stress in the moment of collection, on the dilution rate of the rumen liquid phase.

Care is recommended for the inferences for a population based on ruminology studies carried out with few animals for data are subjected to a great variation due, mostly, to individual differences taking into consideration that the experimental parcel is the animal and not only the adult rumen.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso para a obtenção de resultados confiáveis acerca da fermentação ruminal depende do conhecimento e aplicação exata do método de coleta do líquido de rúmen. Neste sentido, a sonda esofagiana tem sido amplamente utilizada para a coleta de amostras de fluido ruminal, a partir de animais íntegros. Esta técnica tende a ser um tanto insatisfatória por consumir maior tempo para operação de coleta e estar mais sujeita às diferenças individuais, em comparação com aquela em que se obtém a amostra diretamente através de fístula ruminal. Em contrapartida, animais com fístula permanente no rúmen não são as parcelas experimentais mais adequadas para estudos de carcaça, crescimento e conversão alimentar. Entende-se, portanto, ser de interesse a comparação analítica do líquido de rúmen obtido através de sonda esofagiana e fístula ruminal, para se determinar a influência dos métodos de coleta sobre os parâmetros de fermentação, em bovinos.

Desta forma, atualmente, a avaliação de uma dieta não deve ser feita apenas através de provas de digestibilidade, de ganho de peso, testes de qualidade de carcaça, etc., mas é também desejável a mensuração dos parâmetros de fermentação ruminal, para se ter uma indicação das reais possibilidades desta dieta em termos de promover uma melhoria no desempenho animal. Isto se aplica, sobretudo, para os subprodutos industriais ou agrícolas disponíveis hoje em dia para o consumo animal, quase sempre, no entanto, carentes de estudos para o conhecimento de suas potencialidades, bem como para esclarecimento das impli-

cações que o seu uso pode trazer para o processo produtivo animal.

Neste âmbito, atenta-se para a levedura de fermentação alcoólica, subproduto das indústrias de cana, em que o Brasil é, potencialmente, rico. Este subproduto é um material rico em proteína, com boa proporção de minerais e uma digestibilidade de 88%. Necessita, no entanto, para ser utilizada no arração animal, de um processamento para ser secada, ficando com cerca de 10% de umidade e inativada, para não voltar a fermentar em contato com solução açucarada. Existem registros atuais de utilização de levedura de fermentação alcoólica na alimentação de bovinos, com efeito positivo na engorda, porte e cor da pelagem, bem como na produção de leite.

Para se avaliar um alimento utilizado na alimentação de ruminantes, torna-se muito interessante e de grande valor informativo, o conhecimento do seu padrão de fermentação ruminal, devendo-se pesquisar, para isso, primordialmente, os principais parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a saber: nitrogênio amoniacal, ácidos graxos voláteis e pH.

Neste sentido, justifica-se, na presente pesquisa, o estudo do padrão de fermentação do farelo de algodão, ingrediente tradicionalmente empregado na alimentação de ruminantes e de eficiência comprovada sobre o desempenho animal. Igualmente, numa tentativa de melhorar o conhecimento de um alimento recentemente introduzido na alimentação animal (levedura), é válido proceder-se ao mesmo estudo. Espera-se, com isto, propiciar uma estimativa do provável desempenho dos animais a ela submetidos, mediante a comparação dos resultados da mensuração dos índices de fermentação ruminal da levedura e do farelo de algodão.

O presente trabalho teve por objetivo comparar os dois métodos de coleta do fluido ruminal quanto à

capacidade de proporcionar amostras realmente representativas do conteúdo de rúmen, a fim de que as mensurações subseqüentes dos parâmetros de fermentação, para cada dieta, pudessem ser fidedignas. A par disso, tentou-se estabelecer os efeitos da utilização de levedura de fermentação alcoólica a nível de rúmen, em relação ao farelo de algodão, tradicionalmente empregado como fonte proteica para ruminantes, buscando-se dados importantes para que o fornecimento deste subproduto promova um máximo desempenho animal.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. Métodos de coleta

Para a interpretação dos parâmetros de fermentação ruminal é muito importante se saber qual o método de coleta de fluido ruminal empregado, ou seja, se a amostra foi obtida via fístula ruminal ou via sonda esofagiana. O método da sonda tende a ser um tanto insatisfatório e consome um maior tempo do coletador, quando comparado com a obtenção de amostras, diretamente, através de fístula permanente no rúmen (RAUN & BURROUGHS, 1962). A par disso, segundo estes autores, os animais fistulados não são as parcelas experimentais mais aconselháveis, quando se deseja fazer estudos de crescimento e carcaça, paralelamente, aos de ruminologia.

WOHLT *et alii* (1976) demonstraram que os níveis de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$), no rúmen, podem ser sub ou superestimados, dependendo do local no qual a amostra é obtida e se é colhida via sonda esofagiana ou via fístula ruminal. Relataram que a concentração de amônia foi maior na região dorsal do rúmen e que os teores de $N-NH_3$ foram sempre mais baixos nas amostras obtidas via sonda esofagiana, quando comparadas às tomadas via fístula ruminal.

Tendo-se em vista a heterogeneidade do conteúdo ruminal (LANE *et alii*, 1968), a amostragem do mesmo, a partir de um local, via fístula ruminal ou via sonda esofagiana, é de validade questionável, especialmente, quando

o pH (SMITH, 1941; SMITH *et alii*, 1956; BRYANT, 1964; DAVISON, 1965; LANE *et alii*, 1966) e concentrações de ácidos graxos voláteis - AGV (SMITH, 1941; BRYANT, 1964; DAVISON, 1965; LANE *et alii*, 1966), são os parâmetros críticos. Para LANE *et alii* (1968), a análise do conteúdo ruminal proveniente de um só local dá uma imagem irreal das condições prevalentes no rúmen. Segundo CHURCH (1979), o pH é um pouco mais elevado no retículo e região dorsal e cranial do rúmen do que nas outras áreas. DIRKSEN & SEIDEL (1975) relataram que a maior quantidade de fluido e a presença de menos forragem no rúmen tornam mais fácil a aspiração do líquido ruminal via sonda esofagiana. Segundo estes autores, mesmo sob condições favoráveis à aspiração do fluido ruminal, o pH mensurado em amostras colhidas via sonda esofagiana foi superior de 0,3 a 0,4 unidades, em relação ao determinado em amostras obtidas nas regiões mais inferiores do saco ventral, através de fístula ruminal. CHURCH (1979) e KOLB (1984) registraram a comparação entre as medidas do pH ruminal feitas através da introdução direta de eletrodos no rúmen ou após a retirada de amostras colhidas por qualquer método de coleta. Relataram que, durante a extração e conservação do conteúdo ruminal, ocorre perda de CO_2 e, conseqüentemente, o valor do pH se eleva.

WOHLT *et alii* (1976) constataram que, se a amostra obtida através de fístula ruminal, mediante homogeneização do conteúdo do rúmen, representa a verdadeira concentração de N-NH₃, então, os níveis de amônia mensurados em amostras colhidas via sonda esofagiana subestimam o N-NH₃, no rúmen, em 27%.

Sem dúvida, o sucesso para obtenção de qualquer bom resultado clínico e laboratorial depende, primordialmente, do conhecimento e aplicação meticulosa de método de coleta adequado. Segundo ORTOLANI (1981), os valores de pH do fluido ruminal de bovinos variam de 5,9 a 7,1, com alterações, dentro de certos limites, causadas pelo tipo de dieta consumida e pelo momento da coleta em rela-

ção à alimentação. Valores anormais, no entanto, são obtidos em amostras que apresentam acentuada alcalinidade do pH, pela interferência da saliva, quando a coleta é feita via sonda esofagiana (BAILEY & BALCH, 1961).

O teor de fibra bruta desempenha, indiretamente, o papel de estabilizador do pH ruminal. De um lado, a produção de AGV é lenta e regular, mas o fator determinante é, certamente, a duração mais longa e o número mais elevado de períodos de ruminação que ocorrem com estes alimentos mais grosseiros. Como consequência, a ruminação estimula a secreção de saliva que pode dobrar ou mesmo triplicar em função do momento da coleta em relação à alimentação e do tempo gasto na ruminação (TELLER *et alii*, 1977).

Os animais ruminantes secretam grandes quantidades de saliva (CHURCH, 1979) e este é o fator mais importante para a manutenção do volume do líquido de rúmen, além de fixar o estado do pH e a composição iônica do fluido ruminal (ANNISON & LEWIS, 1966). Mesmo quando o animal está em repouso, ocorre pequena e contínua secreção de saliva (BAILEY & BALCH, 1961). Esta pode penetrar na sonda e atingir a amostra que, se colhida em quantidade reduzida, pode sofrer maior ação do tamponamento salivar, dado por seu conteúdo em carbonatos e fosfatos, alterando o pH global do conteúdo ruminal que se apresentará mais elevado (ORTOLANI, 1981). De acordo com este autor, ao serem coletados volumes entre 300 e 500 ml ou mesmo maiores que 500 ml de fluido ruminal, através de sonda esofagiana, os valores de pH mensurados se apresentaram dentro dos padrões normais (respectivamente, 6,75 e 6,7), quando comparados aos obtidos, mediante a colheita de amostras com volumes inferiores a 300 ml (pH = 7,5). Quando a alimentação foi exclusiva de forragens verdes, na primeira, terceira e quinta horas após a administração do alimento, ele observou que a quantidade de material colhido foi menor devido à não digestão da forragem. Este fato, além de diminuir a razão líquido/sólido, no interior do rúmen, causou, ainda, a ade

rência de verdadeiras massas de forragens ao redor da cúpula coletora, ocluindo seus orifícios de forma parcial ou total. Também RAUN & BURROUGHS (1962) encontraram valores, significativamente, mais altos de pH ($P < 0,05$), em amostras tomadas via sonda esofagiana (6,4) do que naquelas obtidas através de fístula ruminal (6,2).

As diferenças entre animais têm influência sobre a intensidade de produção de saliva, no caso de se utilizar a sonda esofagiana como método de coleta de fluido ruminal. Assim, animais mais bravios estão sujeitos a estímulos adrenérgicos exteriores, o que lhes causa maior salivação, mesmo que temporária (KAY, 1954 e 1955). ORTOLANI (1981) citou ocorrências, como presença de divertículos, papilomas ou outros tumores, além de granulomas micóticos e estenoses do esôfago ou do cárdia, inviabilizando animais para a utilização do método de sonda esofagiana. Segundo este autor, uma maior salivação pode ser também decorrente de falta ou deficiência de lubrificação da sonda esofagiana, como consequência da demora ou parada da mesma no esôfago, uma vez que, devido características individuais, em certos animais, a sua penetração é mais difícil.

Conforme CLARK & WEISS (1952), o excitamento táctil ou a irritação mecânica do esôfago torácico são potentes estímulos à secreção salivar. A adoção do método de preensão da língua sem retirá-la da cavidade bucal, proposto por ORTOLANI (1981), ao evitar a retração da mesma, diminui o tempo de estímulo mecânico na região oral, o que, segundo COMLINE & KAY (1955), provoca intensa salivação reflexa. O estímulo simpático determina aumento temporário de salivação, conforme estes últimos autores, e posterior suspensão ou redução da atividade secretora das glândulas salivares. Mecanismo similar ao estímulo simpático ocorre com o aumento da secreção de adrenalina no animal (KAY, 1955).

A presença de concentrados na dieta e a diminuição da quantidade de forragem ingerida, segundo DIRKSEN & SEIDEL (1975), tornaram a colheita de fluido ruminal via sonda esofagiana mais fácil porque o conteúdo de rúmen se apresentou mais fluido, além de conter menor quantidade de material que poderia causar entupimento na cúpula coletora da sonda.

A sonda esofagiana tem sido, largamente, utilizada para retirada de amostras de fluido ruminal em animais intactos. Parece ser um método de coleta insatisfatório, visto que as amostras obtidas por seu intermédio tendem a apresentar um pH um pouco mais elevado (RAUN & BURROUGHS, 1962; ORTOLANI, 1981) e concentrações de N-NH₃ (WOHLT *et alii*, 1976) e de AGV (RAUN & BURROUGHS, 1962) um tanto baixas, quando comparadas às colhidas via fístula ruminal. No entanto, RAUN & BURROUGHS (1962) assumiram, para o pH e AGV, que as diferenças observadas eram pequenas, não parecendo induzir qualquer erro nas mensurações comparativas entre os dois métodos de coleta de fluido ruminal. Atribuíram à diluição salivar na área anterior do retículo-rúmen, a explicação para os mais elevados valores médios de pH e mais baixas concentrações médias de AGV totais e individuais por eles mensurados nas amostras colhidas por sonda esofagiana, em relação às obtidas através de fístula ruminal.

Segundo estes autores, o método da sonda esofagiana mostrou-se, suficientemente, sensível para detectar mudanças consistentes nas taxas ruminais de acetato/propionato, quando os animais intactos foram transferidos de uma dieta com nível mais baixo de concentrado para outra com nível mais alto. RHODES (1961) também notou que animais intactos (amostrados via sonda esofagiana), foram mais sensíveis à mudança na ração tratamento do que se mostraram os animais fistulados, quando mensurou a relação acetato/propionato. Sabe-se que a relação acetato/propionato é estreita, quando o pH ruminal decresce, o con-

trário ocorrendo para o aumento do pH (SLYTER *et alii*, 1966; ESDALE & SATTER, 1972; STANLEY *et alii*, 1972).

Com relação à proporção molar do ácido acético, PUTNAM *et alii* (1969) registraram maiores valores nas amostras obtidas via fístula ruminal e, no tocante ao ácido n-butírico, os níveis mais altos foram registrados nas amostras colhidas por sonda esofagiana. Estes mesmos autores sugeriram cautela na interpretação dos dados de AGV obtidos a partir de animais fistulados, tendo-se em vista a sua generalização e aplicação para uma população. Assim, quando a saliva foi coletada em animais bifistulados (esôfago e rúmen), registraram que as proporções molares dos ácidos propiônico (20 versus 17%) e isobutírico (1,5 versus 1,1%) foram, significativamente, maiores ($P < 0,005$) do que quando a coleta de saliva não foi feita. Evidenciaram o contrário para o ácido acético (67 versus 70%).

Os dois métodos de coleta de fluido ruminal apresentam vantagens e desvantagens. O método da sonda esofagiana torna possível a obtenção de amostras adequadas provenientes de animais intactos, além de propiciar que as mensurações da fermentação ruminal possam ser feitas em número relativamente grande de animais, nos quais outros parâmetros, tais como crescimento, conversão alimentar, estudos de carcaça estejam sendo avaliados, simultaneamente (RAUN & BURROUGHS, 1962).

Sem dúvida, o estudo das reações que ocorrem, no rúmen, bem como a identificação de sua população microbiana, tomaram um grande impulso com o advento da técnica de fistulação, iniciada em 1933. É um método menos sujeito às diferenças individuais, mas que pode ser aplicado a um número restrito de animais e nunca permite a mensuração concomitante do desempenho animal evidenciado por crescimento, conversão alimentar, estudos de carcaça. A maior dificuldade encontrada no método de fístula ruminal diz respeito, atualmente, à manutenção do animal e nem tanto ao

estabelecimento e permanência de uma cânula acoplada a esta fístula. Anteriormente, dentre os principais problemas relatados, citam-se a abreviação da vida útil dos animais fistulados e o fracasso da fistulação devido à necrose por pressão nas extremidades da cânula (CAMPBELL *et alii*, 1968), o que, felizmente, sabe-se não ocorrer via de regra.

2.2. Dietas experimentais

A fisiologia do rúmen permite um crescimento ótimo dos microorganismos que aí se desenvolvem, uma vez que a temperatura é constante e há o aporte regular de substâncias de origem alimentar, renovando, constantemente, o meio de cultura. Além disso, o rúmen é tamponado por bicarbonatos e fosfatos salivares, bem como pelos ácidos graxos voláteis, permitindo, desta maneira, que os microorganismos e seu hospedeiro vivam em perfeita simbiose. Mesmo o consumo de alimentos ricos em fibra e nitrogênio não proteico permite ao ruminante sobreviver, produzindo carne ou leite, graças à utilização de alimentos grosseiros pelos microorganismos do rúmen. Deste modo, os alimentos se submetem a uma profunda transformação, no rúmen, produzindo proteínas bacterianas e protozoários que se constituem em fontes significativas de energia, além de terem um alto valor biológico comparável ao da proteína do leite (McNAUGHT *et alii*, 1950, 1954).

Os diferentes tipos de dieta têm efeito sobre o padrão de fermentação ruminal, como evidenciam os estudos de HEAD (1959) e CHALMERS (1961), com dados sobre N-NH₃; BALCH & ROWLAND (1957) e BATH & ROOK (1963, 1965), com dados sobre AGV.

Assim, ilustrando, a ração ideal para o máximo uso de nitrogênio deveria conter proteína de boa digestibilidade com uma baixa solubilidade no rúmen (CHALMERS, 1961). Esta afirmação se baseia na premissa de que

elevados teores de amônia ruminal são indicativos de baixa utilização de nitrogênio pelo ruminante. Obviamente, deve haver uma quantidade adequada de nitrogênio nas formas requeridas para o crescimento e atividade dos microorganismos ruminais, pois, uma degradação excessiva, além destes requerimentos, tenderá a ser um desperdício, visto que uma proteína altamente digestível pode ser mais eficientemente utilizada pelo ruminante, se a sua digestão tiver lugar no intestino delgado (CHURCH, 1979).

No tocante ao efeito sobre a produção de AGV, dietas ricas em amido ou sacarose, ou seja, alimentos que fermentam rapidamente no rúmen, produzem menos ácido acético (ANNISON & LEWIS, 1966). Nestas condições, ocorre uma diminuição do pH ruminal, o que favorece a proliferação de microorganismos que produzem ácido propiônico (BALCH & ROWLAND, 1957). As mudanças no pH podem afetar também as taxas de absorção dos AGV (GRAY, 1948). BATH & ROOK (1963) evidenciaram que o tipo de proteína e o carboidrato prontamente disponível no rúmen afetam a quantidade de ácido n-butírico produzido, aumentando-a, no caso de dietas ricas em proteína. Além disso, segundo estes autores, a utilização de sacarose, como fonte de carboidrato, produz aumentos iguais de ácido propiônico e ácido n-butírico.

A qualidade da dieta, o tamanho de partícula e o consumo alimentar são importantes fatores que afetam a fermentação no rúmen (ORSKOV *et alii*, 1968). Neste sentido, estes autores verificaram que as variações nas proporções dos AGV individuais estão relacionadas com os níveis de consumo. Assim, relataram que teores elevados de ácido n-butírico, no rúmen, estão associados com altos níveis de consumo. Por serem estes teores um pouco mais altos nas dietas exclusivas de concentrados, eles refletem um decréscimo na eficiência fermentativa destas dietas, em relação às exclusivas de volumosos, pois a quantidade de carboidratos fermentados é menor, quando do fornecimento daquelas dietas.

CASTLE & WATSON (1969, 1970), trabalhando com vacas leiteiras que receberam rações à base de silagem de gramíneas, encontraram que o padrão de fermentação por elas apresentado foi caracterizado por valores de pH ao redor de 7, baixos níveis de AGV totais e altos valores de porcentagem molar do ácido acético, no fluido ruminal. Da mesma forma, GRIFFITHS & BATH (1973) relataram, para dietas exclusivas de silagem com baixo teor de matéria seca, pH próximo de 7, tendo verificado, porém, que a adição de suplemento proteico (farelo de amendoim ou uréia) nunca abaixou o pH para valores menores que 6. Assim, dietas com predominância de forragens devem apresentar pH próximo da neutralidade (MOIR & SOMMERS, 1957; BATH & ROOK, 1963; TREMERE *et alii*, 1968 e KAUFMAN, 1976). Já, de FARIA (1982), estudando dieta exclusiva de silagem de milho com 33,5% de matéria seca, fornecida uma vez por dia, na base de 1,9 kg/100 kg PV/dia, registrou pH médio de 6,8.

A freqüência alimentar de uma a quatro vezes por dia tem uma pequena influência sobre o valor médio registrado para o pH, determinando efeitos mais leves em dietas exclusivas de feno (variação de pH de 6,42 a 6,44) e menos suave na dieta composta de feno mais concentrado, na proporção de 1:1 (variação de pH de 6,52 a 6,38), conforme BATH & ROOK (1963).

Com relação ao consumo alimentar, PUTNAM *et alii* (1966) notaram apenas uma leve alteração do pH, em animais alimentados com dieta constituída por 89% de volumoso, quando o nível de consumo passou de 2,0 e 2,6% para 0,8 e 1,4% do peso vivo.

A alta digestibilidade da fibra bruta de silagens com baixo teor de matéria seca (HEAD & MURDOCH, 1965; GRIFFITHS *et alii*, 1973) e da celulose (BEEVER *et alii*, 1971) é uma importante característica destas dietas, podendo ser atribuída, em parte, às condições estáveis do pH ruminal (GRIFFITHS & BATH, 1973). Entretanto, o pH é

apenas um dos fatores que influi sobre o crescimento de bactérias celulolíticas, no rúmen (KISTNER, 1965). Assim, ERFLE *et alii* (1982) determinaram "in vitro" que o número destas bactérias diminui, drasticamente, quando o pH cai de 6 para 5,5.

O pH reflete a dieta (CHURCH, 1979), afetando não só os produtos finais de fermentação, mas também a taxa de crescimento das bactérias e protozoários (HOBSON, 1965), havendo uma variação nos microorganismos predominantes, no rúmen, em função do mesmo (HOBSON, 1972). Dietas ricas em volumosos (com baixo teor de carboidratos solúveis), geralmente, evidenciam um pH mais alto e resultam em aumento de organismos celulolíticos (CHURCH, 1979). Por outro lado, o tamanho das partículas alimentares tende a causar diminuição do pH ruminal, tendo-se em vista o aumento da taxa de fermentação, no rúmen (CHENG & HIRONAKA, 1973).

A amônia é o principal produto final resultante do processo fermentativo de proteína realizado pelos microorganismos ruminais e é também a principal fonte de nitrogênio usada para a síntese de proteína microbiana (BRYANT & ROBINSON, 1968). Em dietas à base de silagem, GRIFFITHS & BATH (1973) e de FARIA (1982) não registraram concentrações altas de N-NH₃. Segundo HUGHES (1979), dietas de silagem com baixo teor de matéria seca não continham proteína solúvel, relatando que 2/3 do nitrogênio original estava sob a forma de nitrogênio não proteico (NNP) e que os aminoácidos individuais (arginina, lisina e ácido aspártico) eram, seletivamente, degradados. Para estas dietas, ainda, GRIFFITHS *et alii* (1973) justificaram os níveis, geralmente, baixos de nitrogênio total, no fluido ruminal, através de uma maior velocidade de passagem de materiais solúveis pelo rúmen, decorrente de um alto consumo de água verificado quando o animal ingere silagem.

A liberação de amônia resulta da atividade

ureolítica dos microorganismos do rúmen, denunciada pelo acúmulo de amônia, registrado quando os valores de pH se situam entre 6,0 e 6,7, favoráveis à atividade da urease (REIS & REID, 1959). No entanto, o valor ótimo da atividade desta enzima, em bovinos alimentados com volumosos, está no pH 8,17 (PROKOP *et alii*, 1971), tendo MÜLLER & KIRCHNER (1971, 1972) registrado a sua atividade na faixa de pH entre 5,4 e 7,3.

É de interesse o conhecimento do conteúdo de proteína de uma dieta, a partir do qual não se consegue melhorar mais o desempenho animal. Para isso, é preciso estabelecer a concentração limite, acima da qual o N-NH₃ ruminal cessa de promover aumento no crescimento das bactérias do rúmen. Neste sentido, SATTER & SLYTER (1974) mostraram "in vitro" que concentrações de N-NH₃ superiores a 5 mg/100 ml de fluido representam um excesso que não é utilizado para a síntese microbiana. Em experimento conduzido por SLYTER *et alii* (1979), animais recebendo dieta com 11,1% de proteína bruta ou menos apresentaram concentrações muito baixas de N-NH₃. Já, aqueles que receberam dietas com teor proteico de 13,3% ou mais revelaram acúmulo de N-NH₃, no rúmen, indicando que os microorganismos foram supridos com mais N-NH₃ do que eles poderiam utilizar. Dietas contendo mais de 30% de fibra bruta (portanto, menos digestíveis), requerem menos de 2,24% de nitrogênio dietético (14% de PB), com o intuito de manter o nível de amônia necessário para a máxima síntese microbiana ruminal (ROFFLER & SATTER, 1975; SLYTER *et alii*, 1975).

O rápido desaparecimento da amônia, no rúmen, por outro lado, pode ser atribuído à sua absorção que somente ocorre depressa, quando o pH ruminal está acima de 7,5. Todavia, é muito lenta, quando o pH está abaixo de 6,7 (BLOOMFIELD *et alii*, 1963; SMITH, 1975). O desaparecimento da amônia em pH inferior a 7 deve ser considerado como um reflexo de sua utilização pelos microorganismos ruminais (NOLAN *et alii*, 1973), pois, a absorção de N-NH₃ só

ocorre em pH alto, uma vez que a permeabilidade da mucosa do rúmen é maior entre pH 6,8 e 7,8, conforme DECKER *et alii* (1961).

Havendo N-NH₃ disponível no rúmen, é preciso que ocorra uma produção de energia suficiente para garantir uma máxima taxa de fermentação ruminal. Os ácidos graxos voláteis são a principal fonte de energia para os ruminantes, sendo produzidos, no rúmen, a partir da fermentação da celulose e de outros carboidratos complexos, através de enzimas produzidas pelos microorganismos ruminais.

As proteínas e aminoácidos também podem ser fontes dos ácidos n-butírico, isobutírico, 2-metil butírico e isovalérico, os quais aumentam seus níveis a partir do ataque microbiano de proteínas, no rúmen (el SHASLY, 1952).

Algumas proteínas são mais solúveis no fluido ruminal e são degradadas mais facilmente pelos microorganismos do rúmen. Como a uréia do plasma de ruminantes alimentados com proteínas de alta solubilidade permanece baixa, é de se supor, segundo AHRAR & SCHINGOETHE (1979), que, ou ocorre uma degradação mais lenta destas proteínas pelos microorganismos, ou que a amônia liberada foi utilizada mais eficientemente para a síntese de proteína microbiana. A par disto, relacionando com a maior solubilidade da proteína da levedura, comparativamente, à do farelo de algodão, MACHADO (1983) registrou níveis superiores de ácido n-butírico, em dieta contendo aquela fonte proteica.

HUNGATE (1966) relatou que o aminoácido prolina pode ser reduzido para ácido δ amino-valérico que pode ser convertido em ácido n-valérico, considerado um dos fatores de crescimento para algumas bactérias celulolíticas existentes no rúmen. Estas bactérias, presentes em maior número no rúmen de animais alimentados com dietas constituídas de volumosos, podem utilizar também os isoácidos para a sua nutrição (RUMSEY *et alii*, 1970).

Com relação ao ácido acético existe uma relação linear entre a proporção molar deste AGV e um teor de fibra maior que 15%, na ração (KOLB, 1984).

Neste sentido, devido a um maior teor de fibra, a dieta contendo farelo de algodão apresentou uma porcentagem molar de ácido acético superior ao apresentado por dietas contendo levedura (MACHADO, 1983). Uma ilustração da relação entre ácido acético e o teor de carboidratos estruturais (BATH & ROOK, 1963) é o registro de produção de leite com um teor de gordura entre 3 e 3,2%, mediante o consumo de dietas contendo mais de 15% de FDA (fibra em detergente ácido) e teor de proteína igual ou superior a 13%, na matéria seca (BARNEY *et alii*, 1981).

A produção alta de ácido acético, decorrente da fermentação de dietas ricas em fibra, comprova, por outro lado, que as bactérias celulolíticas foram beneficiadas, se desenvolvendo, provavelmente, mais que as outras (LENG, 1973). No entanto, um processo fermentativo típico de desdobramento de celulose se caracteriza por um aumento proeminente na produção de ácido acético 10 horas após a alimentação (STEWART *et alii*, 1958) e não extensivo até 6 a 12 horas pós-ingestão de alimentos, como demonstraram HALE *et alii* (1947), utilizando dietas à base de feno fornecidas a animais fistulados. Para STEWART *et alii* (1958), a concentração de AGV no rúmen aumentou após a alimentação durante 4 a 6 horas, ocorrendo as maiores taxas de produção 2 horas após a ingestão de alimento. O aumento da produção de ácido acético caiu pelas 12 horas pós-alimentação. Já, HALE *et alii* (1947) relataram que a degradação de celulose se processa mais rapidamente entre 6 e 12 horas pós-alimentação, paralisando-se depois disso.

Segundo CHURCH (1979), o incremento na produção de ácido n-butírico pode ser atribuído à elevação do ácido acético, pois trabalhos experimentais revelaram que 40 a 80% do ácido n-butírico presente no rúmen, é consequência da atuação dos microorganismos sobre o ácido acético, promovendo

a condensação de dois moles de acetato para a formação de um mol de butirato.

A estrutura física do alimento está relacionada com a produção de ácido propiônico e de ácido n-butírico (KOLB, 1984), tendo sido evidenciado isto por MACHADO (1983) para a levedura, ao compará-la com a fonte proteica farelo de algodão.

Os principais microorganismos produtores de ácido propiônico fazem a sua síntese, a partir do lactato, através da fixação de CO_2 e requerem um pH ótimo de 6 (Elsden, 1945, citado por ANNISON & LEWIS, 1966). Entretanto, estudando dietas de volumosos, SLYTER (1979) relatou baixa produção de ácido láctico entre pH 5 e 6. Isto estimulou a averiguação e posterior constatação de que o ácido propiônico tem mais de uma via de produção. Neste sentido, SATTER *et alii* (1964), estudando "in vitro" a degradação de celulose e hemicelulose, observaram que houve produção de ácido propiônico, a partir desses substratos, via succinato.

As proporções de AGV totais, no entanto, são bem mais dependentes do pH ruminal do que da constituição da dieta (McCULLOUGH & SMART, 1970), podendo-se associar uma queda do mesmo a uma diminuição do componente acetato. Ainda, KOLB (1984) relaciona a diminuição da absorção ruminal de AGV com a magnitude do pH, relatando que em pH de 7 a 7,5, a taxa de absorção diminui muito devido ao decréscimo da lipossolubilidade dos ácidos graxos livres facilmente absorvíveis. Além disso, segundo ANNISON & LEWIS (1966), nesta faixa de pH, os AGV estão, em grande parte, sem se dissociar e, como tal, não são absorvidos.

É oportuno atentar-se para o fato de que a escolha do momento de amostragem do fluido ruminal entre 2 e 4 horas após a ingestão de alimento tem sido muito importante para a caracterização de diferenças entre rações (AL

LEN, 1972; FOLDAGER, 1977). A adoção da frequência alimentar de uma vez por dia fez com que os animais pudessem ingerir toda a dieta num mesmo período de tempo (ALLEN, 1972). É possível se observar a presença dos picos de AGV e de N-NH₃, bem como a redução do pH para valores mais baixos, entre 2 e 4 horas após a alimentação (GRAY & PILGRIM, 1951; BALCH & ROWLAND, 1957; BRIGGS *et alii*, 1957). A homogeneidade dos dados coletados pode ser, ainda, facilitada, no caso de serem utilizados animais treinados a consumir toda a ração em menos de 1 hora (HARROP & PHILLIPSON, 1974), ou submetendo-se os mesmos a um período de jejum variável levado a efeito no dia anterior ao da coleta de fluido ruminal.

2.3. Tempos de amostragem

As curvas de pH, N-NH₃ e AGV apresentam oscilações cíclicas com significado fisiológico, pois são um reflexo de atividade metabólica ruminal dinâmica, ao longo do dia (McDONALD, 1952; ANNISON *et alii*, 1954; LEWIS & McDONALD, 1958; SCHAADE & JOHNSON, 1969; MAHADEVAN *et alii*, 1982). Tais flutuações são mascaradas, quando se usam valores médios, sendo mais correta a descrição dos parâmetros de fermentação, em termos de máximo e mínimo e taxas de variação (MAHADEVAN *et alii*, 1982).

Assim, com relação ao pH, os valores mais baixos, usualmente, ocorrem 2 a 3 horas após a alimentação (PANDE & SHUKLA, 1981). As variações no pH são consideradas resultantes de mudanças nas concentrações dos AGV, bem como da quantidade de saliva produzida (CHURCH, 1979). Também a velocidade de passagem da ingesta para os outros compartimentos, além da dieta e da velocidade de absorção dos produtos finais da fermentação ruminal, influem sobre a rapidez e a magnitude das mudanças do pH (SINGH & SUD, 1981).

A elevação da concentração de amônia ocorre logo após a ingestão de alimento, alcançando um máximo, no geral, 1 a 2 horas (PANDE & SHUKLA, 1981; KOLB, 1984) ou 2 a 3 horas (DAVIS & STALLCUP, 1967; BUCHANAM-SMITH & YAO, 1978 e de FARIA, 1982) após o fornecimento de dieta com uréia, farelo de soja, farelo de soja + uréia, silagem de milho. Para o farelo de soja, DAVIS & STALLCUP (1967) relataram uma liberação mais lenta e mais uniforme de $N-NH_3$ entre 2 e 12 horas após a alimentação, em relação à ração com uréia ou com uréia + farelo de soja como suplementos proteicos. Já, BUCHANAM-SMITH & YAO (1978) evidenciaram que o nitrogênio não proteico (NNP) da silagem de milho liberava amônia em uma taxa muito mais lenta, em relação à uréia e farelo de soja, favorecendo uma utilização eficiente por parte dos microorganismos ruminais. Por outro lado, a presença de altas concentrações de amônia, no rúmen, indica, segundo citações de LUDRI & RAZDAN (1981), uma utilização ineficiente das proteínas alimentares.

No tocante aos AGV, é atual o conceito de que logo após a ingestão de alimento ocorre o pico máximo de produção (JARRIGE, 1978; CHURCH, 1979). Por outro lado, nas dietas ricas em volumosos, a digestão da celulose se manifesta de uma forma lenta e gradativa (HUNGATE, 1966; CHURCH, 1979), o que é confirmado por HALE *et alii* (1947), ao relatarem que durante as seis primeiras horas após a ingestão de alimento houve, em dietas à base de feno, um rápido desaparecimento dos nutrientes mais solúveis (proteínas e carboidratos) do rúmen, enquanto que a celulose foi só levemente digerida. Nas seis horas seguintes, a celulose foi rapidamente degradada, o que indica a presença, entre 6 e 12 horas após a ingestão de alimento, de uma microflora, predominantemente, celulolítica.

As variações diuturnas, evidenciadas nos parâmetros de fermentação ruminal, fizeram com que STEWART *et alii* (1958); RHODES & WOODS (1962), PUTNAM *et alii* (1966) concluíssem a respeito da importância dos tempos de amostragem, para a demonstração da variação das quantidades e proporções dos AGV produzidos no rúmen ou para a re-

apresentação clara das tendências prevalentes no rúmen e da atividade ruminal decorrente da máxima atuação dos micro-organismos (de FARIA, 1982).

2.4. Animais utilizados

As variações entre animais, no tocante aos parâmetros de fermentação ruminal, podem ser muito grandes, mesmo quando se administra uma mesma dieta (GRIFFITHS & BATH, 1973), especialmente, quando ela contém alta proporção de concentrado (BATH & ROOK, 1963). Segundo estes últimos autores, isto é consequência, em grande parte, da variação observada entre vacas, no tocante à taxa da passagem da ingesta pelo rúmen. Igualmente, existem variações no padrão de fermentação ruminal dentro de vacas, considerando-se vários dias de observação.

HODGSON & THOMAS (1975) constataram variações grandes nas proporções molares dos AGV, no rúmen, entre animais ou no mesmo animal, em diferentes tempos. De acordo com estes autores, as diferenças entre animais podem, em parte, refletir a influência da anatomia e fisiologia do indivíduo sobre as condições de fermentação. Por outro lado, reconhece-se "in vitro" que os números, tipos e metabolismo de bactérias e protozoários podem ser influenciados pela taxa de diluição da fase líquida do rúmen, que é, geralmente, maior em animais alimentados com forragem do que em animais alimentados com concentrados (BAUMAN *et alii*, 1971, HODGSON & THOMAS, 1972), podendo ser aumentada, entre outras formas, pela infusão de saliva artificial (HARRISON *et alii*, 1975). Desta forma, evidencia-se que o padrão de fermentação ruminal está, intimamente, relacionado com a taxa de diluição da fase líquida do rúmen que, por sua vez, parece ser modificada pelas características individuais dos animais e pelo tipo de dieta fornecida (HODGSON & THOMAS, 1972; HARRISON *et alii*, 1975). Neste sentido, evidenciou-se que a taxa de dilui -

ção da fase líquida do rúmen, juntamente com o pH, afeta a digestão de proteínas, o crescimento e a eficiência microbianas, conforme relataram os trabalhos de HOOVER *et alii* (1984). Segundo eles, em pH 6,5, os três parâmetros foram altos, nas taxas de diluição testadas (4, 8, 12 e 16%/h) e aumentaram com a elevação destas. Já, em pH 5,5, a digestão de proteína e o crescimento microbiano foram baixos em todas as taxas de diluição.

Verifica-se pelo exposto, face às vantagens e desvantagens apresentadas pelos métodos de coleta utilizados, que é preciso averiguar a eficiência dos mesmos, no tocante à obtenção de amostras realmente representativas do conteúdo ruminal. Ao mesmo tempo, sabe-se que, tanto para a produção de leite, como de carne, há necessidade, para que se obtenham resultados satisfatórios que, em rações com uma fonte de volumoso como a silagem de sorgo, se testem fontes proteicas, a fim de se identificar aquela ou aquelas que propiciam melhorias no processo produtivo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Plano experimental

O trabalho experimental foi conduzido junto ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ, da Universidade de São Paulo. Teve por finalidade estudar a influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação, em bovinos alimentados com silagem de sorgo, como volumoso e levedura de fermentação alcoólica ou farelo de algodão, como fontes proteicas.

Foi realizado com quatro bovinos fêmeas, adultos, em manutenção, com peso médio de 450 kg, no início do experimento. Eram duas vacas flamengas e duas mestiças holandesas, todas apresentando fístula permanente no rúmen. A idade média dos animais era de oito anos, tendo os mesmos permanecido sob as condições experimentais por um período de, aproximadamente, 70 dias.

Para a condução da pesquisa, os animais, durante 21 dias, foram submetidos a um período preliminar de adaptação às dietas. Estabeleceram-se dois períodos experimentais, cada um com duração de 15 dias, dos quais dois deles eram reservados para coletas de fluido ruminal por dois métodos, em nove horários pós-alimentação. Desta forma, teve-se, em cada período experimental, para cada método, um total de quatro repetições por dieta, nos diversos horários de coleta. Entre o primeiro e segundo períodos experimentais houve uma nova fase de adaptação com duração

de 21 dias porque houve uma inversão dos tratamentos atribuídos aos bovinos. Assim, os animais aí destinados à primeira dieta experimental foram os que, no primeiro período, estiveram sob a segunda dieta e vice-versa. Adotou-se um plano de trabalho, onde os bovinos sorteados ao acaso, no início do experimento, foram assinalados a cada sequência de tratamentos abaixo discriminada:

QUADRO 1 - Sequências de tratamentos atribuídos aos animais.

Períodos Experimentais	Coletas	Animais			
		1	2	3	4
I	1	$\begin{matrix} S \\ D_1^* F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$
	2	$\begin{matrix} S^{***} \\ D_1^{****} F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$
II	1	$\begin{matrix} S^{**} \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$
	2	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_2 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$	$\begin{matrix} S \\ D_1 F \end{matrix}$

* D_1 = dieta experimental com levedura de fermentação alcoólica

** D_2 = dieta experimental com farelo de algodão

*** S = método de coleta de fluido ruminal via sonda esofagiana

**** F = método de coleta de fluido ruminal via fístula ruminal

As dietas experimentais foram administradas uma vez por dia, pela manhã, sempre às 8 horas, na forma de ração completa, contendo 20 kg de silagem de sorgo e 2 kg de levedura de fermentação alcoólica ou farelo de algodão (Quadro 2). Elas eram preparadas para cada animal, diariamente e recebiam a adição de 30 g de mistura mineral e 60 g de sal iodado. O consumo de matéria seca (MS) foi restrito e, em média, de 1,41 kg MS/100 kg PV/dia. Pro

cedia-se a homogeneização das mesmas o melhor possível com auxílio de enxada, antes da distribuição aos animais.

QUADRO 2 - Composição das dietas experimentais fornecidas a cada animal por dia.

Dietas experimentais	Composição				
	Silagem de sorgo (kg)	Levedura de fermentação alcoólica (kg)	Farelo de algodão (kg)	Mistura mineral (g)	Sal iodo-do (g)
D ₁ [*]	20	2	-	30	60
D ₂ ^{**}	20	-	2	30	60

* D₁ = dieta experimental com levedura de fermentação alcoólica

** D₂ = dieta experimental com farelo de algodão

Para o controle da composição nutritiva dos ingredientes utilizados nas dietas, diariamente, foram coletadas amostras de silagem de sorgo, de levedura e de farelo de algodão e foram feitas amostras compostas: uma para cada período de adaptação e uma para cada uma das duas semanas integrantes de cada período experimental. As amostras de silagem de sorgo foram armazenadas em "freezer" e as de levedura de fermentação alcoólica e farelo de algodão, em geladeira, até as determinações analíticas. Desta forma, teve-se, no final, a possibilidade de se estabelecer, para cada ingrediente, uma amostra composta global bem representativa do todo (Quadro 3).

QUADRO 3 - Composição nutritiva dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais.

Ingredientes	MS %	% na Matéria Seca						
		PB	EE	MM	FB	NNP	FDN	FDA
Silagem de sorgo	22,52	5,97	2,15	7,09	32,38	-	61,92	46,87
Levedura de fermentação alcoólica	92,75	31,52	0,45	5,93	0,97	9,87	0,42	3,42
Farelo de algodão	90,44	30,31	0,96	5,80	22,74	8,73	49,01	44,70

MS = Matéria Seca; PB=Proteína Bruta; EE= Extrato Etéreo; MM= Matéria Mineral; FB= Fibra Bruta; NNP= Nitrogênio Não Proteico em Relação ao N Total; FDN= Fibra em Detergente Neutro; FDA= Fibra em Detergente Ácido.

Formularam-se duas dietas, aproximadamente, isoproteicas com a seguinte composição bromatológica:

QUADRO 4 - Composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas.

Dietas experimentais	MS %	% na Matéria Seca	
		PB	FDA
D ₁	28,79	13,52	34,12
D ₂	28,56	13,00	46,28

D₁ = dieta experimental com levedura de fermentação alcoólica

D₂ = dieta experimental com farelo de algodão

MS= Matéria Seca

PB= Proteína Bruta

FDA= Fibra em Detergente Ácido

O consumo de água foi sempre "ad libitum".

Nos dias de coleta de fluido ruminal, as sobras de ração foram pesadas a cada horário de amostragem, para cada animal, a fim de se registrar o ritmo de inges-

Exceção feita aos dias de coleta, os animais foram soltos, de manhã, das 6:30 às 7:45 horas, para exercício, em piquete livre de qualquer massa forrageira. No restante do tempo, eles permaneceram em baias individuais, presos por canzís móveis que só permitiam os movimentos de deitar e levantar.

As coletas de fluido ruminal foram feitas no quinto e décimo segundo dias de cada um dos dois períodos experimentais. Foram colhidas amostras de fluido ruminal, de cada animal, primeiro via sonda esofagiana e, em seguida, via cânula acoplada à fístula ruminal, nos tempos: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação. Teve-se por objetivo a obtenção de informações sobre o funcionamento do rúmen, através de determinações das concentrações dos ácidos graxos voláteis e de amônia, bem como através da mensuração do pH.

3.2. Amostragem do conteúdo ruminal via sonda esofagiana

A amostragem do fluido ruminal via sonda esofagiana foi feita de acordo com a técnica descrita por HOFIREK (1970). A sonda constava de um tubo de borracha macia com diâmetro interno aproximado de 1 cm, correndo no lúmen de um tubo de 170 cm, aproximadamente, formado por espirais de aço inoxidável, bem próximas, o qual serviu de guia para a introdução da borracha no rúmen, através do esôfago. Um vácuo de cerca de $1,05 \text{ kg f/cm}^2$ era aplicado para a extração do fluido.

A primeira porção do líquido de rúmen coletado foi sempre descartada, tendo sido o restante colocado em botijão plástico, anteriormente lavado e, em seguida, encaminhado para as determinações de pH, ácidos graxos voláteis (AGV) e nitrogênio amoniacal (N-NH_3).

3.3. Amostragem do fluido ruminal via fístula ruminal

A retirada da amostra do conteúdo ruminal vis cânula acoplada à fístula ruminal foi sempre manual, tomando-se o cuidado de amostrar as porções anterior, mediana e posterior do órgão, mediante a introdução do braço até mais ou menos o meio da massa existente no rúmen (de FARIA, 1982). Assim, sub-amostras de fluido ruminal proveniente das três regiões eram tomadas com a mão e, após homogeneização em Becker de aço inoxidável, obtinha-se uma amostra composta destinada às mensurações de pH, ácidos graxos voláteis (AGV) e nitrogênio amoniacal (N-NH_3).

3.4. Mensurações do pH do fluido ruminal

Independentemente do método de coleta empregado, as mensurações do pH do fluido ruminal foram feitas sempre imediatamente após a amostragem e com o líquido sem sofrer processo de filtração. Era feita a leitura em potenciômetro, anteriormente, calibrado, estando o fluido em Becker de vidro.

3.5. Mensurações das concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal

As amostras de conteúdo ruminal destinadas às mensurações de concentrações de AGV sempre passaram por um processo de filtração através de quatro camadas de "pano de laboratório" ("cheese cloth") em funil de vidro, espremendo-se o material amostrado para se conseguir o fluido ruminal filtrado. Do filtrado, 3 ml de líquido de rúmen eram transferidos para frasco com tampa, contendo 3 ml de ácido metafosfórico 6%. Estes recipientes eram mantidos em geladeira até a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Os

AGV foram determinados segundo a técnica descrita por ERWIN *et alii* (1961). Do sobrenadante, injetou-se 1,5 μ l em aparelho de cromatografia gasosa da marca CG, Modelo 370, equipado com coluna chromosorb-101, com 15% de Tween 80 e 1,5 g de ácido fosfórico. As condições do aparelho de cromatografia gasosa eram:

Temperatura do detector (T_d) = 200° C

Temperatura do vaporizador (T_v) = 300° C

Temperatura da coluna (T_c) = 190° C

Vazão = 2,6 ml/min.

Velocidade do papel = 1,2 cm/min.

Preparo da solução padrão:

Foram colocados, em um balão volumétrico de 100 ml, os seguintes volumes: 15 ml de ácido acético p.a. (PM = 60,05); 10 ml de ácido propiônico p.a. (PM = 74,03); 5 ml de ácido n-butírico p.a. (PM = 88,10); 0,6 ml de ácido n-valérico p.a. (PM = 102,13) e 0,6 ml de ácido isovalérico p.a. (PM = 102,13). Completou-se o volume para 100 ml com água deionizada. Transferiu-se 1 ml desta solução padrão estoque para um balão volumétrico de 100 ml que continha 50 ml de ácido metafosfórico (HPO_3) 6% (o que corresponde a 3 g de ácido metafosfórico p.a.), completando-se o volume para 100 ml com água deionizada. Injetou-se 1,5 μ l desta solução de uso, no cromatógrafo a gás e obteve-se o cromatograma correspondente aos padrões dos ácidos graxos voláteis: acético, propiônico, n-butírico, n-valérico e isovalérico.

Cálculo da concentração dos padrões de AGV:

$$m = v \cdot d$$

$$c = \frac{m}{100} \times 10 = g/l$$

onde:

m = massa do AGV padrão (g)
 d = densidade de AGV padrão (g/ml)
 v = volume tomado do AGV padrão (ml)
 c = concentração do AGV padrão (g/l)

Identificação dos AGV do fluido ruminal:

A identificação dos AGV do fluido ruminal, no cromatograma, foi feita mediante comparação com o gráfico dos AGV padrões (Gráficos 1 e 2).

Cálculo das concentrações dos AGV contidos nas amostras de fluido ruminal em g/l, mM e porcentagem:

$$C \text{ (g/l)} = \frac{A \text{ ou } H \text{ amostra} \times 2 \times C \text{ padrão}}{A \text{ ou } H \text{ padrão}}$$

onde:

$C \text{ (g/l)}$ = concentração do AGV da amostra de fluido ruminal em gramas por litro.

$A \text{ ou } H \text{ amostra}$ = área ou altura do pico de AGV a ser mensurado no fluido ruminal (cm^2 ou cm).

C = concentração do AGV padrão correspondente ao AGV a ser medido na amostra de fluido ruminal (g/l).

$A \text{ ou } H \text{ padrão}$ = área ou altura do pico do AGV padrão correspondente ao AGV a ser medido na amostra de fluido ruminal (cm^2 ou cm).

$$mM = \frac{C \text{ g/l}}{PM} \times 1000$$

onde:

mM = concentração do AGV a ser medido na amostra de fluido ruminal expressa em mili-molar, ou seja, número de milimoles do AGV por litro de fluido.

GRÁFICO 1 - Solução padrão

GRÁFICO 2 - Amostra do fluido ruminal

$C \text{ g/l}$ = concentração do AGV a ser medido na amostra de fluido ruminal expressa em g do AGV por litro de fluido.

PM = peso molecular do AGV a ser medido na amostra de fluido ruminal.

$$\% \text{ AGV } 1 = \frac{C \text{ g/l AGV } 1}{C \text{ g/l AGV}} \times 100$$

onde:

$\% \text{ AGV } 1$ = porcentagem do AGV 1 em relação à concentração dos AGV mensurados na amostra de fluido ruminal.

$C \text{ g/l AGV } 1$ = concentração do AGV 1 medido na amostra de fluido ruminal expressa em gramas por litro.

$C \text{ g/l AGV}$ = somatória das concentrações (expressas em gramas por litro) de todos os AGV mensurados na amostra de fluido ruminal.

3.6. Mensurações das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no fluido ruminal

Analogamente aos AGV, as amostras de fluido ruminal destinadas à determinação do teor de N-NH₃ eram sempre colocadas sobre quatro camadas de "pano de laboratório" ("cheese cloth"), através das quais eram comprimidas para a coleta do líquido de rúmen. Do filtrado tomava-se uma alíquota de 6 ml que era transferida para um frasco contendo 3 ml de H₂SO₄ 1 N, hermeticamente fechado, o qual era mantido em "freezer" até a determinação analítica ser realizada. Por ocasião desta, a alíquota de fluido ruminal + H₂SO₄ 1 N era descongelada e, em seguida, após

agitação vigorosa, pipetavam-se 3 ml da mistura para um tubo de ensaio e adicionava-se 1 ml de tungstato de sódio 10%, seguindo a marcha analítica proposta por KULASEK (1972) e adaptada por FOLDAGER (1977). As determinações eram feitas sempre em triplicata, acompanhadas por "blanks" e comparadas com uma curva padrão feita com vários volumes de uma solução de sulfato de amônio preparada para conter 1 mg N/ml. As concentrações de N-NH₃ das amostras de fluido ruminal eram expressas em mg de N-NH₃ por 100 ml de fluido. As leituras de absorbância das várias amostras de fluido ruminal eram feitas a 640 nm, em espectrocolorímetro Coleman Junior III, modelo 6/35.

3.7. Análises de laboratório

A amostra composta do ingrediente silagem de sorgo utilizado na confecção das rações era secada em estufa com circulação forçada de ar (65° C) até peso constante. Depois de pré-seca, era moída em moinho tipo faca. Esta amostra e também aquelas dos ingredientes levedura de fermentação alcoólica e farelo de algodão, igualmente empregados na composição das dietas experimentais, eram reduzidas em seu volume, através do Redutor de Jones e, depois, moídas em moinho tipo martelo. Assim preparadas, as amostras eram acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e eram devidamente identificadas.

A segunda matéria seca foi determinada a partir de uma alíquota de amostra moída, mediante a secagem da mesma em estufa a 100-105° C, até peso constante. Para a amostra de silagem de sorgo, foi feito o cálculo da matéria seca total, levando-se em conta a primeira matéria seca (65° C) e a segunda matéria seca (100-105° C).

As determinações de proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, fibra bruta das amostras dos alimentos foram realizadas segundo os métodos descritos pela AOAC (1975).

As análises de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido das amostras dos alimentos foram feitas de acordo com o método desenvolvido por GOERING & VAN SOEST (1970).

Os teores de nitrogênio não proteico (NNP), expressos como porcentagem em relação ao nitrogênio total, foram determinados segundo o método de MUNRO (1964), nas amostras de levedura de fermentação alcoólica e farelo de algodão.

3.8. Parâmetros analisados

No presente ensaio de acompanhamento da fermentação no rúmen, foram mensurados os seguintes parâmetros do fluido ruminal:

- a) pH
- b) concentrações de N-amoniacal ($N-NH_3$), expressas em mg/100 ml de fluido ruminal
- c) concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV): totais, acético, propiônico, n-butírico, n-valérico e isovalérico, expressas em mili-molar ou mili-moles por litro de fluido ruminal.

3.9. Análise estatística

Os dados referentes à concentração de íons hidrogênio (pH), de N-amoniacal e de ácidos graxos voláteis presentes no fluido ruminal foram analisados, considerando-se um esquema fatorial $2 \times 2 \times 9 \times 4$ com duas repetições (blocos).

Os fatores foram:

a) Métodos de coleta do fluido ruminal:

- Sonda esofagiana
- Fístula ruminal

b) Dietas experimentais isoproteicas:

- Silagem de sorgo + levedura de fermentação alcoólica + mistura mineral + sal
- Silagem de sorgo + farelo de algodão + mistura mineral + sal

c) Tempos de amostragem do fluido ruminal:

- 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação

d) Animais utilizados:

- Vaca 1 (flamenga)
- Vaca 2 (flamenga)
- Vaca 3 (mestiça holandesa)
- Vaca 4 (mestiça holandesa)

As unidades experimentais não forneceram, em tese, dados totalmente independentes, como consequência do modelo experimental utilizado, onde um número pequeno de bovinos fistulados participou do trabalho. Levando em conta esse aspecto, somente as diferenças altamente significativas ($P \leq 0,01$) foram consideradas na avaliação dos resultados experimentais.

Foi seguido o seguinte esquema de análise de variância (STEEL & TORRIE, 1965):

Esquema da análise de variância do presente experimento:

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Métodos de coleta (M)	1
Dietas experimentais (D)	1
Blocos (B)	1
Tempos de amostragem (T)	8
Animais (A)	3
M x D	1
M x T	8
M x A	3
D x T	8
D x A	3
T x A	24
M x D x T	8
M x D x A	3
M x T x A	24
D x T x A	24
Resíduo	167
Total	287

As diferenças entre as médias, nesse ensaio, foram avaliadas através do teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade (STEEL & TORRIE, 1965).

4. RESULTADOS

Devido ao número grande de informações coletadas no experimento conduzido, os Quadros e Gráficos apresentados a seguir mostram apenas médias, procurando sumarizar os resultados. Trazem também informações simplificadas sobre a análise estatística, caracterizando somente os efeitos altamente significativos ($P \leq 0,01$), obtidos através da análise de variância e dos testes de comparação das médias (Tukey).

QUADRO 5 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	pH
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	7,28 ^a
Fístula ruminal	6,57 ^b
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	6,84 ^b
Farelo de algodão	7,01 ^a
Horários após a alimentação (h)	
0	7,43 ^{ab}
1	6,11 ^g
2	6,20 ^g
4	6,55 ^f
6	6,86 ^e
8	7,02 ^{de}
12	7,15 ^{cd}
16	7,35 ^{bc}
24	7,63 ^a
Bovinos	
1	7,03 ^a
2	6,91 ^{ab}
3	6,81 ^b
4	6,94 ^{ab}

a,b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$) pelo teste de Tukey.

QUADRO 6 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Sonda esofagiana	7,80 ^{aAB}	6,27 ^{aE}	6,43 ^{aE}	6,89 ^{aD}	7,28 ^{aC}	7,46 ^{aBC}	7,51 ^{aBC}	7,75 ^{aB}	8,10 ^{aA}
Fístula ruminal	7,06 ^{bAB}	5,94 ^{bF}	5,97 ^{bF}	6,21 ^{bEF}	6,44 ^{bDE}	6,58 ^{bCD}	6,80 ^{bBC}	6,95 ^{bAB}	7,17 ^{bA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 7 - Índice pH em fluido ruminal coletado sob dois métodos experimentais em quatro bovinos.

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Sonda esofagiana	7,40 ^{aA}	7,19 ^{aB}	7,12 ^{aB}	7,40 ^{aA}
Fístula ruminal	6,67 ^{bA}	6,63 ^{bA}	6,49 ^{bA}	6,49 ^{bA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 8 - Índice pH em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Levedura de fermentação alcoólica	7,41 ^{aAB}	5,91 ^{bF}	6,01 ^{bF}	6,49 ^{aE}	6,73 ^{bDE}	6,86 ^{bCD}	7,12 ^{aBC}	7,35 ^{aAB}	7,63 ^{aA}
Farelo de algodão	7,45 ^{aAB}	6,30 ^{aD}	6,39 ^{aD}	6,62 ^{aD}	6,99 ^{aC}	7,18 ^{aBC}	7,18 ^{aBC}	7,35 ^{aAB}	7,64 ^{aA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 9 - Índice pH em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	6,81 ^{bAB}	6,70 ^{bB}	6,86 ^{aAB}	6,97 ^{aA}
Farelo de algodão	7,26 ^{aA}	7,12 ^{aAB}	6,75 ^{aC}	6,92 ^{aBC}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 10 - Análise de variância referente aos Quadros 5, 6, 7, 8 e 9.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	1,2142**
Método (M)	1	36,0542**
Dieta (D)	1	2,2225**
Tempo (T)	8	9,3461**
Animal (A)	3	0,6444**
M x D	1	0,0008
M x T	8	0,3140**
M x A	3	0,4055**
D x T	8	0,2058**
D x A	3	1,5705**
T x A	24	0,0687
M x D x T	8	0,0586
M x D x A	3	0,0317
M x T x A	24	0,0587
D x T x A	24	0,2074**
Resíduo	167	0,0734
Total	287	
Média = 6,92	EPM = 0,01	CV = 3,92%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 11 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido rumi-
nal amostrado em nove horários após a alimen-
tação e coletado através de dois métodos em
quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	N-NH ₃ (mg/100 ml fluido)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	9,75 ^b
Fístula ruminal	10,77 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	10,25 NS
Farelo de algodão	10,28 NS
Horários após a alimentação (h)	
0	6,58 ^c
1	14,31 ^b
2	19,13 ^a
4	18,52 ^a
6	13,41 ^b
8	6,57 ^c
12	3,96 ^d
16	4,57 ^{cd}
24	5,30 ^{cd}
Bovinos	
1	9,34 ^b
2	10,06 ^{ab}
3	10,61 ^{ab}
4	11,03 ^a

a, b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias se-
guidas das mesmas letras não diferem entre si
($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

NS - Não significativo.

QUADRO 12 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação de bovinos sob duas dietas.

Métodos de Amostragem	N-NH ₃ (mg/100 ml fluido)								
	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Levedura de fermentação alcoólica	7,76 ^{aD}	14,75 ^{aBC}	19,32 ^{aA}	17,57 ^{aAB}	12,41 ^{aC}	5,58 ^{aDE}	3,30 ^{aE}	5,34 ^{aDE}	6,19 ^{aDE}
Farelo de algodão	5,41 ^{aCD}	13,86 ^{aB}	18,93 ^{aA}	19,46 ^{aA}	14,42 ^{aB}	7,56 ^{aC}	4,62 ^{aCD}	3,80 ^{aD}	4,42 ^{aCD}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 13 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

Métodos de Amostragem	N-NH ₃ (mg/100 ml fluido)			
	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	10,12 ^{aAB}	12,18 ^{aA}	9,34 ^{bB}	9,34 ^{bB}
Farelo de algodão	8,56 ^{aB}	7,94 ^{bB}	11,88 ^{aA}	12,72 ^{aA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 14 - Análise de variância referente aos Quadros 11, 12 e 13.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	129,3368**
Método (M)	1	73,9733**
Dieta (D)	1	0,0642
Tempo (T)	8	1.187,6458**
Animal (A)	3	38,4926**
M x D	1	17,0917
M x T	8	8,8694
M x A	3	11,8563
D x T	8	25,2552**
D x A	3	229,9758**
T x A	24	15,2711
M x D x T	8	5,6228
M x D x A	3	1,3469
M x T x A	24	2,6886
D x T x A	24	57,9144**
Resíduo	167	8,1779
Total	287	
Média = 10,26	EPM = 0,17	CV = 27,86%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 15 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	AGV Totais (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	66,59 ^b
Fístula ruminal	85,38 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	77,03 NS
Farelo de algodão	74,93 NS
Horários após a alimentação (h)	
0	60,84 ^{de}
1	91,83 ^a
2	88,11 ^{ab}
4	83,85 ^{ab}
6	79,34 ^{bc}
8	80,26 ^{abc}
12	76,25 ^{bc}
16	68,83 ^{cd}
24	54,51 ^e
Bovinos	
1	68,91 ^b
2	75,12 ^{ab}
3	77,74 ^a
4	82,17 ^a

a, b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

NS - Não significativo.

QUADRO 16 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.

Métodos de Amostragem	(mM)								
	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Sonda esofagiana	48,00 ^{bDE}	85,58 ^{ba}	76,50 ^{baB}	75,45 ^{baB}	69,32 ^{bBC}	69,85 ^{bBC}	69,16 ^{bBC}	59,85 ^{bCD}	45,47 ^{bE}
Fístula ruminal	73,68 ^{aDE}	98,08 ^{aA}	99,72 ^{aA}	92,26 ^{aAB}	89,36 ^{aABC}	90,67 ^{aAB}	83,34 ^{aBCD}	77,72 ^{aCD}	63,56 ^{aE}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 17 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

Métodos de Amostragem	(mM)			
	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	63,22 ^{bB}	80,35 ^{aA}	77,76 ^{aA}	78,41 ^{aA}
Farelo de algodão	74,59 ^{aBC}	69,88 ^{bC}	77,72 ^{aB}	85,93 ^{aA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 18 - Análise de variância referente aos Quadros 15, 16 e 17.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	1.050,0035
Método (M)	1	25.424,9370**
Dieta (D)	1	315,4862
Tempo (T)	8	4.924,1186**
Animal (A)	3	2.212,8919**
M x D	1	387,6952
M x T	8	139,0387**
M x A	3	476,3584
D x T	8	227,4361
D x A	3	1.667,6879**
T x A	24	254,5008
M x D x T	8	87,7165
M x D x A	3	336,0413
M x T x A	24	158,6845
D x T x A	24	79,7473
Resíduo	167	185,9378
Total	287	
Média = 75,99	EPM = 0,80	CV = 17,94%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 19 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	Concentração de Ácido Acético (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	41,11 ^b
Fístula ruminal	56,04 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	48,76 NS
Farelo de algodão	51,39 NS
Horários após a alimentação (h)	
0	44,26 ^{cd}
1	64,89 ^a
2	58,48 ^{ab}
4	51,28 ^{bc}
6	47,29 ^{cd}
8	48,06 ^c
12	49,48 ^c
16	47,43 ^{cd}
24	39,53 ^d
Bovinos	
1	45,42 ^b
2	49,74 ^{ab}
3	51,89 ^a
4	53,24 ^a

a, b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

NS - Não significativo.

QUADRO 20 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

(mM)

Dietas	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	46,50 ^{aBC}	43,01 ^{bc}	50,81 ^{aAB}	54,72 ^{aA}
Farelo de algodão	44,35 ^{aB}	56,47 ^{aA}	52,96 ^{aA}	51,77 ^{aA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B) não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 21 - Análise de variância referente aos Quadros 19 e 20.

Causa de Variação	GL	QM
Blocos	1	930,7814 ^{**}
Método (M)	1	10.236,7780 ^{**}
Dieta (D)	1	497,6223
Tempo (T)	8	1.822,9788 ^{**}
Animal (A)	3	842,2339 ^{**}
M x D	1	350,1760
M x T	8	97,2290
M x A	3	161,9200
D x T	8	67,4059
D x A	3	1.028,8375 ^{**}
T x A	24	90,6259
M x D x T	8	42,4656
M x D x A	3	225,2596
M x T x A	24	83,6610
D x T x A	24	61,9773
Resíduo	167	78,5936
Total	287	
Média = 50,07	EMP = 0,52	CV = 17,70%

EPM = Erro Padrão da Média

QUADRO 22 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	Concentração de Ácido Propiônico (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	12,62 ^b
Fístula ruminal	16,48 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	15,40 ^a
Farelo de algodão	13,70 ^b
Horários após a alimentação (h)	
0	10,38 ^{cd}
1	15,38 ^{ab}
2	15,96 ^a
4	17,07 ^a
6	16,82 ^a
8	17,55 ^a
12	15,59 ^{ab}
16	12,80 ^{bc}
24	9,43 ^d
Bovinos	
1	13,50 ^b
2	14,11 ^{ab}
3	15,13 ^{ab}
4	15,47 ^a

a, b, ... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 23 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostragem em nove horários após a alimentação.
(mM)

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)									
	0	1	2	4	6	8	12	16	24	
Levedura de fermentação alcoólica	10,33 ^{aC}	16,12 ^{aB}	16,82 ^{aAB}	16,68 ^{aAB}	17,60 ^{aAB}	20,19 ^{aA}	17,27 ^{aAB}	13,76 ^{aBC}	9,83 ^{aC}	
Farelo de algodão	10,42 ^{aCD}	14,65 ^{aAB}	15,10 ^{aAB}	17,45 ^{aA}	16,03 ^{aA}	14,90 ^{bAB}	13,91 ^{bABC}	11,84 ^{aBCD}	9,04 ^{aD}	

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 24 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.
(mM)

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	15,50 ^{aAB}	13,61 ^{aB}	15,88 ^{aAB}	16,61 ^{aA}
Farelo de algodão	11,49 ^{bB}	14,61 ^{aA}	14,38 ^{aA}	14,33 ^{bA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 25 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos amostrados em nove horários após a alimentação.

(mM)

Horário após Alimentação (h)	Bovinos			
	1	2	3	4
0	12,33 ^{abA}	10,54 ^{bca}	9,57 ^{ca}	9,07 ^{da}
1	14,30 ^{aA}	15,48 ^{abA}	14,77 ^{abca}	16,97 ^{abA}
2	14,14 ^{aA}	14,59 ^{abca}	16,82 ^{abA}	18,29 ^{abA}
4	13,81 ^{abC}	14,47 ^{abcBC}	19,28 ^{aAB}	20,70 ^{aA}
6	13,07 ^{abB}	16,82 ^{aAB}	18,81 ^{abA}	18,57 ^{aA}
8	16,80 ^{aA}	17,80 ^{aA}	17,76 ^{abA}	17,83 ^{abA}
12	15,82 ^{aA}	15,16 ^{abca}	16,09 ^{abA}	15,30 ^{abca}
16	12,78 ^{abA}	12,39 ^{abca}	13,37 ^{bca}	12,66 ^{bcdA}
24	8,42 ^{bA}	9,73 ^{ca}	9,73 ^{da}	9,86 ^{cdA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 26 - Análise de variância referente aos Quadros 22, 23, 24 e 25.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	0,4363
Método (M)	1	1.073,3502**
Dieta (D)	1	207,1121**
Tempo (T)	8	283,5017**
Animal (A)	3	59,7768**
M x D	1	2,4402
M x T	8	5,3710
M x A	3	25,9210
D x T	8	25,8887**
D x A	3	78,1416**
T x A	24	19,6512**
M x D x T	8	3,8674
M x D x A	3	10,3438
M x T x A	24	5,4850
D x T x A	24	14,0211
Resíduo	167	9,7678
Total	287	
Média = 14,55	EPM = 0,18	CV = 21,47%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 27 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	Concentração de Ácido n-butírico (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	8,08 ^b
Fístula ruminal	10,65 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	10,79 ^a
Farelo de algodão	7,93 ^b
Horários após a alimentação (h)	
0	4,65 ^{de}
1	9,30 ^{bc}
2	11,34 ^{ab}
4	13,10 ^a
6	12,92 ^a
8	12,53 ^a
12	9,37 ^{bc}
16	6,96 ^{cd}
24	4,08 ^e
Bovinos	
1	8,25 ^b
2	9,22 ^b
3	8,69 ^b
4	11,27 ^a

a, b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 28 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.
(mM)

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Levedura de fermentação alcoólica	4,82 ^{aD}	10,73 ^{aBC}	13,38 ^{aAB}	14,22 ^{aAB}	15,21 ^{aA}	15,59 ^{aA}	10,87 ^{aBC}	7,86 ^{aCD}	4,43 ^{aD}
Farelo de algodão	4,48 ^{aDE}	7,87 ^{bBCD}	9,30 ^{bABC}	11,97 ^{aA}	10,63 ^{bAB}	9,48 ^{bABC}	7,88 ^{bBCD}	6,03 ^{aCDE}	3,74 ^{aE}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 29 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.
(mM)

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	10,68 ^{aAB}	11,40 ^{aA}	8,99 ^{aB}	12,09 ^{aA}
Farelo de algodão	5,82 ^{bC}	7,05 ^{bBC}	8,40 ^{aAB}	10,45 ^{aA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 30 - Análise de variância referente aos Quadros 27, 28 e 29.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	0,1922
Método (M)	1	475,7584**
Dieta (D)	1	589,2172**
Tempo (T)	8	385,9556**
Animal (A)	3	128,2267**
M x D	1	0,2676
M x T	8	8,3778
M x A	3	12,9640
D x T	8	27,4820**
D x A	3	76,8501**
T x A	24	15,3075
M x D x T	8	1,8459
M x D x A	3	11,1613
M x T x A	24	2,0453
D x T x A	24	10,3770
Resíduo	167	8,4125
Total	287	
Média = 9,36	EPM = 0,17	CV = 30,98%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 31 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	Concentração de Ácido Isovalérico (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	0,93 ^b
Fístula ruminal	1,14 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	0,98 NS
Farelo de algodão	1,08 NS
Horários após a alimentação (h)	
0	1,01 ^{abc}
1	1,18 ^{ab}
2	1,26 ^a
4	1,23 ^a
6	1,08 ^{abc}
8	0,90 ^{bc}
12	0,82 ^c
16	0,86 ^{bc}
24	0,97 ^{abc}
Bovinos	
1	0,84 ^b
2	1,12 ^a
3	1,00 ^{ab}
4	1,17 ^a

a, b, ... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

NS - Não significativo.

QUADRO 32 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação. (mM)

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Levedura de fermentação alcoólica	1,17 ^{aA}	1,17 ^{aA}	1,14 ^{aA}	0,99 ^{bA}	0,83 ^{bA}	0,74 ^{aA}	0,75 ^{aA}	0,93 ^{aA}	1,11 ^{aA}
Farelo de algodão	0,84 ^{aC}	1,19 ^{aABC}	1,38 ^{aA}	1,46 ^{aA}	1,33 ^{aAB}	1,05 ^{aABC}	0,89 ^{aBC}	0,78 ^{aC}	0,82 ^{aC}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 33 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais. (mM)

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	0,81 ^{aB}	0,79 ^{bB}	0,94 ^{aB}	1,39 ^{aA}
Farelo de algodão	0,87 ^{aB}	1,44 ^{aA}	1,07 ^{aB}	0,94 ^{bB}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si (P > 0,01), pelo teste de Tukey.

QUADRO 34 - Análise de variância referente aos Quadros 31, 32 e 33.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	3,0176**
Método (M)	1	3,0793**
Dieta (D)	1	0,7340
Tempo (T)	8	0,8626**
Animal (A)	3	1,4986
M x D	1	0,0001
M x T	8	0,0685
M x A	3	0,3671
D x T	8	0,7722**
D x A	3	3,6615**
T x A	24	0,1522
M x D x T	8	0,0161
M x D x A	3	0,2487
M x T x A	24	0,0398
D x T x A	24	0,2209
Resíduo	167	0,1285
Total	287	
Média = 1,03	EPM = 0,02	CV = 34,73%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 35 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

Fatores	Concentração de Ácido n-valérico (mM)
Métodos de coleta	
Sonda esofagiana	0,85 ^b
Fístula ruminal	1,08 ^a
Dietas	
Levedura de fermentação alcoólica	1,10 ^a
Farelo de algodão	0,83 ^b
Horários após a alimentação (h)	
0	0,55 ^e
1	1,08 ^{abc}
2	1,07 ^{bc}
4	1,18 ^{abc}
6	1,23 ^a
8	1,22 ^{ab}
12	1,04 ^c
16	0,79 ^d
24	0,50 ^e
Bovinos	
1	0,89 ^b
2	0,92 ^{ab}
3	1,02 ^a
4	1,02 ^a

a, b,... Para cada fator e respectiva coluna, médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 36 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.
(mM)

Métodos de Amostragem	Horários após a alimentação (h)								
	0	1	2	4	6	8	12	16	24
Levedura de fermentação alcoólica	0,56 ^{aE}	1,19 ^{aC}	1,17 ^{aC}	1,24 ^{aBC}	1,43 ^{aAB}	1,53 ^{aA}	1,31 ^{aABC}	0,92 ^{aD}	0,53 ^{aE}
Farelo de algodão	0,54 ^{aCD}	0,98 ^{bAB}	0,97 ^{bAB}	1,12 ^{aA}	1,04 ^{bA}	0,91 ^{bAB}	0,78 ^{bBC}	0,65 ^{bCD}	0,48 ^{aD}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 37 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.
(mM)

Métodos de Amostragem	Bovinos			
	1	2	3	4
Levedura de fermentação alcoólica	1,10 ^{aA}	1,08 ^{aA}	1,09 ^{aA}	1,11 ^{aA}
Farelo de algodão	0,68 ^{bB}	0,77 ^{bB}	0,94 ^{bA}	0,92 ^{bA}

Médias seguidas das mesmas letras, nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B), não diferem entre si ($P > 0,01$), pelo teste de Tukey.

QUADRO 38 - Análise de variância referente aos Quadros 35, 36 e 37.

Causas de Variação	GL	QM
Blocos	1	0,0041
Método (M)	1	3,7881**
Dieta (D)	1	5,1120**
Tempo (T)	8	2,5171**
Animal (A)	3	0,2952**
M x D	1	0,0061
M x T	8	0,0866
M x A	3	0,0164
D x T	8	0,3578**
D x A	3	0,2496**
T x A	24	0,0397
M x D x T	8	0,0107
M x D x A	3	0,0151
M x T x A	24	0,0210
D x T x A	24	0,0531
Resíduo	167	0,0330
Total	287	
Média = 0,96	EPM = 0,01	CV = 18,85%

EPM = Erro Padrão da Média

CV = Coeficiente de Variação

QUADRO 39 - Correlação entre os parâmetros referentes à fermentação ruminal.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação
<u>Ácido Acético</u>	
Ácido propiônico	0,68**
Ácido n-butírico	0,38**
Ácido isovalérico	0,52**
Ácido n-valérico	0,47**
N-NH ₃	0,32**
pH	- 0,64**
AGV totais	0,92
<u>Ácido Propiônico</u>	
Ácido n-butírico	0,82**
Ácido isovalérico	0,34**
Ácido n-valérico	0,82**
N-NH ₃	0,31**
pH	- 0,54**
AGV totais	0,89
<u>Ácido n-butírico</u>	
Ácido isovalérico	0,20**
Ácido n-valérico	0,84**
N-NH ₃	0,50**
pH	- 0,55**
AGV totais	0,70
<u>Ácido Isovalérico</u>	
Ácido n-valérico	0,16**
N-NH ₃	0,27**
pH	- 0,20**
AGV totais	0,49
<u>Ácido n-valérico</u>	
N-NH ₃	0,36**
pH	- 0,63**
AGV totais	0,72
<u>N-NH₃</u>	
pH	- 0,60**
AGV totais	0,41
<u>pH</u>	
AGV totais	- 0,69**

GRÁFICO 3 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 4 - Índice pH em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.

GRÁFICO 5 - Índice pH em fluido ruminal coletado sob dois métodos experimentais em quatro bovinos.

GRÁFICO 6 - Índice pH em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 7 - Índice pH em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 8 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 9 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação de bovinos sob duas dietas.

GRÁFICO 10 - Valores de nitrogênio amoniacal em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 11 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 12 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado sob dois métodos experimentais.

GRÁFICO 13 - Níveis de ácidos graxos voláteis totais em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 14 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 15 - Níveis de ácido acético em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 16 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 17 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 18 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 19 - Níveis de ácido propiônico em fluido ruminal de quatro bovinos amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 20 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 21 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 22 - Níveis de ácido n-butírico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 23 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coleta do através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 24- Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 25 - Níveis de ácido isovalérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

GRÁFICO 26 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal amostrado em nove horários após a alimentação e coletado através de dois métodos em quatro bovinos sob duas dietas experimentais.

GRÁFICO 27 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de bovinos sob duas dietas e amostrado em nove horários após a alimentação.

GRÁFICO 28 - Níveis de ácido n-valérico em fluido ruminal de quatro bovinos alimentados com duas dietas experimentais.

5. DISCUSSÃO

5.1. Métodos de coleta

A observação dos Quadros 10, 14, 18, 21, 26, 30, 34 e 38 indica que fatores como método de coleta do fluido ruminal, composição da dieta utilizada, horário de coleta do líquido de rúmen em relação ao fornecimento de alimento e características individuais dos animais têm interferência sobre os parâmetros analisados no presente trabalho. A estes fatores, acrescentem-se, ainda, variáveis como contaminação da amostra de fluido ruminal por saliva, influência da mesma sobre o ambiente do rúmen e localização do conteúdo amostrado, no rúmen. Todos os itens enumerados são igualmente importantes e precisam ser levados em conta, pois, influenciam o fator método de coleta de fluido ruminal, no tocante à fidedignidade dos resultados obtidos a partir das mensurações do pH e das concentrações de N-NH₃ e AGV, tendo-se em vista a representatividade das amostras de líquido de rúmen colhidas por um ou outro método.

Com relação à composição da dieta utilizada no arração animal, merece atenção especial a proporção volumoso/concentrado. Verificou-se, nessa pesquisa, por ocasião da tomada de amostra de fluido ruminal via sonda esofagiana que, dependendo do momento de coleta após a ingestão de alimento e do teor de fibra da dieta, havia dificuldade em se fazer a penetração da sonda no conteúdo ruminal, permanecendo a mesma quase tangente a este. Este

fato foi notado nos primeiros horários de coleta após a administração de alimento (1.^a, 2.^a e 4.^a horas), pois, devido à alta proporção de silagem de sorgo (respectivamente, 70,83% e 71,35%, na base de matéria seca, para D₁ e D₂), nas dietas experimentais, o material ruminal estava bem compacto, fibroso. Observou-se ser isto mais pronunciado para o caso da dieta D₂, com maior teor de fibra (com farelo de algodão em sua composição), em relação à dieta D₁ (com levedura de fermentação alcoólica). A dieta D₂ apresentava 46,28% de FDA, em contraposição à dieta D₁, com 34,12% de FDA, na matéria seca (Quadro 4). O maior teor de fibra bruta se, de um lado, promove uma produção de AGV mais lenta e regular, de outro lado, determina a duração maior e número mais elevado de períodos de ruminação por parte dos animais submetidos a alimentos mais grosseiros. Por sua vez, o ato de ruminar estimula a secreção de saliva que pode ser duplicada ou triplicada em função do tempo gasto na ruminação e do momento da coleta em relação à alimentação (TELLER *et alii*, 1977). A par disso, nesses horários (1.^a, 2.^a e 4.^a horas) próximos à administração de alimento, o fato da dieta estar nos processos iniciais de digestão levou a uma menor razão líquido/sólido no interior do rúmen. Isto causou uma aderência de materiais sólidos na extremidade coletora da sonda, determinando o seu entupimento parcial ou total e, conseqüentemente, promovendo a colheita de menor quantidade de fluido ruminal, o que ORTOLANI (1981) demonstrou ser um fator de influência nos resultados de pH por ele mensurados.

Segundo este mesmo autor, volumes ruminais colhidos inferiores a 300 ml exibem acentuada alcalinização por menor diluição da saliva que exercerá maior efeito de tamponamento sobre o fluido ruminal. Destemodo, conforme esta citação, os resultados por ele mensurados (pH = 7,3, para amostras de fluido ruminal de volume menor que 300 ml) não se apresentavam dentro dos padrões normais obtidos com amostras de volume entre 300 e 500 ml (pH = 6,7)

ou maior que 500 ml ($\text{pH} = 6,75$). Além disso, há possibilidade de contaminação da amostra de fluido ruminal por saliva no momento da colheita por sonda esofagiana, pois, mesmo que se empregue técnica adequada de sondagem e se considere o menor "stress" possível exercido sobre o animal nesta operação, sempre uma pequena quantidade de saliva se encontra no segmento digestivo anterior até o cárdia, uma vez que mesmo com o animal em descanso ocorre sempre uma pequena e contínua secreção de saliva (BAYLEY & BALCH, 1961).

Os animais ruminantes secretam grandes quantidades de saliva (150 litros ou mais, em vacas leiteiras adultas, conforme CHURCH, 1979) que é rica em bicarbonato e outros íons. A saliva é o fator mais importante para a manutenção do volume líquido do rúmen, além de fixar o estado do pH e a composição iônica do mesmo (ANNISON & LEWIS, 1966). A circulação constante de saliva, em quantidades normais, devido sua natureza alcalina, neutraliza parte dos ácidos graxos livres produzidos e contribui, assim, para a manutenção do nível ótimo de pH no conteúdo do rúmen (pH de 5,4 a 7,4, em condições normais de alimentação).

Verificou-se na presente pesquisa, que os valores de pH registrados para as amostras de menor volume obtidas via sonda esofagiana foram, significativamente, superiores ($P < 0,01$), ou seja, $\text{pH} = 7,28$, do que os observados para as amostras tomadas via fístula ruminal ($\text{pH} = 6,57$), segundo consta no Quadro 5 e Gráfico 3. Isto concorda com os resultados de ORTOLANI (1981).

Igualmente, RAUN & BURROUGHS (1962) encontraram também valores significativamente mais altos de pH ($P < 0,05$), em amostras tomadas via sonda esofagiana (pH médio = 6,4), do que naquelas obtidas através de fístula ruminal (pH médio = 6,2). Os mesmos autores atribuíram à diluição salivar na área anterior do retículo-rúmen a explicação para as diferenças nos valores médios de pH por

eles observados. No entanto, assumiram, para o pH, que as diferenças foram pequenas e que parecia não levarem a qualquer erro nas mensurações comparativas entre os dois métodos de coleta de fluido ruminal, considerando as razões utilizadas. O mesmo não pode ser concluído para os resultados do trabalho em pauta, onde os valores de pH foram diferentes ao nível de 1% de probabilidade, quando se compararam os dois métodos de coleta de fluido ruminal.

Conforme registraram LANE *et alii* (1968), é complicada a obtenção de uma amostra representativa do conteúdo ruminal via sonda esofagiana ou via fístula ruminal, pois a distribuição do mesmo é desigual e estratificada. Tendo-se em vista a heterogeneidade do conteúdo ruminal, segundo esses autores, é de validade questionável a amostragem do líquido ruminal proveniente de um só local do rúmen, quando as concentrações de AGV (SMITH, 1941; BRYANT, 1964; DAVISON, 1965 e LANE *et alii*, 1966) e o pH (SMITH, 1941; SMITH *et alii*, 1956; BRYANT, 1964; DAVISON, 1965 e LANE *et alii*, 1966) são os parâmetros críticos, pois os valores mensurados variam com os locais de onde provêm as amostras do fluido ruminal. Para LANE *et alii* (1968), isto ocorre não só para as amostras tomadas via sonda esofagiana, como para as obtidas via fístula sem mistura do material ruminal proveniente das regiões dorsal, média e ventral do rúmen. Para eles, a análise do conteúdo ruminal, a partir de um único local, dá uma imagem irreal das condições prevalentes no rúmen. Na presente pesquisa, se, por um lado, na fístula, contornou-se com a homogeneização do conteúdo ruminal, a amostragem a partir de um único local, o mesmo não ocorreu na sonda esofagiana. Assim, pelo tamanho da sonda e dos animais utilizados, com grande probabilidade, a amostragem realizou-se num mesmo local, trazendo reflexos diretos na fidedignidade dos valores mensurados para o pH e AGV.

Segundo CHURCH (1979), o pH deve ser esperado um pouco mais elevado no retículo e regiões dorsal e

cranial do rúmen do que nas outras áreas. Com base no observado, as amostras obtidas via sonda devem ter sido provenientes de um desses locais e os valores mais altos mensurados são, provavelmente, um reflexo do maior conteúdo de matéria seca do saco dorsal do rúmen ou da saída dos AGV e entrada de saliva no retículo e região cranial do rúmen. DIRKSEN & SEIDEL (1975) afirmaram que, mesmo em condições favoráveis à aspiração do fluido ruminal (horários antes da alimentação da manhã), o pH de uma amostra obtida via sonda esofagiana foi superior de 0,3 a 0,4 unidades, em relação ao mensurado em amostras tomadas a partir do saco ventral através da fístula ruminal.

CHURCH (1979) registra também que leituras acuradas de pH requerem cuidados e/ou instrumentos especiais, uma vez que, devido a perda de CO_2 do líquido de rúmen, o pH mensurado se apresentará mais alto do que, realmente, deveria ser. Neste sentido, LANE *et alii* (1968) descreveram, então, uma técnica e um instrumento por eles desenvolvidos que permitiram a obtenção rápida e fácil de amostras de diferentes locais do retículo-rúmen, via fístula ruminal, ao mesmo tempo em que era feita a mensuração do pH sem exposição das mesmas ao ar. KOLB (1984) relatou a comparação entre as medidas dos valores do pH no conteúdo ruminal feitas através da introdução direta de eletrodos no rúmen ou após a retirada de amostras, quer via sonda esofagiana, quer via fístula ruminal. Como resultado, constatou-se que, durante a extração e conservação do conteúdo ruminal, ocorre perda de CO_2 e, conseqüentemente, o valor do pH se eleva. Assim, a exposição da mesma ao ar, independentemente do método de coleta utilizado, induz um erro na mensuração que deve ser sanado mediante a introdução de eletrodos diretamente no rúmen. No presente trabalho, o conteúdo ruminal foi exposto ao ar e, assim sendo, os valores obtidos devem ter sido superiores ao real.

Considerando a interação entre método de coleta de fluido ruminal e tempo de amostragem, verifica-se, pela observação do Quadro 6 e Gráfico 4, que as amostras

obtidas via sonda esofagiana, em todos os horários de amostragem, apresentaram valores de pH, significativamente ($P < 0,01$), mais elevados (7,80; 6,27; 6,43; 6,89; 7,28; 7,46; 7,51; 7,75 e 8,10, respectivamente, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação) aos registrados pelas amostras colhidas via fístula ruminal (7,06; 5,94; 5,97; 6,21; 6,44; 6,58; 6,80; 6,95 e 7,17, respectivamente, nos mesmos horários). Isto, mais uma vez, reforça a evidência de que o parâmetro pH é influenciado diretamente pelo fator método de coleta, tendo-se em vista o efeito da saliva, alterando o tamponamento do ambiente do rúmen, no momento da coleta processada via sonda esofagiana, bem como pelo local de coleta da amostra, nas camadas superficiais da massa ruminal.

Sob outro prisma, verifica-se, no líquido de rúmen coletado pela sonda esofagiana, que os valores de pH abaixo de 7 e que diferiram, estatisticamente ($P < 0,01$) dos demais (acima de 7) ocorreram nos horários de 1, 2 e 4 horas após a alimentação. Da mesma forma, para a amostragem ruminal via fístula, os índices pH tenderam a ser mais baixos nos mesmos horários, anteriormente especificados. Assim sendo, se, por um lado, pelas razões já mencionadas, quantitativamente, os valores do pH em amostras coletadas pelos dois métodos, num mesmo horário pós-alimentação, diferem entre si, por outro, qualitativamente, eles não se excluem, pois ambos revelam comportamentos idênticos, a saber, queda do valor do pH 1 hora após a alimentação e aumentos progressivos até 24 horas após o fornecimento das rações. Observa-se, no Gráfico 4 que as curvas de pH obtidas pelos dois métodos são, praticamente, paralelas. Ao se fazer a análise de correlação, o coeficiente "r" se revelou significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,86$), como era esperado.

Pelo exame do Quadro 7 e Gráfico 5, registra-se a interação significativa ($P < 0,01$) entre os fatores método de coleta de fluido ruminal e animal, para o

parâmetro pH, revelando que todos os bovinos empregados apresentaram sempre valores médios de pH mais altos, quando as amostras de fluido ruminal foram obtidas via sonda esofagiana, em relação às coletadas via fístula ruminal, ou seja, respectivamente, para os bovinos 1: 7,40 e 6,67; 2: 7,19 e 6,63; 3: 7,12 e 6,49 e 4: 7,40 e 6,49. Isto se deve a uma maior salivação provocada pelo "stress", no momento da coleta do fluido ruminal através de sonda esofagiana (KAY, 1954, 1955) e/ou tem a ver com o fato de que, com o uso da sonda, se obtém maior volume de saliva, na amostra (BAYLEY & BALCH, 1961). Cabe registrar que as maiores diferenças de pH entre os métodos adotados ocorreram com as vacas de número 1 e 4 (respectivamente 0,73 e 0,91), coincidentemente, as mais irritadiças e/ou com maiores dificuldades de passagem da sonda. Afinal, como média geral entre os animais, verificou-se uma diferença consistente de 0,71 quanto ao pH do líquido de rúmen, favorável ao método de coleta por sonda.

Ainda pelo exame do Quadro e Gráfico acima aludidos, verifica-se que os animais 1, 2, 3 e 4 utilizados, apresentaram valores médios de pH semelhantes ($P > 0,01$), quando as amostras de fluido ruminal foram tomadas via fístula, tendo registrado, respectivamente, pH de 6,67; 6,63; 6,49 e 6,49.

Com relação ao método de amostragem por sonda esofagiana, houve diferença estatística ($P < 0,01$) entre os valores médios de pH mensurados nas quatro vacas, tendo-se observado pH maior (7,40), para os animais 1 e 4 e pH menores (7,19 e 7,12), respectivamente, para as vacas 2 e 3. O pH 7,40 foi diferente, estatisticamente ($P < 0,01$), dos pH 7,19 e 7,12 que foram iguais entre si.

Segundo ORTOLANI (1981), na colheita de fluido ruminal para mensuração de pH, as diferenças entre animais são devidas à intensidade maior de produção de saliva, no caso de se utilizar o método de sonda esofagiana pa

ra retirada de fluido ruminal. Animais mais bravios estão sujeitos a estímulos adrenérgicos exteriores, o que lhes causa maior salivação, mesmo que temporária (KAY, 1954 e 1955). ORTOLANI (1981) cita, ainda, em seu trabalho, determinadas ocorrências que inviabilizam certos animais para a sondagem, relatando, entre outras, a presença de divertículos, diminuição da luz do órgão por papilomas ou outros tumores, ou, então, granulomas micóticos e estenoses do esôfago ou do cárdia. Registra também que, devido características individuais, em certos animais, a penetração da sonda é mais difícil, sendo conveniente, neste caso, a lubrificação da mesma com óleo mineral, para favorecer a sua passagem rápida pelo esôfago, atingindo o rúmen em menor tempo.

Conforme CLARK & WEISS (1952), o excitamento táctil ou a irritação mecânica do esôfago torácico são potentes estímulos à secreção salivar. Assim, a demora ou parada da sonda no esôfago, observada com freqüência, como resultante da falta (no presente trabalho) ou deficiência (na pesquisa de ORTOLANI, 1981) de lubrificação da sonda, produziu maior salivação, com conseqüente aumento nos valores de pH mensurados nas amostras de fluido ruminal colhidas por este método, nos quatro animais utilizados. Além disso, ORTOLANI (1981) aconselha a adoção do método de preensão da língua sem retirá-la da cavidade bucal, mas apenas fixando-a na sua porção média com o polegar, para mantê-la presa e estendida. Este procedimento também foi empregado na presente pesquisa e se revelou ser de fácil execução, seguro e rápido, pois evita a retração da língua, diminuindo o tempo de estímulo mecânico na região oral, o que, segundo COMLINE & KAY (1955), provoca intensa salivação reflexa. Notou-se que certos animais, por serem mais bravios, de início, apresentaram uma certa resistência à manobra necessária para a preensão da língua, na amostragem por sonda esofagiana e, por isso, tiveram uma salivação mais abundante com correspondente pH mais elevado.

Observando-se o Quadro 11 e Gráfico 8, nota

se que a concentração média de N-amoniaco (N-NH_3) de amostras colhidas via sonda esofagiana foi, significativamente ($P < 0,01$), inferior (9,75 mg/100 ml fluido), quando comparada à (10,77 mg/100 ml fluido) mensurada em amostras obtidas através de fístula ruminal. Isto concorda com os estudos de WOHLT *et alii* (1976) que, utilizando uma dieta constituída por 1,8 kg de concentrado e 4,1 kg de feno de alfafa fornecida a três vacas não lactantes, amostraram o conteúdo ruminal via sonda esofagiana e via fístula ruminal. As amostras obtidas através de fístula ruminal foram retiradas das regiões dorsal, média e ventral do rúmen. Também tomaram uma amostra do conteúdo total do rúmen, via fístula, após homogeneização do mesmo, procedimento este semelhante ao adotado na presente pesquisa para a colheita de todas as amostras via fístula ruminal. Estes autores registraram que as amostras tomadas via sonda esofagiana apresentaram uma concentração média de N-amoniaco (N-NH_3) de 14,3 mg/100 ml de fluido, significativamente ($P < 0,01$), inferior à mensurada nas amostras colhidas através de fístula ruminal, mediante homogeneização (19,7 mg/100 ml fluido). Isto ratifica o verificado no trabalho em pauta.

Segundo WOHLT *et alii* (1976), as amostras tomadas nas regiões ventral, média e dorsal do rúmen, via fístula, registraram as seguintes concentrações médias de N-NH_3 (mg / 100 ml fluido): 17,2; 18,3 e 23,0, sendo esta última superior ($P < 0,01$) a todas as outras concentrações mensuradas, quer através de fístula ruminal, quer através de sonda esofagiana. Por outro lado, a amostra de fluido ruminal colhida por sonda esofagiana teve concentração média de N-NH_3 inferior ($P < 0,01$) a todas as demais amostras, só se igualando à obtida via fístula ruminal, a partir da região ventral do rúmen. Se a amostra obtida via fístula ruminal, após homogeneização do conteúdo do rúmen, é representativa da verdadeira concentração em N-NH_3 , então, segundo estes autores, aquelas tomadas através de sonda

esofagiana ou via fístula, a partir das regiões mediana e ventral do rúmen, subestimaram o N-NH₃ total do rúmen em 27, 10 e 13%, respectivamente. Em contraste, a amostra colhida via fístula ruminal, a partir da região dorsal do rúmen, superestimou o N-NH₃ em 17%. No presente trabalho, a concentração média de N-NH₃ (mg/100 ml fluido) das amostras obtidas via sonda esofagiana foi menor que a mensurada nas amostras colhidas via fístula ruminal em 9,47%.

A constatação de uma concentração de N-NH₃ menor (9,75 mg/100 ml fluido), registrada nesta pesquisa (Quadro 11 e Gráfico 8), nas amostras coletadas via sonda esofagiana, talvez, pudesse ser explicada pela maior absorção de N-NH₃ através do epitélio ruminal, na região de coleta da amostra. Este raciocínio parece válido, uma vez que as dietas D₁ e D₂, independentemente de método, propiciaram níveis, estatisticamente, iguais (respectivamente, 10,25 e 10,28 mg N-NH₃/100 ml fluido), como consta no Quadro e Gráfico aludidos. Sendo iguais os níveis de N-NH₃ a partir das dietas utilizadas, poder-se-ia pensar na ocorrência de uma maior absorção de amônia, na região do rúmen de onde foi coletada a amostra através da sonda esofagiana, justificando, assim, o menor nível de N-NH₃ aí observado. Como foi comentado anteriormente, as amostras colhidas por sonda apresentaram valores médios de pH mais elevados (7,28), conforme o Quadro 5 e Gráfico 3. Segundo KOLB (1984), o N-NH₃ do conteúdo ruminal atinge o sangue da veia porta por processo difusional e a velocidade de absorção é dependente do pH, uma vez que a amônia (NH₃) atravessa a parede ruminal mais facilmente que os íons amônio (NH₄⁺). Com valores crescentes de pH, eleva-se a proporção de moléculas não dissociadas e, com isto, a absorção de NH₃. Quando o pH ruminal é baixo (entre 5 e 6), a permeabilidade da mucosa à amônia (NH₃) é cerca de 2/3 da permeabilidade em pH alcalinos ou neutros (pH 7,8 até 6,8), de acordo com DECKER *et alii* (1961). Assim, o pH 7,28, encontrado nas amostras obtidas via sonda esofagiana, está dentro

da faixa em que a mucosa ruminal é mais permeável à amônia. Embora pertinente, parece pouco provável que a maior absorção de amônia seja a grande responsável pela menor concentração de N-NH₃ registrada no local do rúmen de onde foram colhidas as amostras via sonda esofagiana. Cabe ressaltar-se, nesta discussão, que, provavelmente, a melhor explicação para o fato provém da hipótese da diluição das amostras obtidas via sonda esofagiana com saliva, o que determina uma alteração na concentração de N-NH₃, no conteúdo ruminal. Desta forma, é esperado que o nível de N-NH₃ seja mais baixo, nestas amostras, o que, realmente, ocorreu. Portanto, a diluição salivar, verificada nas amostras colhidas por sonda, explica a concentração mais baixa de N-NH₃ nelas registradas, talvez, melhor que a hipótese de pH mais alto e absorção maior de N-NH₃.

Em contrapartida, as amostras colhidas via fístula ruminal apresentaram maior concentração de N-NH₃ (10,77 mg/100 ml fluido), de acordo com o Quadro 11 e Gráfico 8. Ao mesmo tempo, registraram menor valor médio de pH (6,57), conforme Quadro 5 e Gráfico 3. Considerando a discussão do parágrafo anterior, pode-se justificar, igualmente, o observado, pois o valor 6,57 está fora da faixa de pH em que a permeabilidade da mucosa ruminal à amônia (NH₃) é maior. Assim sendo, pode-se esperar, em decorrência disso, uma menor absorção de amônia, o que explica, a maior concentração de N-NH₃ registrada nessas amostras.

Através da observação dos resultados inseridos nos Quadros: 15, 19, 22, 27, 31 e 35 e representados nos Gráficos 11, 14, 16, 20, 23 e 26, verifica-se que as amostras de fluido ruminal colhidas via sonda esofagiana, independentemente de horário de amostragem, dieta e animal, apresentam sempre médias de concentrações de ácidos graxos voláteis - AGV (acético = 44,11; propiônico = 12,62; n-butírico = 8,08; isovalérico = 0,93; n-valérico = 0,85 e AGV totais = 66,59 mM), estatisticamente, inferiores (P < 0,01) às aquelas observadas nas amostras obtidas, simultanea

mente, via fístula ruminal (respectivamente: 56,04; 16,48; 10,65; 1,14; 1,08 e 85,39 mM). Este decréscimo nas concentrações dos AGV, em função do método de coleta de fluido ruminal escolhido, está em desacordo com os dados relacionados por RAUN & BURROUGHS (1962). Segundo estes autores, não foram notadas diferenças, estatisticamente, significativas entre as concentrações dos referidos ácidos graxos voláteis, em oito amostras de fluido ruminal, tomadas, simultaneamente, via sonda esofagiana e via fístula ruminal, ao longo de um período de seis meses, a partir de oito animais fistulados, alimentados com dietas, contendo de 50 a 80% de concentrados. Porém, registraram que as concentrações dos AGV totais e individuais tenderam a ser mais baixas nas amostras coletadas via sonda esofagiana e que as diferenças observadas eram pequenas, não parecendo induzir qualquer erro nas mensurações comparativas entre os dois métodos de coleta de fluido ruminal, levando em conta as rações utilizadas.

De acordo com CHURCH (1979), deve ser esperada uma grande variação nos valores de AGV totais mensurados em diferentes animais sob diferentes dietas, tendo-se em vista a série de fatores que influenciam a fermentação ruminal, a saber: os diferentes métodos analíticos utilizados, a variação nos métodos de amostragem do fluido ruminal e as diferenças nas dietas fornecidas. Cita como exemplo, o fato de que os níveis de AGV totais são, usualmente, inferiores, quando é empregada a sonda esofagiana para a amostragem do conteúdo ruminal, o que concorda com os resultados obtidos no presente trabalho.

Observou-se, no trabalho em pauta, que as concentrações mais baixas de AGV totais e AGV individuais ocorreram nas amostras de fluido ruminal com pH mais elevado (7,28), no caso, as obtidas via sonda esofagiana. Por outro lado, as mais elevadas concentrações de AGV totais e AGV individuais foram mensuradas nas amostras obtidas via fístula ruminal, com pH, significativamente ($P < 0,01$),

mais baixo (6,57). Estas observações foram, igualmente, feitas, por BRYANT (1964) que atribuiu à diluição do fluido ruminal com saliva a explicação para a obtenção de mais baixos níveis de AGV totais, nas amostras coletadas por sonda esofagiana.

A presente pesquisa envolveu dietas com alta proporção de volumosos (71,09%, na matéria seca, como média dos valores observados em cada dieta) e, portanto, com altos teores de fibra (34,12 e 46,28% de fibra em detergente ácido, na matéria seca, respectivamente, para D_1 e D_2). Sabe-se, segundo CHURCH (1979), que existe uma correlação negativa entre pH e concentrações de AGV totais e individuais para dietas desta natureza. Sendo, estatisticamente, diferentes os valores de pH apresentados pelas amostras colhidas via sonda esofagiana e via fístula ruminal, era de se esperar efeito, igualmente, diverso sobre as suas concentrações de AGV. Tendo-se em vista a correlação negativa já assinalada entre estes dois parâmetros, deveriam ser mensurados níveis mais baixos de AGV, nas amostras obtidas por sonda (com pH maior) e, por outro lado, concentrações mais altas de AGV, nas colhidas através de fístula ruminal (com pH menor), o que, realmente ocorreu. Isto pode ser justificado pelo fato de que o valor do pH está na dependência da quantidade de ácidos presentes e do poder tampão no rúmen. Assim sendo, os dados obtidos parecem claros e esperados.

A saliva, nas amostras de fluido ruminal colhidas via sonda esofagiana, parece explicar bem o ocorrido e o observado, pois, a par de elevar o pH devido agir, através dos seus íons bicarbonatos e fosfatos, como tampão contra os AGV produzidos, promove uma diluição do líquido de rúmen, determinando uma diminuição aparente das concentrações dos AGV totais e individuais analisados.

Para as amostras obtidas via fístula ruminal (com pH de 6,57), pode-se explicar a concentração mais

alta observada para os AGV totais e individuais, pois, não se tem com intensidade o efeito da saliva como diluente do fluido ruminal, como no caso das amostras obtidas via sonda esofagiana. Havendo maior produção de AGV e menor poder tampão, no rúmen, era de se esperar pH mais baixo, nas amostras colhidas via fístula ruminal, como foi constatado.

Considerando a interação entre método de coleta de fluido ruminal e tempo de amostragem, verifica-se, pela observação do Quadro 16 e Gráfico 12, que as amostras obtidas via sonda esofagiana, em todos os horários de amostragem, apresentaram teores de AGV totais, significativamente ($P < 0,01$), inferiores (48,00; 85,58; 76,50; 75,45; 69,32; 69,85; 69,16; 59,95 e 45,47 mM, respectivamente, nos horários: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação) aos registrados pelas amostras colhidas via fístula ruminal (73,68; 98,08; 99,72; 92,26; 89,36; 90,67; 83,34; 77,72 e 63,56 mM, respectivamente, nos mesmos horários). Tal como aconteceu com os valores de pH na interação método x tempo, já analisada, as concentrações de AGV totais também foram influenciadas pelo fator método de coleta, tendo-se em vista o efeito da saliva que, ao promover a diluição do líquido de rúmen, diminuiu o valor mensurado para os AGV totais, em cada momento de coleta processada através de sonda esofagiana. As curvas registradas no Gráfico 12 são, aproximadamente, paralelas, indicando a mesma tendência para as amostras coletadas pelos dois métodos, no tocante aos níveis de AGV totais. Fazendo-se a análise de correlação, realmente, obteve-se um coeficiente "r" significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,61$).

Sob outro aspecto, verifica-se, no líquido de rúmen obtido via sonda esofagiana, que a maior concentração de AGV totais (85,58 mM) ocorreu 1 hora após a alimentação e seu valor era diferente de todos os outros observados, com exceção dos registrados às 2 e 4 horas. Le-

vando-se em conta as amostras coletadas via fístula rumi-
nal, o maior teor de AGV totais ocorreu 2 horas após a
alimentação (99,72 mM) e era igual, apenas, aos valores re
gistrados 1, 4, 6 e 8 horas após fornecimento do alimento.
Assim, inversamente ao que ocorreu para o pH, os maiores
teores de AGV totais foram registrados entre 1 e 4 ho-
ras pós-alimentação. Desta forma, em termos de magnitude,
os teores de AGV totais, obtidos a partir dos dois mét
odos de coleta, num mesmo horário pós-alimentação, são dife-
rentes entre si. Por outro lado, eles não são conflitan-
tes, em termos relativos, pois ambos indicam aumentos do
nível de AGV totais 1 a 4 horas após alimentação e decrê
scimos progressivos até 24 horas pós-fornecimento das die
tas.

Considerando a relação acetato/propionato, o
trabalho experimental em pauta evidenciou um valor maior
(3,50), nas amostras de fluido ruminal obtidas através de
sonda esofagiana, com pH médio de 7,28. Comparativamente,
as amostras colhidas via fístula ruminal, com pH médio de
6,57, apresentaram uma relação acetato/propionato infe-
rior (3,40). Isto mostra que estes dados concordam com as
citações de SLYTER *et alii* (1966); STANLEY *et alii* (1972) e
ESDALE & SATTER (1972), no que diz respeito ao fato de que
as proporções dos AGV produzidos no rúmen, dependem, pri-
mariamente, do tipo de dieta, mas, dentro de certos limi-
tes, a diminuição do pH estreita a relação acetato/propio-
nato, o contrário ocorrendo para o aumento do pH.

Comparando as amostras obtidas via sonda eso-
fagiana com as colhidas via fístula ruminal, observaram-
se, respectivamente, os valores de 44,11 e 56,04 mM, para
o ácido acético e 12,62 e 16,48 mM, para o ácido propiôni-
co. Pelo exame destes resultados, verifica-se um aumento
maior para o ácido propiônico (30,59%), em relação ao acu-
sado para o ácido acético (27,05%), nas amostras obtidas
via fístula ruminal. Neste raciocínio, o aumento do ácido
propiônico, registrado nas amostras colhidas via fístula

ruminal, parece ter sido o responsável pelo abaixamento da relação acetato/propionato observada nestas amostras (3,40).

Expressando as concentrações dos AGV individuais, mensuradas na presente pesquisa, em porcentagem molar dos AGV totais (mM), tem-se, para as amostras colhidas via sonda esofagiana, que os ácidos acético, propiônico, n-butírico, isovalérico e n-valérico apresentaram, respectivamente, 66,24; 18,95; 12,13; 1,40 e 1,28%, enquanto que, nas amostras colhidas via fístula ruminal, os mesmos ácidos mostraram, respectivamente, os valores de: 65,63; 19,30; 12,47; 1,34 e 1,26%, correspondentes aos resultados em mM já referidos anteriormente.

Para RAUN & BURROUGHS (1962), o método de coleta de fluido ruminal com sonda esofagiana, em relação ao de fístula ruminal, tem se mostrado um tanto insatisfatório, por não refletir com absoluta precisão o que ocorre no rúmen devido às interferências (saliva, local de amostragem do rúmen, momento de amostragem em relação ao fornecimento da dieta, diferenças entre animais, tipo de dieta) e, ainda, por consumir um maior tempo do coletador para a obtenção da amostra (em média, 3 a 5 minutos por animal amostrado). No entanto, os animais com fístula permanente no rúmen não são as parcelas experimentais mais satisfatórias nos experimentos de mensuração de fermentação ruminal porque a fistulação pode ser empregada em um número restrito de animais e nunca podem ser feitas, simultaneamente, medidas de desempenho animal, tais como: crescimento, estudo de carcaça, conversão alimentar, muitas vezes também desejáveis para a avaliação de uma dieta. Todavia, pelo observado na presente pesquisa, evidencia-se que os dois métodos de coleta apresentam vantagens e desvantagens, mas permitem a escolha de um, em detrimento do outro, em função da acureza e da fidedignidade exigidas das mensurações em termos de retratar a magnitude ou de dar indicação de como se comportam os tratamentos estudados. Deve-se preferir o método de amostragem do fluido ru-

minal por fístula ruminal, pois, apesar de suas implicações, parece refletir melhor os valores reais dos parâmetros químicos e fisiológicos da fermentação ruminal. Já, quando se quer mais uma indicação de como se apresentam as curvas de AGV ou de pH ou de N-NH₃, em função da dieta testada, sem preocupação com a magnitude dos valores mensurados, o método de coleta por sonda esofagiana se presta, perfeitamente, pois, embora mais sujeito às diferenças individuais entre os animais, pode ser aplicado em um número relativamente grande deles sem maiores dificuldades. Pode-se constatar, pelo exame dos Gráficos 4, 6, 9, 12, 17, 19, 21 e 27, que as curvas obtidas para os parâmetros pH, N-NH₃ e AGV, analisados em amostras de fluido ruminal colhidas pelos dois métodos, indicam tendências semelhantes.

5.2. Dietas experimentais

Os resultados obtidos no presente trabalho registrados no Quadro 5 e Gráfico 3 mostraram que a dieta D₂ (silagem de sorgo + farelo de algodão), independente de método de coleta, tempo de amostragem e animal, apresentou valor médio de pH, significativamente ($P < 0,01$), maior (7,01) do que a dieta D₁ (silagem de sorgo + levedura), com valor médio de pH de 6,84. Tendo estas dietas alta proporção (71,09%, na matéria seca) de silagem de sorgo, de baixo teor de matéria seca (22,52%; conforme Quadro 3), estes resultados estão próximos do valor 7,0 referido para pH por CASTLE & WATSON (1969, 1970), ao fornecerem dietas à base de silagem de gramínea para vacas leiteiras. GRIFTHS & BATH (1973) relataram pH ao redor de 7 para dieta exclusiva de silagem com baixo teor de matéria seca, porém, verificaram que a adição de suplementos proteicos (farelo de amendoim ou uréia) nunca abaixou o pH para valores menores que 6. Assim, em dietas com predominância de forragens, segundo MOIR & SOMERS (1957); BATH & ROOK (1963);

TREMERE *et alii* (1968) e KAUFMAN (1976), o pH do conteúdo ruminal está próximo da neutralidade.

Analisando as características de rúmen, de FARIA (1982) encontrou, para dieta exclusiva de silagem de milho com 33,5% de matéria seca, fornecida uma vez por dia, valor médio de pH de 6,8, tendo relatado um consumo médio diário de matéria seca de 1,9 kg/100 kg PV. Apesar de, no presente trabalho experimental, ter sido fixado, para os animais, um baixo consumo diário de matéria seca (1,41 kg MS/100 kg PV, para as dietas completas ou 1 kg MS/100 kg PV relativo só ao componente silagem de sorgo), evidencia-se, pelo valor médio de pH relatado para ambas as dietas, também fornecidas uma vez por dia, que este da do indicativo da fermentação ruminal está conforme com outros trabalhos sobre dietas com silagem, não tendo, o menor consumo de matéria seca observado em relação à pesquisa de FARIA (1982), afetado, significativamente, o valor do pH registrado. Isto concorda com os dados de PUTNAM *et alii* (1966) que notaram apenas uma leve mudança no valor de pH, em animais alimentados com dieta constituída por 89% de volumosos, quando o nível de consumo passou de 2,0 e 2,6% para 0,8 e 1,4% do peso vivo.

Uma importante característica do consumo de silagem de baixo teor de matéria seca é a alta digestibilidade das frações fibra bruta (HEAD & MURDOCH, 1965; GRIFFITHS *et alii*, 1973) e celulose (BEEVER *et alii*, 1971). Uma explicação parcial para o fato, segundo GRIFFITHS & BATH (1973), pode ser a condição de pH estável no rúmen (pH próximo de 7, nas dietas só de silagem ou nunca abaixo de 6, para as que receberam a adição de suplementos, como as do presente experimento). Entretanto, o pH é um dos vários fatores que influem sobre o crescimento de bactérias celulolíticas no rúmen (KISTNER, 1965). Neste sentido, ERFLE *et alii* (1982) determinaram "in vitro" que o número de bactérias celulolíticas em pH 7 ($8,7 \times 10^7$ /ml) e pH 6 ($4,5 \times 10^7$ /ml), diminuiu, drasticamente, quando o pH caiu de

6 para 5,5 ($< 10^4$ /ml). O pH é um reflexo da dieta (CHURCH, 1979) e afeta não só os produtos finais de fermentação (N-NH_3 , AGV), mas também a taxa de crescimento das bactérias e protozoários (HOBSON, 1965). Estas afirmações mostram como os microorganismos podem predominar no rúmen e porque os microorganismos predominantes variam com o valor médio do pH (HOBSON, 1972). Assim, dietas com baixo teor de carboidratos solúveis (dietas ricas em volumosos), geralmente, resultam em aumento de organismos celulolíticos e o pH, no rúmen, é, via de regra, mais alto (CHURCH, 1979). Além disso, nível adequado de proteína na dieta, usualmente, resulta em aumento do número de bactérias em relação a dietas com baixo teor proteico. As dietas D_1 e D_2 do presente experimento não foram avaliadas quanto ao seu efeito sobre o número e tipo de microorganismos presentes no fluido ruminal. Entretanto, considerando-se as características das dietas (alta proporção de volumosos, elevados teores de FDA, razoáveis teores de PB) e as análises do pH (valores altos) e proporção molar dos AGV (alta para o ácido acético, principalmente), pode-se sugerir que tais mensurações relativas aos parâmetros de fermentação ruminal são decorrentes de uma população microbiana, predominantemente, celulolítica.

No presente estudo, a dieta D_2 (13% de PB, na MS) apresentou valor médio de pH, significativamente ($P < 0,01$), maior (7,01) do que a dieta D_1 (13,52% de PB, na MS e pH médio de 6,84). Os valores de pH observados para as dietas D_1 e D_2 (respectivamente, 6,84 e 7,01) são maiores do que o verificado (6,70) por de FARIA (1982), para uma dieta com 13,3% de PB, constituída por silagem de milho + 0,675% de uréia. A explicação para isto, talvez, reside no fato de que a dieta D_2 , devido conter farelo de algodão (44,70% de FDA, na MS, Quadro 3), apresentava um teor de FDA, na MS, de 46,28% (Quadro 4) que foi, aparentemente, suficiente para prevenir grandes diminuições no pH. Isto não se verificou para a dieta D_1 (34,12% de

FDA, na MS), contendo levedura com 3,42% de FDA, na MS, ou ainda mais, com a dieta referida por de FARIA (1982), com 29,2% de FDA, na MS. Além disso, ao se comparar a dieta D_1 com a D_2 da presente pesquisa, em termos de valores médios, pode-se raciocinar sobre o fato de que a dieta D_1 apresentava, em sua composição, 29,17%, na matéria seca, como levedura, cujas partículas eram de tamanho muito inferior ao das partículas do farelo de algodão que, em proporção semelhante (28,65%, na matéria seca), compunha a dieta D_2 . Segundo CHENG & HIRONAKA (1973), a redução no tamanho das partículas alimentares, aumentando a taxa e, provavelmente, acelerando o fim da fermentação ruminal, tende a causar decréscimo no pH ruminal. Deve-se ressaltar também que o maior teor de açúcares apresentado pela levedura (ENN = 61,13%, na MS), em relação ao farelo de algodão (ENN = 40,19%, na MS), provavelmente, veio favorecer ainda mais a ocorrência de uma fermentação rápida, o que determinou uma maior redução do pH ruminal, bem como a manutenção do mesmo em nível mais baixo, na dieta D_1 . De acordo com os raciocínios aludidos, a dieta D_1 deve ter apresentado uma maior taxa de fermentação e, em decorrência, um pH médio mais baixo (6,84), o que pode ser evidenciado pelas maiores ($P < 0,01$) concentrações dos ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico, no conteúdo ruminal.

A frequência de alimentação também tem efeito sobre o pH, tanto para dietas exclusivas de volumosos, como para dietas contendo também concentrados, mantendo-se constante o consumo diário de matéria seca. Comprovando isto, BATH & ROOK (1963) relataram que a frequência de alimentação de 1 para 4 vezes ao dia teve uma pequena influência sobre o valor médio registrado para o pH, diariamente, determinando um efeito mais leve, em dieta exclusiva de feno (pH médio = 6,42; 6,42 e 6,44, respectivamente, para as frequências 1, 2 e 4 vezes/dia) e menos suave, para a dieta composta por feno + concentrado, na proporção 1:1 (pH médio = 6,52; 6,46 e 6,38, respectivamente,

nas mesmas freqüências alimentares). No entanto, esta pequena mudança ocorrida no pH ruminal, em decorrência da freqüência alimentar adotada, pode implicar, segundo estes autores, em modificações nas taxas relativas de absorção dos AGV, no rúmen. No presente trabalho, a adoção da freqüência alimentar de 1 vez por dia permite a suposição de que os valores médios de pH registrados para as dietas D_1 (6,84) e D_2 (7,01), com consumo diário de matéria seca restrito e fixo (1,41 kg/100 kg PV), são dados diferentes e menos típicos do que os que seriam obtidos, levando-se em conta o comportamento alimentar normal de um ruminante em pastagem ou recebendo ração concentrada "ad libitum".

Os dados médios de N-NH₃, observados no Quadro 11 e Gráfico 8, mostram que as dietas D_1 e D_2 não são diferentes, estatisticamente, no nível de significância adotado ($P > 0,01$), tendo as mesmas apresentado as concentrações médias respectivas de 10,25 e 10,28 mg N-NH₃ / 100 ml de fluido ruminal. Disto, pode-se depreender que as dietas D_1 e D_2 , com teores proteicos, respectivamente, de 13,52 e 13,00%, na matéria seca, se comportaram, igualmente, em termos de fornecimento de amônia que é a principal fonte de nitrogênio usada para a síntese de proteína microbiana (BRYANT & ROBINSON, 1962). GRIFFITHS & BATH (1973) e de FARIA (1982) encontraram, respectivamente, para dieta exclusiva de silagem de gramínea (10,6% PB, na MS) e dieta exclusiva de silagem de milho (8,1% PB, na MS), valores médios respectivos de 8,4 mg e 1,5 mg de N-NH₃ / 100 ml de fluido ruminal. Já, para dieta de silagem de gramínea enriquecida com farelo de amendoim (12,00% PB, na MS), GRIFFITHS & BATH (1973) registraram uma concentração média de N-NH₃ de 17,1 mg/100 ml de fluido ruminal. Para silagem de milho com 0,335% e 0,675% de uréia (11,3% e 13,3% de PB, na MS, respectivamente), de FARIA (1982) verificou teores médios respectivos de 7,98 e 13,01 mg de N-NH₃/100 ml de fluido. Existe uma tendência de se obterem concentrações mais baixas de N-NH₃, no fluido ruminal de animais

alimentados com dietas à base de silagem, apesar do consumo de N observado ter sido alto, neste experimento e nos dos autores acima citados (137; 132; 186; 123 e 155 g de N por cabeça por dia, respectivamente, para as dietas: D_1 , D_2 , silagem de gramínea + farelo de amendoim; silagem de milho + 0,335% de uréia e silagem de milho + 0,675% de uréia). Este fato, segundo GRIFFITHS & BATH (1973), é, provavelmente, uma consequência do processo de ensilagem, isto é, uma grande porção proteica da planta verde já foi hidrolisada durante a fermentação no silo, restando pouca proteína passível de ser fermentada no rúmen. HUGHES (1970) encontrou que silagens, contendo baixa matéria seca, como é o caso da silagem de sorgo (22,52% de MS, Quadro 3), base das rações D_1 (28,79% MS) e D_2 (28,56% MS) do presente experimento, não continham proteína solúvel e que 2/3 do N original estava presente na forma de nitrogênio não proteico (NNP). Isto não ocorreu com as dietas experimentais, onde os componentes levedura de fermentação alcoólica e farelo de algodão que as diferenciavam, apresentavam, respectivamente, apenas 9,87 e 8,73% de NNP em relação ao N total (Quadro 3). Para GRIFFITHS *et alii* (1973), os níveis mais baixos de N total e N-NH₃ encontrados no fluido ruminal de animais alimentados com rações à base de silagens podem ser causados pela maior velocidade de passagem dos materiais solúveis pelo rúmen, como uma consequência do alto consumo de água por animais submetidos a estas dietas.

Nas dietas D_1 e D_2 , as curvas de N-NH₃ no tempo (Gráfico 9) mostram que as concentrações de N-NH₃ alcançaram o pico 2 horas (dieta D_1) ou 4 horas (dieta D_2), após o fornecimento das mesmas, mas a diminuição dos valores máximos observados foi gradual e demorada. Pelo exame das citadas curvas, para as dietas D_1 e D_2 , verifica-se que somente em poucos momentos de amostragem (12, 16 e 24 horas após a alimentação, para a dieta D_1 e 12 horas após o fornecimento da dieta D_2), as concentrações de N-NH₃ se

apresentaram inferiores a 5 mg/100 ml de fluido ruminal. Tomando-se este valor como referência, pode-se sugerir que, para ambas as dietas, houve sobre de N-NH₃ a maior parte do tempo. Isto está de acordo com as observações de SLYTER *et alii* (1979), os quais relataram que animais, recebendo rações com 13,3% de PB ou mais, tinham acúmulo de N-NH₃, no rúmen. Segundo estes autores, os resultados obtidos indicaram que os microorganismos ruminais foram supridos com mais N-NH₃ do que eles foram capazes de utilizar. Conforme ROFFLER & SATTER (1975) e SLYTER *et alii* (1975), dietas com teor de fibra maior do que 30% precisam conter menos de 2,24% de N dietético ou menos de 14% de PB, a fim de manterem a concentração de N-NH₃ (5 mg/100 ml de fluido) requerida para a síntese máxima de proteína microbiana no rúmen. Neste sentido, SLYTER *et alii* (1979) mostraram, "in vivo", que dietas com menos de 13% de proteína bruta apresentaram médias de N-NH₃, no rúmen, sempre menores (4,5 mg/100 ml de fluido) que 5 mg/100 ml de fluido, sendo que as com 11,1% de PB mostraram uma concentração média de 2,2 mg N-NH₃/100 ml de fluido que corresponde ao menor valor de N-NH₃, para que a concentração do N precipitável em tungstato (índice mais real da síntese líquida de proteína microbiana) atinja um patamar, indicando ter sido atingido o máximo de fermentação microbiana. As diferenças entre os valores da concentração de N-NH₃ obtidos "in vitro" (5 mg/100 ml de fluido) e "in vivo" (2,2 mg/100 ml de fluido) foram justificadas por SLYTER *et alii* (1979), desde que a absorção e reciclagem do N não ocorrem "in vitro".

No presente experimento, observa-se pelo Gráfico 9 que, para ambas as dietas, não ocorreu um desaparecimento rápido da amônia no rúmen. Devido os valores médios de pH observados serem, respectivamente, 6,84 e 7,01, para as dietas D₁ e D₂, pode-se inferir que a absorção de amônia foi muito pequena, uma vez que, segundo SMITH (1975), ela é rápida, somente quando o pH está aci-

ma de 7,5, mas é muito lenta, quando o pH está abaixo de 6,7. Valores inferiores a 6,7 de pH favorecem a ionização da amônia e sabe-se que os íons NH_4^+ penetram mais dificilmente através da camada lipídica do epitélio ruminal do que as moléculas de amônia (BLOOMFIELD *et alii*, 1963 e citação de TELLER *et alii*, 1977). Com base no valor de pH inferior a 7 observado (6,84), pode-se dizer, à semelhança de NOLAN *et alii* (1973), que, na dieta D_1 , provavelmente, o desaparecimento de N-NH₃ do rúmen refletiu a utilização do mesmo pelos microorganismos.

Na pesquisa em apreço, considerando a igualdade entre as dietas, no que diz respeito ao consumo alimentar (1,41 kg MS/100 kg PV/dia) e a concentração média de N-NH₃ no rúmen (respectivamente, 10,25 e 10,28 mg N-NH₃/100 ml de fluido), pode-se afirmar que a quantidade de substrato fermentado propiciou, para os animais, uma grande disponibilidade de amônia, fato este que pode ter favorecido a atuação dos microorganismos ruminais. Resta verificar se, a partir destes substratos ricos em fibra (34,12 e 46,28% de FDA, na MS, respectivamente, para D_1 e D_2 , Quadro 4), houve produção de energia suficiente, nas condições prevalentes de pH (6,84 e 7,01 de valores médios de pH, respectivamente, para D_1 e D_2), para que pudesse ocorrer uma máxima taxa de fermentação, no rúmen.

Com relação aos ácidos graxos voláteis, observando-se os Quadros 15, 19 e 31 e os Gráficos 13, 14 e 23, verifica-se que as dietas D_1 e D_2 foram iguais ($P > 0,01$) entre si, no tocante aos teores médios dos AGV totais (respectivamente, 77,03 e 74,93 mM); do ácido acético (respectivamente, 48,76 e 51,39 mM) e do ácido isovalérico (respectivamente, 0,98 e 1,08 mM). Examinando os Quadros 22, 27 e 35 e os Gráficos 16, 20 e 26, evidencia-se que a dieta D_1 (silagem de sorgo + levedura) revelou teores médios, significativamente ($P < 0,01$), maiores que a dieta D_2 (silagem de sorgo + farelo de algodão), para os ácidos: propiônico (respectivamente, 15,40 e 13,70 mM);

n-butírico (respectivamente, 10,79 e 7,93 mM) e n-valérico (respectivamente, 1,10 e 0,83 mM). Segundo GRIFFITHS & BATH (1973), dieta exclusiva de silagem de gramínea (10,6% de PB, na MS) foi caracterizada por apresentar 65,3 mM de concentração média de AGV totais, dos quais, 71,7%, 15,7%, 8,3%, 2,1% e 1,3% de proporções molares corresponderam, respectivamente, aos ácidos acético, propiônico, n-butírico, isovalérico e n-valérico. Segundo os mesmos autores, o enriquecimento da silagem de gramínea com farelo de amendoim (12% de PB, na MS) provocou o aumento da concentração média dos AGV totais (90,6 mM) e das proporções molares dos ácidos n-butírico (11,9%) e n-valérico (1,5%) e, em contrapartida, a diminuição das proporções molares dos ácidos acético (67,8%), propiônico (14,8%) e isovalérico (1,9%). Comparando estes últimos dados com os observados na presente pesquisa, tem-se que a dieta D₁ (13,52% de PB, na MS) mostrou valores menores para a concentração média de AGV totais (77,03 mM) e para as proporções molares dos ácidos acético (63,3%), isovalérico (1,27%) e n-valérico (1,43%), mas apresentou valores maiores para as porcentagens molares dos ácidos propiônico (19,99%) e n-butírico (14,01%). Considerando agora a dieta D₂ (13,00% PB, na MS), em relação à dieta de silagem de gramínea + farelo de amendoim (GRIFFITHS & BATH, 1973), tem-se que as proporções molares dos ácidos acético (68,58%) e propiônico (18,28%) foram maiores para a dieta D₂, enquanto que a concentração média dos AGV totais (74,93 mM) e as porcentagens molares dos ácidos n-butírico (10,58%), isovalérico (1,44%) e n-valérico (1,11%) foram menores para a mesma.

No entanto, pela análise das citadas dietas, pode-se comprovar, face à alta porcentagem molar do ácido acético (63,30; 68,58 e 67,80%, respectivamente, para as dietas D₁, D₂ e silagem de gramínea + farelo de amendoim) que se tratam de dietas com alto teor de fibra. Segundo trabalhos citados por KOLB (1984), existe, numa porcentagem de fibra bruta maior que 15%, na MS, uma rela

ção linear com o componente molar em ácido acético. Assim, uma alta porcentagem de fibra bruta, numa ração de feno, por exemplo, leva a altas concentrações de ácido acético (65-75 mol %).

Pode-se esperar, a partir de um elevado consumo proteico, um aumento na concentração dos ácidos de cadeia ramificada e do ácido n-butírico (CHURCH, 1979). Os AGV de cadeia ramificada se formam, principalmente, a partir da fermentação da albumina, no rúmen (KOLB, 1984), derivando-se da desaminação da valina (ácido isobutírico) e leucina (ácido isovalérico). Segundo el-SHASLY (1952), existe uma correlação entre a concentração de N-NH₃ e os ácidos graxos isobutírico e isovalérico, no rúmen, depois da ingestão de alimentos ricos em proteína. Na presente pesquisa, entretanto, o coeficiente de correlação entre as concentrações de N-NH₃ e ácido isovalérico aqui mensurados se revelou significativo ($P < 0,01$), porém, baixo ($r = 0,27$), conforme Quadro 39. GRIFFITHS & BATH (1973) registraram quantidades apreciáveis de AGV de cadeia ramificada em dietas exclusivas de silagem, sendo estas concentrações ainda maiores, nas enriquecidas com suplemento proteico.

No estudo em questão, as dietas D₁ e D₂ apresentaram altas proporções molares de ácido n-butírico (14,01% e 10,58%, respectivamente). O Quadro 39 evidencia, agora, um coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) em édio ($r = 0,50$) entre os teores de N-NH₃ e de ácido n-butírico, o que justifica, em parte, os níveis deste ácido mensurados na pesquisa em apreço. O incremento na produção de ácido n-butírico poderia ser atribuído também à elevação da concentração de ácido acético, pois os trabalhos experimentais têm revelado que 40 a 80% do ácido n-butírico presente no rúmen são consequência da atuação dos microorganismos sobre o ácido acético, promovendo a condensação de dois moles de acetato para a formação de um mol de butirato (CHURCH, 1979). Isto é comprovado, neste expe

rimento, pela existência de correlação significativa ($P < 0,01$) entre os ácidos acético e n-butírico, evidenciada pelo coeficiente de correlação (r) igual a 0,38 (Quadro 39). No entanto, a magnitude do " r " é baixa, indicando o ácido acético apenas como fonte complementar de ácido n-butírico.

Analogamente, ao encontra por MACHADO (1983), o teor de ácido n-butírico foi, estatisticamente ($P < 0,01$), superior (10,79 mM ou 14,01%), na dieta com levedura (D_1), em relação à dieta D_2 com farelo de algodão (7,93 mM ou 10,58%). Este valor maior de ácido n-butírico, na dieta com levedura, indica uma maior degradação de proteína, o que é consubstanciado pela maior solubilidade do N da levedura no rúmen (AHAR & SCHINGOETHE, 1979), em relação ao do farelo de algodão. Segundo KOLB (1984), as proteínas desnaturadas de algumas sementes de oleaginosas são degradadas mais lentamente.

Tal qual relatou MACHADO (1983), na sua pesquisa, os teores de ácido propiônico mensurados neste trabalho foram, relativamente, altos (dieta D_1 : 15,40 mM ou 19,94%; dieta D_2 : 13,70 mM ou 18,28%), como pode ser observado pelas relações acetato/propionato (3,17 para D_1 e 3,75 para D_2). O maior valor de ácido propiônico, observado na dieta D_1 , pode ser justificado pela estrutura física da levedura, pois, de acordo com trabalhos citados por KOLB (1984), a moagem do feno de alfafa favoreceu a produção de ácido propiônico e de ácido n-butírico, determinando, ainda, uma elevação da concentração total de ácidos graxos ($D_1 = 77,03$ mM e $D_2 = 74,93$ mM).

A proteína da levedura, por ter maior solubilidade (citação de MACHADO, 1983), foi mais facilmente degradada no rúmen, permitindo uma produção de ácido n-butírico maior que a da dieta D_2 (farelo de algodão) em 2,86 mM. Por outro lado, o menor tamanho de partícula da levedura em relação ao farelo de algodão, promoveu um aumento

na síntese de ácido propiônico de 1,75 mM. O ácido n-valérico produzido a partir do acetato e propionato foi maior, na dieta D₁, em 0,27 mM.

Observando-se as curvas de variação diuturna dos AGV (Gráficos 17, 21, 24 e 27), pode-se sugerir, para os ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico, que o fator dieta não alterou o tipo de fermentação ruminal e que os efeitos parecem ter sido apenas quantitativos, talvez, provocados por diferença na digestibilidade e solubilidade da fonte proteica. Assim, a dieta com levedura (D₁) tendeu a apresentar maiores concentrações deste ácidos do que a dieta com farelo de algodão (D₂), em quase todos os horários, considerando-se os ácidos n-butírico e n-valérico. Em termos de tendência, a mesma afirmação se aplica para o ácido propiônico. No tocante ao ácido isovalérico, houve uma inversão, revelando a dieta D₂ maiores níveis do que a dieta D₁, na maioria dos horários de amostragem do fluido ruminal. No entanto, as curvas dos quatro AGV citados apresentam uma lenta elevação nas concentrações, sem declínios abruptos, características estas que comprovam se tratarem de alimentos com alto teor de fibra (KOLB, 1984). Evidencia-se, ainda, pelo exame das respectivas curvas, que sempre ocorreu um único pico de concentração observado 4-8 horas (ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico) ou 1-4 horas (ácido isovalérico) após o fornecimento da dieta. Esta informação é interessante, pois indica que esses animais apresentaram um período definido de ingestão de alimentos (pela manhã) ou escolheram o período da manhã para a concentração do seu maior consumo alimentar, independentemente da dieta oferecida. A ingestão de alimentos, verificada para os animais, teve duração média de 3,3 a 12 horas, considerando-se os quatro dias de amostragem de fluido ruminal. Isto evidencia também que o fornecimento alimentar, feito uma vez por dia, pela manhã, promoveu que os animais, em média, ingerissem o alimento num mesmo período de tempo, como o relatado por ALLEN (1972), embora

o lote experimental, na presente pesquisa, não tenha sido submetido a um período de jejum anterior ao dia da coleta, visando a homogeneidade dos dados a serem coletados. De acordo com KOLB (1984), a magnitude do pico observado, para cada AGV considerado, poderia ter sido menor, se a distribuição de ração diária fosse feita em mais de duas vezes, pois, ter-se-ia um pico correspondente a cada ingestão de alimento.

Com relação aos horários em que ocorreram os picos dos AGV, verifica-se que os dados da presente pesquisa para os ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico, não estão de acordo com o conceito corrente de que 2 a 4 horas após o fornecimento de alimento ocorre o pico de produção e a redução do pH para valores mais baixos, como mostram os trabalhos de GRAY & PILGRIM (1951); BALCH & ROWLAND (1957) e BRIGGS *et alii* (1957). Este conceito tem sido empregado na maioria dos trabalhos experimentais, referentes à coleta de fluido ruminal para análises, visando a caracterização de diferenças entre rações (ALLEN, 1972; FOLDAGER, 1977). Embora tenha sido adotado o fornecimento de toda a ração em uma única refeição, os animais não foram treinados a consumir toda a dieta num determinado intervalo de tempo, como fizeram HARROP & PHILLIPSON (1974), com ovinos. Assim, alguns animais que apresentaram comportamento diferente, promoveram uma desuniformidade nos dados. Para ilustrar, a vaca 4 demorou, em média, 3 e 4 horas, respectivamente, para consumir as dietas D_1 e D_2 , revelando-se a mais rápida, enquanto que a vaca 3 levou, respectivamente, 6 e 24 horas para consumir, integralmente, as mesmas quantidades fixadas das dietas D_1 e D_2 .

5.3. Interações entre dietas experimentais e tempos de amostragem

As curvas apresentadas nos Gráficos 6, 9,

17, 21, 24 e 27, correspondentes aos Quadros 8, 12, 23, 28, 32 e 36, mostram que as tendências foram sempre as mesmas, nas 24 horas analisadas, para os valores de pH, N-NH₃ e ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico, apesar de algumas diferenças significativas ($P < 0,01$) terem sido observadas entre as duas dietas, nos vários tempos e entre estes, nas duas dietas. O ácido isovalérico também apresentou diferenças estatisticamente ($P < 0,01$) significativas, mas teve um comportamento diferente em relação aos demais ácidos citados anteriormente. Os AGV totais e o ácido acético não foram alterados em cada tempo em função das dietas, mas, em tendência, se comportaram, semelhantemente, à maioria dos ácidos.

Com relação ao índice pH, verifica-se, pelo exame do Quadro 8 e Gráfico 6, que a dieta D₂ apresentou valores de pH (7,45; 6,30; 6,39; 6,62; 6,99; 7,18; 7,18; 7,35 e 7,64), significativamente ($P < 0,01$), maiores que a dieta D₁ (7,41; 5,91; 6,01; 6,49; 6,73; 6,86; 7,12; 7,35 e 7,63), nos tempos 1, 2, 6 e 8 horas após a alimentação. As duas dietas, no entanto, se revelaram iguais ($P > 0,01$), nos demais tempos avaliados. Enfocando, agora, a interação T x D, nota-se que as dietas estudadas apresentaram valores, significativamente ($P < 0,01$), menores de pH 1 e 2 horas (dieta D₁) e 1, 2 e 4 horas (dieta D₂) após a alimentação. Já, os valores, significativamente ($P < 0,01$), maiores foram observados 0, 16 e 24 horas (dietas D₁ e D₂) após o fornecimento de alimento. Como indicação geral, pode-se considerar que os valores mais baixos de pH (5,91 e 6,30, respectivamente, para as dietas D₁ e D₂) foram registrados 1 hora após a alimentação e, da mesma forma, os mais altos (7,63 e 7,64) foram verificados 24 horas após a ingestão de alimento.

É possível afirmar-se que o fator dieta influenciou sobre os valores de pH mensurados, sendo que a dieta D₂ (com farelo de algodão) tendeu a apresentar valores mais altos, ao longo do tempo, quando comparada à dieta

D₁ (com levedura). Isto indica que o fluido ruminal de animais alimentados com a dieta D₂ tinha, provavelmente, uma maior capacidade tampão, em virtude do seu elevado nível de AGV totais (74,93 mM) e da presença de uma grande quantidade de saliva, em resposta ao seu mais alto teor de fibra (46,28% de FDA, na MS, Quadro 3). Todavia, a melhor explicação para o fato, talvez, resida no maior teor de açúcar apresentado pela levedura (ENN = 61,13%, na MS), em relação ao farelo de algodão (ENN = 40,19%, na MS), acelerando, provavelmente, a fermentação da dieta D₁, o que determinou, nos vários tempos de amostragem, valores mais baixos de pH para esta dieta do que para a dieta D₂. No entanto, verifica-se que ambas as dietas mostraram uma variação diuturna dos valores de pH. Estas oscilações cíclicas de pH têm um significado fisiológico (MAHADEVAN *et alii*, 1982) e são um reflexo da atividade metabólica ruminal que se mostrou muito dinâmica, ao longo das 24 horas de observação.

Considerando o Quadro 12 e Gráfico 9, observa-se a ocorrência de um único pico de N-NH₃, em cada uma das dietas utilizadas. As dietas D₁ (com levedura) e D₂ (com farelo de algodão) apresentaram o pico de N-NH₃, respectivamente, 2 e 2-4 horas após o fornecimento de alimento, o que reflete um padrão de ingestão caracterizado por uma frequência alimentar única, aliada a um consumo alimentar concentrado nas primeiras horas após o fornecimento. Analisando as concentrações médias de N-NH₃ (mg/100 ml de fluido ruminal), entre as dietas D₁ (7,76; 14,75; 19,32; 17,57; 12,41; 5,58; 3,30; 5,34 e 6,19) e D₂ (5,41; 13,86; 18,93; 19,46; 14,42; 7,56; 4,62; 3,80 e 4,42), verifica-se que as mesmas são, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$), em todos os horários de amostragem do fluido ruminal. Sob outro prisma, as dietas D₁ e D₂ apresentaram os seus maiores ($P < 0,01$) valores de N-NH₃ entre 2 e 4 horas pós-alimentação (respectivamente, 19,32 e 17,57 mg/100 ml de fluido, para D₁ e 18,93 e 19,46 mg/100 ml de fluido, para D₂).

Por outro lado, os valores mais baixos ($P < 0,01$) ocorreram, para D_1 , entre 8 e 24 horas após a ingestão, sendo que o mais baixo (3,30 mg/100 ml de fluido) foi registrado no horário de amostragem de 12 horas pós-alimentação. Já, os menores ($P < 0,01$) teores de N-NH₃, para D_2 , ocorreram nos horários: 0, 12, 16 e 24 horas, sendo que o menor (3,80 mg/100 ml de fluido) foi verificado 16 horas pós fornecimento de alimento.

Pelo exame das interações entre os fatores dieta e tempo de amostragem, pode-se afirmar que as duas dietas são semelhantes, no tocante à disponibilidade de N-NH₃, no rúmen. Apenas no tempo 12 horas (dieta D_1) e nos tempos 12, 16 e 24 horas (dieta D_2), as concentrações de N-NH₃ foram inferiores a 5 mg/100 ml de fluido ruminal, reportada por SATTER & SLYTER (1974), como sendo a mínima ideal para a ocorrência de máxima taxa de fermentação microbiana, no rúmen. Comparando-se os valores de pH em relação às concentrações de N-NH₃, ao se levar em conta as duas dietas e os nove tempos de amostragem do fluido ruminal, nota-se que o excedente de N-NH₃ deve ter sido absorvido nos horários que apresentaram pH mais altos, uma vez que, segundo DECKER *et alii* (1961), a permeabilidade da mucosa do rúmen à amônia é maior na faixa de pH de 6,8 a 7,8. Nas dietas D_1 e D_2 , estes pH favoráveis à absorção de N-NH₃ ocorreram, respectivamente, nos horários: 0, 8, 12, 16, 24 e 0, 6, 8, 12, 16, 24 horas de amostragem ruminal, os quais, em sua maioria, coincidem com os tempos de menor concentração de N-NH₃ observados para as duas dietas. Por sua vez, os picos de N-NH₃ verificados para as dietas D_1 e D_2 ocorreram, respectivamente, 2 e 2 - 4 horas após a alimentação, horários estes incluídos nas faixas de pH mais baixo registradas para D_1 (1 a 2 horas) e para D_2 (1 a 4 horas) pós-ingestão alimentar.

O acúmulo de N-NH₃ no rúmen influencia e prejudica o aporte de N dos ruminantes. Desta forma, a ingestão de altas quantidades de N (dietas com alto teor pro-

teico) produz perda do mesmo de até 50%, através da liberação de amônia no rúmen. A concentração de $N-NH_3$, no rúmen, é, pois, um fator decisivo na determinação do grau de utilização do N da dieta (KOLB, 1984) e do teor energético disponível da mesma.

A concentração de $N-NH_3$, no fluido ruminal, é dependente, tanto da quantidade de N, como da solubilidade das proteínas existentes no líquido de rúmen, uma vez que as de maior solubilidade são mais rapidamente degradadas pelos microorganismos ruminais. Neste sentido, Sniffen (1974), citado por MACHADO (1983), verificou que a levedura de fermentação alcoólica apresenta uma solubilidade de N (20,16%) maior do que a observada para o farelo de algodão (9,66%). Isto também é relatado por KOLB (1984), quando cita que as proteínas desnaturadas do feno, dos cereais e de algumas sementes de oleaginosas são mais lentamente degradadas, no rúmen. Além disso, de acordo com o último autor, os processos de secagem, moagem ou retirada de película dos alimentos produzem diminuição da digestibilidade das proteínas. A ingestão de proteínas menos digestíveis implica numa elevação bem menor do $N-NH_3$ do que a que se observaria com a ingestão de alimento contendo proteínas mais digestíveis. Com relação à digestibilidade da proteína, o farelo de algodão apresenta, segundo MACHADO (1983), um teor mais baixo (51,14%) que o da levedura (56,14%).

De acordo com CHALMERS (1961), a ração ideal para o máximo uso de N deveria conter proteína de boa digestibilidade com baixa solubilidade no rúmen. Esta afirmação se baseia na suposição de que altos valores de $N-NH_3$, no rúmen, indicam uma má utilização do N pelo ruminante.

Na presente pesquisa, tanto para D_1 como para D_2 , os aumentos, bem como os decréscimos de $N-NH_3$, não aconteceram de forma abrupta (Gráfico 9). Tendo-se em vis-

ta que as duas dietas apresentaram teores proteicos muito próximos (13,52% para D_1 e 13,00% para D_2), a explicação para tal conformação de curvas de N-NH₃, ao que tudo indica, reside na baixa solubilidade registrada para o N proveniente tanto da levedura como do farelo de algodão. Considerando que o N proveniente do farelo de algodão tinha, ainda, uma solubilidade inferior (9,66%), comparativamente ao da levedura (20,16%), segundo citação de MACHADO (1983), é fácil se justificar o atraso de duas horas observado na dieta D_2 (em relação a D_1), para apresentar o pico de N-NH₃. Apesar da baixa solubilidade do N ter determinado, para ambas as dietas, uma liberação mais lenta de N-NH₃, registrou-se um acúmulo de N-NH₃, no rúmen (correspondente ao excedente dos 5 mg/100 ml de fluido, referidos por SATTER & SLYTER, 1974), decorrente da composição proteica, excessivamente, alta das dietas. A dieta D_2 , por apresentar uma mais lenta liberação de N-NH₃, talvez, tenha sido melhor utilizada pelos microorganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana.

Também para o N-NH₃, tal como ocorreu com o pH, constatou-se que as dietas D_1 e D_2 proporcionaram uma variação diuturna nas concentrações observadas, o que evidencia, mais uma vez, o caráter dinâmico e cíclico da atividade ruminal.

Comparando-se a curva da amônia (Gráfico 9) com as dos ácidos orgânicos (Gráficos 17, 21 e 27), poder-se-ia notar, para a dieta D_2 , uma certa similariedade nas tendências, cabendo salientar a presença de picos de N-NH₃, ácido propiônico, ácido n-butírico e ácido n-valérico sempre 4 horas após a alimentação. O mesmo não pode ser considerado para a dieta D_1 que apresentou os picos dos ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico defasados (8 horas após a alimentação), em relação à sua máxima concentração de N-NH₃, observada 2 horas após o fornecimento de alimento. Apesar disso, as análises de correlação indicaram coeficientes significativos ($P < 0,01$) para as comparações

entre N-NH₃ e os ácidos propiônico ($r = 0,31$), n-butírico ($r = 0,50$) e n-valérico ($r = 0,36$), conforme consta no Quadro 39. Isto sugere um efeito relativo do nitrogênio sobre a produção dos citados ácidos.

As comparações entre as curvas de produção dos ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico mostradas, respectivamente nos Quadros 23, 28 e 36 e Gráficos 17, 21 e 27, revelam que, após os tempos de amostragem 4 horas (dieta D₂) e 8 horas (dieta D₁), ocorreu uma tendência de declínio acentuado, mais na dieta D₁ do que na D₂. Considerando a dieta D₂, a queda pronunciada na produção dos ácidos em estudo coincide com a mesma tendência observada para o N-NH₃, no conteúdo ruminal, que apresentou durante a noite e madrugada os seus valores mais baixos.

Embora, para o ácido acético, não tenha sido observada significância estatística (Quadro 18), no nível adotado ($P < 0,01$), pode-se evidenciar, pelo exame dos seus dados (dieta D₁ = 41,48; 65,89; 58,54; 47,97; 44,47; 47,41; 47,98; 46,96 e 38,12 mM; dieta D₂ = 47,04; 63,88; 58,42; 54,60; 50,11; 48,72; 50,87; 47,91 e 40,93 mM, correspondentes, respectivamente, aos horários 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas pós-alimentação) que, em se tratando das duas dietas, o decréscimo acentuado não ocorreu para as concentrações mensuradas à noite e de madrugada. A partir de 6 horas (dieta D₁) e 8 horas (dieta D₂) pós-alimentação, houve, em tendência, um novo aumento da concentração do ácido acético, porém, menor em magnitude do que o observado nos tempos 1 e 2 horas. Este segundo aumento alcançou, para ambas as dietas, o seu máximo no horário de 12 horas pós-ingestão de alimento, para depois atingir o seu mínimo, no tempo de 24 horas.

Na literatura, existe indicação de que rações com FDA maior que 15%, na matéria seca e teor de proteína bruta igual ou superior a 13%, na matéria seca, determinam a produção de leite com um teor de gordura entre

3,03 e 3,22% (BARNEY *et alii*, 1981). Transferindo isto para a presente pesquisa, poder-se-ia inferir que, a partir das dietas D_1 e D_2 , dever-se-ia esperar produção de leite com teor de gordura semelhante aos observados por BARNEY *et alii* (1981), uma vez que os teores proteicos (respectivamente, 13,52 e 13%, na matéria seca) e os valores de FDA (respectivamente, 34,12 e 46,28%, na matéria seca) estão de acordo com os teores relatados por estes autores. A explicação para a ocorrência de taxas de gordura mais altas pode ser dada, a partir da constatação de relação entre concentração de ácido acético (C_2) e de ácido propiônico (C_3) maior ou igual a 3,0, no rúmen, fato este evidenciado na presente pesquisa (C_2/C_3 igual a 3,17 e 3,75, respectivamente, para D_1 e D_2). Dietas que asseguram alta e prolongada produção de ácido acético devem obedecer à relação C_2/C_3 desejável e, assim, espera-se que propiciem uma produção de leite com teor normal de gordura, tal como relataram BARNEY *et alii* (1981).

O ácido acético, com a ressalva já feita, apresentou-se igual para as duas dietas, em cada tempo de amostragem. Pela observação dos seus dados, verifica-se que, em tendência, os maiores teores de ácido acético (65,89 e 58,54 mM e 63,88 e 58,42 mM, respectivamente, para D_1 e D_2) ocorreram 1 a 2 horas após a ingestão de alimento. Os demais valores mensurados, em tendência, foram iguais entre si, levando-se em conta cada uma das dietas, individualmente, mas, ainda, eram altos.

Considerando, agora, os nove tempos de amostragem, a dieta D_2 , com exceção dos horários 1 e 2 horas pós-alimentação, tendeu a ser superior à dieta D_1 . Segundo BATH & ROOK (1963), existe uma forte relação entre a concentração de ácido acético e o teor de carboidratos estruturais (FDA) da dieta. Isto se evidencia na presente pesquisa, onde devido à alta proporção de silagem de sorgo (71,09%, na matéria seca), as dietas mostraram altos teores de FDA, representados, principalmente, por celulose.

A ausência de alterações bruscas de pH, o registro, nas 24 horas, de valores mínimos (pH 5,90, para D₁ e 6,30, para D₂) muito maiores do que os necessários (pH 5,5 - 6,0) para a inibição da celulase (BRIGGS *et alii*, 1957), além da grande disponibilidade de N-NH₃, no conteúdo ruminal, devem ter favorecido a ação dos microorganismos celulolíticos para uma grande degradação da fibra, logo nos primeiros horários pós-alimentação, denunciada através dos maiores teores de ácido acético. Os altos teores de N das dietas também devem ter favorecido a produção do ácido acético devido às bactérias celulolíticas terem uma grande dependência por amônia. Segundo ANNISON & LEWIS (1966), estudos "in vitro" indicam que o ácido acético é também o principal AGV produzido pela degradação de proteínas. Este fato, entretanto, não foi tão constatado, na presente pesquisa, pois a correlação entre N-NH₃ e ácido acético foi significativa ($P < 0,01$), porém, baixa ($r = 0,32$), conforme Quadro 39.

A análise de variância relativa aos AGV totais (Quadro 14) revela, para esta pesquisa, que a interação Dieta x Tempo não foi significativa, no nível de probabilidade adotado (1%). Assim sendo, as concentrações de AGV totais se apresentaram iguais, para as duas dietas, em cada tempo de amostragem. Representando o ácido acético a maior proporção molar (63,30 e 68,58%, respectivamente, nas dietas D₁ e D₂), em relação às concentrações médias dos AGV totais (77,03 e 74,93 mM, respectivamente, nas dietas D₁ e D₂), pode-se constatar um comportamento até certo ponto semelhante entre os seus dados referidos anteriormente e os dos AGV totais acima discriminados. Assim, evidencia-se, igualmente, a tendência de os maiores teores de AGV totais ocorrerem nas primeiras horas (1, 2 e 4 horas) após a ingestão de alimento, tanto na dieta D₁ (95,09; 91,05 e 81,10 mM), como na dieta D₂ (88,57; 85,16 e 86,60 mM). As demais concentrações tenderam a ser iguais entre si, na maioria dos momentos de amostragem restantes,

para as duas dietas e, o que é mais importante, mostraram-se sempre elevadas, sendo 54,02 mM e 55,02 mM, os menores teores de AGV totais registrados, respectivamente, nas dietas D_1 e D_2 . Levando-se em conta, agora, os nove horários de amostragem, a dieta D_1 , em tendência, foi superior à dieta D_2 , na maioria dos tempos.

Considerando os dados e a curva do ácido propiônico (Quadro 23 e Gráfico 17), verifica-se que a dieta D_1 (10,33; 16,12; 16,82; 16,68; 17,60; 20,19; 17,27; 13,76 e 9,83 mM) foi, estatisticamente ($P < 0,01$), maior que a D_2 (10,42; 14,65; 15,10; 17,45; 16,03; 14,90; 13,91; 11,84 e 9,04 mM), nos tempos 8 e 12 horas após a alimentação. Nos demais tempos, as duas dietas foram iguais, estatisticamente ($P > 0,01$). A dieta D_1 apresentou teores, estatisticamente ($P < 0,01$), maiores de ácido propiônico entre 2 e 12 horas, ocorrendo o pico máximo 8 horas pós-alimentação. Já, a dieta D_2 mostrou suas concentrações, significativamente ($P < 0,01$), maiores de ácido propiônico entre 1 e 12 horas, verificando-se teores máximos entre 4 e 6 horas após a ingestão de alimento. Ambas as dietas apresentaram valores, significativamente ($P < 0,01$), menores de ácido propiônico, nos horários 0, 16 e 24 horas, registrando-se sempre os teores mínimos nos tempos 0 e 24 horas após a alimentação.

Verifica-se que os teores máximos de ácido propiônico ocorreram entre 4 e 8 horas, considerando-se as duas dietas. Sabe-se que a sua produção é estimulada pelo abaixamento do pH (BALCH & ROWLAND, 1957), uma vez que as bactérias que fazem sua síntese precisam de menores valores de pH para sua proliferação. Segundo trabalhos citados por ANNISON & LEWIS (1966), os principais microorganismos produtores de ácido propiônico o fazem a partir do lactato, por um mecanismo de fixação de CO_2 e requerem um pH ótimo de 6,0. No entanto, SLYTER (1979), estudando dietas de volumosos, observou baixa produção de ácido láctico, na faixa de pH 5 a 6. As dietas D_1 e D_2 da presente

pesquisa, eram volumosas (respectivamente, com 34,12% e 46,28% de FDA, na matéria seca). No entanto, esta faixa de pH de 5 a 6 só ocorreu para a dieta D₁ e apenas entre os horários de 1 e 2 horas após a alimentação. A partir disto, pode-se supor, pelas evidências, que o ácido propiônico produzido não teve como precursor o ácido lático.

Quando SATTER *et alii* (1964) estudaram "in vitro" a degradação da celulose e hemicelulose através do inóculo de feno, encontraram que houve produção de ácido propiônico, a partir desses substratos, via succinato. Além disso, deve-se levar em conta, segundo CHURCH (1979) que ocorre uma substancial interconversão dos principais AGV durante a fermentação ruminal, refletindo que um produto final de uma espécie de microorganismo pode ser usado como substrato por outras. O mesmo autor relata que a produção de ácido propiônico, a partir do ácido acético, pode variar de 3 a 37% e, a partir do ácido n-butírico, de 3 a 10%.

Neste trabalho experimental, pode-se supor que o ácido propiônico deve ter sido formado a partir da degradação da celulose ou a partir da conversão do ácido acético, presente em concentrações altas e iguais, para cada dieta, em todos os tempos e, para cada tempo, nas duas dietas. Comprova-se isto, pelo coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,68$) entre os ácidos acético e propiônico (Quadro 39).

Considerando-se todos os horários de amostragem do fluido ruminal, as duas dietas só foram diferentes, estatisticamente ($P < 0,01$), nos tempos 8 e 12 horas, cabendo à dieta D₁ as maiores produções de ácido propiônico, nestes dois horários. Isto, talvez, possa ser atribuído à ocorrência, na dieta D₁, de um acréscimo da produção de ácido propiônico, a partir da conversão do ácido n-butírico. É possível ter ocorrido tal fato, visto que o ácido n-butírico, nos tempos 8 e 12 horas após a alimentação,

se mostrou, significativamente ($P < 0,01$), maior na dieta D_1 . Na dieta D_2 , não deve ter sido observado um acréscimo semelhante (ou, se ocorreu, foi em menor escala) porque, nesta dieta, devido à solubilidade do N ser mais baixa (conforme citação de MACHADO, 1983), a degradação da proteína pelos microorganismos foi mais lenta, com conseqüente menor produção de ácido n-butírico. No entanto, pelo exame do Quadro 39, verifica-se que o coeficiente de correlação foi significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,82$) entre ácido propiônico e n-butírico.

Analisando o Quadro 28 e Gráfico 21, referentes ao ácido n-butírico, observa-se que a dieta D_1 (4,82; 10,73; 13,38; 14,22; 15,21; 15,59; 10,87; 7,88 e 4,43 mM) revelou teores, estatisticamente ($P < 0,01$), maiores do que a dieta D_2 (4,48; 7,87; 9,30; 11,97; 10,63; 9,48; 7,88; 6,03 e 3,74 mM), nos tempos 1, 2, 6, 8 e 12 horas após a alimentação. Nos horários restantes, as duas dietas foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$). A dieta D_1 mostrou teores, significativamente ($P < 0,01$), maiores de ácido n-butírico, nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas, apresentando os teores máximos 6 e 8 horas após a alimentação. Para a dieta D_2 , as concentrações, significativamente ($P < 0,01$), maiores de ácido n-butírico ocorreram, nos horários 2, 4, 6, 8 horas, sendo que os máximos valores observados estavam nos tempos 4 e 6 horas após a alimentação. Ambas as dietas apresentaram valores, significativamente ($P < 0,01$), menores nos tempos 0, 16 e 24 horas, tendo registrado seus teores mínimos sempre 24 horas pós-fornecimento de alimento.

Segundo CHURCH (1979), o consumo de dietas com alto teor proteico provoca um aumento nas concentrações de ácido n-butírico e ácidos graxos de cadeia ramificada. As dietas D_1 e D_2 , utilizadas nesta pesquisa, tinham teores proteicos altos (respectivamente, 13,52% e 13,00% de proteína bruta, na matéria seca) e registraram concentrações iguais ($P > 0,01$) de N-NH₃ no fluido rumi-

nal, em todos os tempos de amostragem. Os teores, significativamente ($P < 0,01$), maiores de N-NH₃ ocorreram, para as duas dietas, entre 2 e 4 horas após a alimentação. Sendo assim, os teores máximos de ácido n-butírico registrados nos tempos 4 e 6 horas, para a dieta D₂, podem ser explicados, pelo menos em parte, como decorrentes da alta degradação de proteína ocorrida nestes horários. No entanto, ao que tudo indica, tal justificativa não pode ser usada para a dieta D₁ que apresentou seus teores máximos de ácido n-butírico, nos tempos 6 e 8 horas pós-alimentação, horários estes em que a concentração de N-NH₃ já se apresentava bem diminuída (Quadro 12 e Gráfico 9).

O aumento na concentração, registrado para o ácido n-butírico na dieta D₁, pode ser justificado a partir da conversão do ácido acético que mostrou teores altos, para ambas as dietas, em todos os tempos de amostragem. De fato, o efeito acentuado de ácido acético sobre a produção de ácido n-butírico pode ser mostrado pelo valor significativo ($P < 0,01$) do coeficiente de correlação entre estes dois ácidos ($r = 0,38$), comprovado pelo exame do Quadro 39. Segundo CHURCH (1979), trabalhos experimentais têm revelado que 40 a 80% do ácido n-butírico encontrado, no rúmen, são provenientes da atuação dos microorganismos sobre o ácido acético.

A análise do Quadro 36 e Gráfico 27, referentes às concentrações do ácido n-valérico, mostra que a dieta D₁ (0,56; 1,19; 1,17; 1,24; 1,43; 1,53; 1,31; 0,92 e 0,53 mM) foi superior ($P < 0,01$) à dieta D₂ (0,54; 0,98; 0,97; 1,12; 1,04; 0,91; 0,78; 0,65 e 0,48 mM), nos tempos 1, 2, 6, 8, 12 e 16 horas após a alimentação. Nos tempos restantes (0, 4 e 24 horas), ambas as dietas foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$). A dieta D₁ apresentou teores, significativamente ($P < 0,01$), maiores e máximos de ácido n-valérico, nos horários 6, 8 e 12 horas após a alimentação. Já, a dieta D₂ registrou suas maiores concentrações de ácido n-valérico 1, 2, 4, 6 e 8 horas, estando

os valores máximos nos tempos 4 e 6 horas após a alimentação. A dieta D₁ apresentou seus teores menores e mínimos nos tempos 0 e 24 horas, enquanto que, para a dieta D₂, os mesmos ocorreram nos horários 0, 16 e 24 horas após a alimentação.

Segundo KOLB (1984), o ácido n-valérico é produzido, principalmente, a partir dos ácidos acético e propiônico. Sendo assim, o aspecto da curva de suas concentrações é o mesmo observado para a curva do ácido propiônico, tanto para a dieta D₁, como para a dieta D₂. Isto pode ser constatado pelos coeficientes de correlação significativos ($P < 0,01$) entre ácido propiônico e ácido n-valérico ($r=0,82$), entre ácido acético e ácido n-valérico ($r=0,47$) e entre ácido n-butírico e n-valérico ($r=0,84$), conforme Quadro 39. Assim sendo, as explicações para as concentrações do ácido n-valérico, para as duas dietas, nos vários tempos após a alimentação, são as mesmas referidas para o ácido propiônico ou n-butírico.

Deve-se registrar, ainda, que o aminoácido prolina pode ser reduzido para ácido δ -amino-valérico que pode ser convertido em ácido n-valérico, considerado um dos fatores de crescimento para algumas das bactérias celulolíticas existentes no rúmen (HUNGATE, 1966). Está é, portanto, mais uma via de produção do ácido n-valérico a partir de proteína, como fonte de energia para o crescimento de alguns microorganismos celulolíticos existentes no rúmen de animais submetidos a dietas pobres em carboidratos. Talvez, na presente pesquisa, nas duas dietas consideradas, o ácido n-valérico não tenha sido usado, exclusivamente, como fator de crescimento para algumas bactérias celulolíticas. Conjectura-se isto, pelo exame do Gráfico 27, onde se verifica que suas concentrações não foram altas antes da alimentação e nem diminuíram, drasticamente e prolongadamente, após o fornecimento de alimento. Tal fato, segundo HUNGATE (1966), caracterizaria o seu uso por estas bactérias celulolíticas, cuja atividade permanece sempre alta ou mesmo aumenta, proporcionalmente, com o tem-

po após o fornecimento de alimento. Também não foi observada uma fermentação proteica contínua, na presente pesquisa, porque não se registrou aumento na concentração de amônia (Gráfico 9) antes da alimentação (citações de HUNGATE, 1966). A correlação entre N-NH₃ e ácido n-valérico foi significativa ($P < 0,01$), mas baixa ($r = 0,36$), segundo Quadro 39.

Examinando-se o Quadro 32 e Gráfico 24 relativos às concentrações do ácido isovalérico, verifica-se que a dieta D₁ (1,17; 1,17; 1,14; 0,99; 0,83; 0,74; 0,75; 0,93 e 1,11 mM) apresentou valores, significativamente ($P < 0,01$), menores que a dieta D₂ (0,84; 1,19; 1,38; 1,46; 1,33; 1,05; 0,89; 0,78 e 0,82 mM), nos tempos 4 e 6 horas após a alimentação. Nos demais horários de amostragem, as duas dietas foram, significativamente, iguais ($P > 0,01$). A dieta D₁ registrou concentrações de ácido isovalérico, estatisticamente ($P > 0,01$), iguais, em todos os tempos pós-alimentação. Já, a dieta D₂ mostrou seus maiores teores de ácido isovalérico, nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 horas, apresentando suas concentrações máximas 2 e 4 horas após a alimentação. A mesma dieta revelou teores, estatisticamente ($P < 0,01$), menores, nos tempos 0, 12, 16 e 24 horas, com mínimas concentrações observadas nesses mesmos horários pós-fornecimento de alimento.

Segundo KOLB (1984), ácidos graxos ramificados são produzidos a partir da degradação de proteína (albumina), no rúmen. O ácido isovalérico, particularmente, é formado da fermentação do aminoácido L-leucina, através de sua desaminação oxidativa. Este isoácido, juntamente com o ácido isobutírico e ácido 2-metil butírico, são fatores de crescimento para muitas bactérias ruminais (HUNGATE, 1966). EL-SHAZLY (1952) foi um dos primeiros a relatar que a degradação de proteínas pelos microorganismos do rúmen resultou em produção de mais AGV de cadeia ramificada e AGV superiores do que dos demais ácidos.

Na presente pesquisa, no entanto, constatou-se um coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$), porém, baixo, ($r = 0,27$), entre as concentrações de amônia e as de ácido isovalérico (Quadro 39), no rúmen. Este coeficiente de correlação baixo, talvez, esteja relacionado, não com a pequena produção de ácido isovalérico a partir da amônia, mas com sua grande utilização pelas bactérias ruminais. Neste sentido, RUMSEY *et alii* (1970) registraram que, em dietas de volumosos, a concentração dos isoácidos presentes no rúmen é menor, devido sua utilização pelas bactérias celulolíticas que, presumivelmente, devem estar presentes em maior número, nos novilhos alimentados com estas dietas.

Observando-se a curva do ácido isovalérico (Gráfico 24), verifica-se, quanto à dieta D_2 (farelo de algodão), que o seu modelo é o mesmo registrado para as curvas da amônia e dos demais AGV analisados. Pelo Quadro 32, observa-se que este ácido apresenta, antes da alimentação (0 hora) e nos últimos horários pós-alimentação (16 e 24 horas), valores, significativamente ($P < 0,01$), menores (respectivamente, 0,84; 0,78 e 0,82 mM), em relação aos observados 2 (1,38 mM), 4 (1,46 mM) e 6 (1,33 mM) horas após o fornecimento de alimento. O mesmo não se constatou para a dieta D_1 que apresentou concentrações, estatisticamente iguais ($P > 0,01$), em todos os tempos de amostragem. No entanto, em tendência, a sua curva se mostrou diferente de todas as outras observadas na pesquisa, revelando teores mais altos de ácido isovalérico antes da alimentação (1,17 mM) e nos tempos 1 (1,17 mM), 2 (1,14 mM), 16 (0,92 mM) e 24 (1,11 mM) horas pós-fornecimento de alimento. Nos horários intermediários (4, 6, 8 e 12 horas), registrou suas concentrações mais baixas.

Provavelmente, este comportamento possa ser justificado através da maior solubilidade do N da levedura (20,16%) em relação à do N do farelo de algodão (9,66%), segundo citação de MACHADO (1983). A partir de uma pro-

teína mais solúvel (levedura), maior quantidade de ácido isovalérico estaria mais rapidamente disponível para ser utilizado, juntamente com a amônia, pelos microorganismos celulolíticos que seriam os predominantes nesta dieta de volumosos (70,83%, na MS) com alto teor proteico (13,52% PB, na MS) e com carboidratos solúveis, relativamente, baixos (ENN = 61,13%, na MS).

HUNGATE (1966) se refere à existência de bactérias ruminais que digerem proteína sem necessidade de carboidrato como fonte de energia. Elas são adaptadas a fazer a conversão de aminoácidos a AGV de cadeia ramificada. A atividade destas bactérias deve permanecer relativamente alta ou mesmo aumentar, proporcionalmente, com o tempo após a alimentação, uma vez que elas digerem outras bactérias ruminais. A provável presença destas bactérias, no rúmen de animais alimentados com a dieta D₁, poderia explicar a tendência de observação de teores mais altos de ácido isovalérico antes da alimentação e nos últimos horários pós-alimentação já referidos anteriormente, para esta dieta.

Considerando os tempos 4 e 6 horas pós-alimentação, as diferenças significativas ($P < 0,01$) assinaladas entre 0,99 e 0,83 mM (dieta D₁) e 1,46 e 1,33 mM (dieta D₂), provavelmente, podem ser justificadas pela possível maior utilização do ácido isovalérico pelas bactérias ruminais, nesses dois tempos, na dieta D₁, em contraposição a uma produção mais lenta (mas, nesses horários, maior), do mesmo ácido, na dieta D₂.

Em linhas gerais, pela análise dos resultados das interações D x T, pode-se afirmar que ambas as dietas apresentaram boa disponibilidade de N-NH₃, o que teria favorecido a atuação dos microorganismos como foi discutido, anteriormente. Além disso, as produções altas e iguais de ácido acético, nas 24 horas de observação, demonstram que as bactérias celulolíticas foram beneficia-

das, se desenvolvendo, provavelmente, mais que as outras (LENG, 1973). Também as variações de pH no tempo não registraram, para ambas as dietas, valores incompatíveis com a atividade da celulase. Os coeficientes de correlação entre pH e os parâmetros: amônia, AGV totais, ácido acético, ácido propiônico, ácido n-butírico, ácido isovalérico e ácido n-valérico foram sempre significativos ($P < 0,01$) e negativos, sendo seus valores, respectivamente: -0,60; -0,69; -0,64; -0,54; -0,55; -0,20 e -0,63, conforme consta no Quadro 39.

Com relação aos valores mais baixos de pH e mais altos de N-NH₃, de AGV totais e de AGV individuais (exceção feita ao ácido isovalérico, na dieta D₁) registrou-se, na presente pesquisa, uma tendência de ocorrência dos mesmos, ainda, no período diurno, o que não concorda com os dados de FARIA (1982) que relata a obtenção de tendências semelhantes no período noturno. Sendo assim, nas dietas utilizadas nesta pesquisa, não deve ter ocorrido um processo fermentativo típico de desdobramento de celulose que, conforme STEWART *et alii* (1958), se caracterizaria por um aumento considerável na produção de ácido acético 10 horas após a ingestão de alimento e por manutenção das concentrações de ácido propiônico, ao longo das 24 horas de observação (de FARIA, 1982). No entanto, os trabalhos básicos de HALE *et alii* (1947), ao indicarem que o processo de digestão de celulose, no rúmen, levava de 6 a 12 horas para sua intensificação, permitem enquadrar a fermentação evidenciada para ambas as dietas desta pesquisa como sendo celulolítica, visto que, nos tempos 4 a 8 horas, foram registrados os maiores valores da maioria dos parâmetros de fermentação ruminal (N-NH₃, ácido propiônico, ácido n-butírico, ácido n-valérico e ácido isovalérico).

Os dados coletados, neste experimento, mostraram que pH, N-NH₃ e AGV apresentaram flutuações, no tempo, indicativas do caráter dinâmico e cíclico da atividade

de metabólica, no rúmen. Assim sendo, o uso de valores médios para esses parâmetros mascarariam as referidas flutuações que têm um sentido fisiológico. Além disso, pode-se afirmar que a metodologia, atualmente, empregada que aconselha a coleta de fluido ruminal de 2 a 4 horas após a ingestão de alimento (de FARIA, 1982) pode não representar as tendências predominantes no rúmen, nem a atuação máxima dos microorganismos, no caso de fermentações celulolíticas. Possivelmente, mais horários de amostragem, compreendendo 6, 8, 10 e 12 horas após a alimentação, pudessem ser utilizados para a caracterização do efeito das dietas sobre o funcionamento do rúmen.

5.4. Interações entre dietas experimentais e animais utilizados

Quando se analisam os Quadros 9, 13, 17, 20, 24, 29, 33 e 37, bem como os Gráficos 7, 10, 13, 15, 18, 22, 25 e 28, verifica-se a grande variação entre os parâmetros referentes à fermentação ruminal, quer entre as quatro vacas (1 e 2, flamengas e 3 e 4, mestiças holandesas) para uma mesma dieta, quer entre dietas, para um mesmo animal. Esta constatação, de início, já ressalta que a extrapolação de certos resultados de pH, N-NH₃ e AGV de alguns bovinos para outros, é contra-indicada. A presente pesquisa, se, por um lado, verifica a diferença entre as dietas para um mesmo animal (o que, até certo ponto, é esperado), por outro, registrou que as variações comportamentais de cada indivíduo, durante seu hábito alimentar e durante a retirada de amostras do líquido ruminal, propiciaram resultados os mais diversos, trazendo, muitas vezes, dificuldades para inferências futuras.

Para o parâmetro pH (Quadro 9 e Gráfico 7), observa-se que os animais 1 e 2 (flamengos) apresentaram valores, significativamente ($P < 0,01$), maiores de pH,

quando submetidos à dieta D_2 (respectivamente 7,26 e 7,12) do que quando receberam a dieta D_1 (respectivamente, 6,81 e 6,70). Já, os animais 3 e 4 (mestiças holandesas) apresentaram valores, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$) de pH, quer sob dieta D_2 (respectivamente, 6,75 e 6,92), quer sob a dieta D_1 (respectivamente, 6,86 e 6,97). No tocante à variação do pH para uma mesma dieta, observaram-se, na dieta D_2 , diferenças, estatisticamente ($P < 0,01$), significativas, apenas entre as vacas 1 e 3, 2 e 3 e 1 e 4. A dieta D_1 mostrou valores de pH, significativamente ($P < 0,01$), diferentes somente entre as vacas 2 e 4. Neste caso, verificaram-se diferenças entre indivíduos e não somente entre raças, como foi constatado por trabalhos citados por CHURCH (1979), em estudo com carneiros.

Com relação às concentrações de $N-NH_3$, (mg/100 ml de fluido), registradas no Quadro 13 e Gráfico 10, observaram-se, para o animal 1, valores, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$), tanto quando sob a dieta D_1 (10,12), como quando sob a dieta D_2 (8,56). Para o animal 2, o teor de $N-NH_3$ foi, estatisticamente ($P < 0,01$), superior na dieta D_1 (12,18), em relação à dieta D_2 (7,94). Os animais 3 e 4 apresentaram um comportamento contrário ao animal 2, ou seja, mostraram valores, estatisticamente ($P < 0,01$), superiores, quando sob a dieta D_2 (respectivamente, 11,88 e 12,72), do que quando sob a dieta D_1 (coincidentemente, 9,34). Por outro lado, os níveis de $N-NH_3$ da dieta D_1 diferiram ($P < 0,01$) apenas entre os animais 2 e 3 e 2 e 4. Já, para a dieta D_2 , os valores verificados, nos animais 3 e 4, iguais entre si, superaram ($P < 0,01$) aqueles registrados para os animais 1 e 2, também semelhantes entre si ($P > 0,01$).

No tocante aos teores de AGV totais (mM), no líquido ruminal (Quadro 17 e Gráfico 13), observaram-se, para os animais 3 e 4, valores, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$), tanto sob a dieta D_1 (respectivamente, 77,76 e 78,41), como sob a dieta D_2 (respectivamente, 77,72 e

85,93). Com relação aos animais 1 e 2, verificou-se que os valores 74,59 (para D_2) e 80,35 (para D_1) superaram, estatisticamente ($P < 0,01$), os teores de 63,22 (para D_1) e 69,88 (para D_2). Se, por um lado, na dieta D_1 , os teores de AGV totais, registrados para os animais 2, 3 e 4, iguais entre si ($P > 0,01$), superaram, estatisticamente ($P < 0,01$), aquele do animal 1, por outro lado, na dieta D_2 , não ocorreram diferenças ($P > 0,01$) apenas entre os animais 1 e 2 e 1 e 3.

Considerando os teores de ácido acético (mM), no líquido de rúmen (Quadro 20 e Gráfico 15), observaram-se, para os animais 1, 3 e 4, valores, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$), tanto sob a dieta D_1 (respectivamente, 46,50; 50,81 e 54,72), como sob a dieta D_2 (respectivamente, 44,35; 52,96 e 51,77). O animal 2 apresentou teor superior ($P < 0,01$) de ácido acético, quando lhe foi administrada a dieta D_2 (56,47), em comparação a 43,01mM (dieta D_1). No que diz respeito à variação dos níveis de ácido acético para uma mesma dieta, verificou-se, para a dieta D_2 , que somente o animal 1 foi inferior ($P < 0,01$) aos demais que foram iguais ($P > 0,01$) entre si. Já, para a dieta D_1 , observaram-se diferenças significativas ($P < 0,01$) entre as vacas 1 e 4, 2 e 4 e 2 e 3.

Pelo exame do Quadro 24 e Gráfico 18, referentes às concentrações de ácido propiônico (mM), nota-se que os bovinos 2 e 3 foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$) entre si para a dieta D_1 (respectivamente, 13,61 e 15,88) e para a dieta D_2 (respectivamente, 14,61 e 14,38). Os animais 1 e 4 apresentaram teores, estatisticamente ($P < 0,01$), superiores de ácido propiônico sob a dieta D_1 (respectivamente, 15,50 e 16,61) do que sob a dieta D_2 (respectivamente, 11,49 e 14,33). Enfocando a variação entre animais, com referência à dieta D_1 , verificou-se que apenas o bovino 2 (menor valor) foi diferente ($P < 0,01$) do bovino 4 (maior valor). No entanto, com relação à dieta D_2 , apenas a vaca 1 foi inferior ($P < 0,01$) a todas as demais que foram iguais ($P > 0,01$) entre si.

No que diz respeito aos níveis de ácido n-butírico (mM), presentes no Quadro 29 e Gráfico 22, pode-se evidenciar que os animais 1 e 2 apresentaram valores superiores ($P < 0,01$), quando estiveram sob a dieta D_1 (respectivamente, 10,68 e 11,40), do que quando receberam a dieta D_2 (respectivamente, 5,82 e 7,05). Já, os bovinos 3 e 4 mostraram-se iguais ($P > 0,01$), tanto sob a dieta D_1 (respectivamente, 8,99 e 12,09), como sob a dieta D_2 (respectivamente, 8,40 e 10,45). Considerando, agora, a variação do parâmetro ácido n-butírico, para uma mesma dieta, verificou-se, com relação à dieta D_1 , que os bovinos 2 e 4 superaram ($P < 0,01$) o bovino 3. No entanto, as vacas 2, 3 e 4 foram iguais ($P > 0,01$) à vaca 1. Para a dieta D_2 , o animal 1 foi igual ($P > 0,01$) ao animal 2, porém, foi inferior ($P < 0,01$) aos demais. Por outro lado, o bovino 4 superou ($P < 0,01$) os bovinos 1 e 2, mas foi igual ($P > 0,01$) ao animal 3 que, por sua vez, foi igual ($P > 0,01$) ao animal 2.

Analisando os teores de ácido isovalérico (mM), registrados no Quadro 33 e Gráfico 25, verifica-se que os animais 1 e 3 tiveram igual ($P > 0,01$) comportamento, quer sob a dieta D_1 (respectivamente, 0,81 e 0,94), quer sob a dieta D_2 (respectivamente, 0,87 e 1,07). O animal 2 foi, estatisticamente ($P < 0,01$), melhor sob a dieta D_2 (1,44) do que sob a dieta D_1 (0,79). O contrário foi revelado pelo animal 4, tendo sido observado o teor 1,39 mM (dieta D_1) maior ($P < 0,01$) do que 0,94 mM (dieta D_2). Considerando a dieta D_1 , evidencia-se que os bovinos 1, 2 e 3 foram iguais ($P > 0,01$) entre si, sendo todos, porém, inferiores ($P < 0,01$) ao bovino 4. Já, para a dieta D_2 , a vaca 2 apresentou teor maior ($P < 0,01$), em relação aos demais animais que foram iguais ($P > 0,01$) entre si.

Por último, atentando-se para as concentrações de ácido n-valérico (mM), registradas no Quadro 37 e Gráfico 28, constata-se que todos os animais apresentaram valores superiores ($P < 0,01$) de ácido n-valérico, quando

estiveram sob a dieta D_1 (1,10; 1,08; 1,09 e 1,11, respectivamente, para os bovinos 1, 2, 3 e 4), do que quando lhes foi fornecida a dieta D_2 (0,68; 0,77; 0,94 e 0,92, correspondentes aos bovinos 1, 2, 3 e 4). Para a dieta D_1 , considerando a variação entre os animais, notou-se que todos os bovinos se comportaram, igualmente ($P > 0,01$). Já, para a dieta D_2 , as vacas 1 e 2, foram iguais ($P > 0,01$) entre si e inferiores ($P < 0,01$) às vacas 3 e 4 que, por sua vez, foram iguais ($P > 0,01$) entre si.

Após a análise, nesta pesquisa, dos resultados apresentados para as interações dieta x animal e animal x dieta, é possível se afirmar que as variações entre os animais, no tocante aos parâmetros indicativos da fermentação ruminal, podem ser muito grandes, mesmo quando se administra a mesma dieta. Tal fato também foi evidenciado por GRIFFITHS & BATH (1973), quando estudaram os efeitos sobre a fermentação ruminal de suplementação energética e/ou proteica em dietas de silagem. Igualmente, BATH & ROOK (1963) indicaram variações diárias, no padrão de fermentação ruminal, observando vacas sob mesma dieta em vários dias. Verificaram que as diferenças dentro de vacas, quanto à proporção molar dos AGV produzidos a partir de uma dada dieta, podem ser consideradas significativas, se, em relação ao valor médio observado para cada vaca, elas excederem, aproximadamente, 3% para o ácido acético, 10% para os ácidos propiônico e n-butírico e 25% para o ácido n-valérico. Os mesmos autores também relataram a existência de diferenças marcantes entre vacas, mesmo sob uma mesma dieta. Para eles, tais diferenças podem ser justificadas, em parte, pela existência de variações entre vacas, quanto à taxa de passagem da ingesta pelo rúmen, ou seja, quanto ao tempo de retenção da dieta, no compartimento ruminal. Estas diferenças são, especialmente, expressivas, quando a dieta contém concentrados, em sua composição.

Provavelmente, na presente pesquisa, a mesma explicação possa ser empregada para justificar resulta

dos extremamente variados, observados para um mesmo parâmetro indicativo da fermentação ruminal, em animais diferentes, submetidos a uma mesma dieta.

5.5. Tempos de amostragem

As oscilações cíclicas observadas para o pH, concentrações de N-NH₃ e teores de AGV foram observadas por um grande número de pesquisadores (Mc DONALD, 1952; ANNISSEON *et alii*, 1954; LEWIS & Mc DONALD, 1958 e SCHAADET & JOHNSON, 1969). Apesar disso, em muitos estudos, a concentração média de N-NH₃ foi, ainda, usada como uma medida dos requerimentos dos microorganismos ruminais. No entanto, devido às oscilações cíclicas das concentrações de amônia e da atividade metabólica do rúmen, demonstradas por WOHLT *et alii* (1976) e MAHADEVAN *et alii* (1982), tornou-se de consenso que os valores médios de N-NH₃ ruminal não são significativos sob condições práticas de alimentação "ad libitum". As flutuações de amônia, pH e AGV são o reflexo da atividade metabólica muito dinâmica e cíclica do rúmen (MAHADEVAN *et alii*, 1982). Segundo estes autores, tais flutuações têm um significado fisiológico e são mascaradas, quando se usam valores médios. Assim, para eles, a descrição mais correta dos parâmetros de fermentação, sob condições práticas, e representá-los em termos de máximo e mínimo e taxas de variação.

Considerando o Quadro 5 e Gráfico 3, verifica-se que o pH mostrou variações diuturnas evidenciadas pelos valores: 7,43; 6,11; 6,20; 6,55; 6,86; 7,02; 7,15; 7,35 e 7,63, observados, respectivamente, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação. Os valores mais baixos ($P < 0,01$) de pH foram registrados, nesta pesquisa, 1 e 2 horas após a alimentação. Segundo PANDE & SHUKLA (1981), a redução do pH ocorre, usualmente, 2 a 3 horas após a alimentação. No entanto, um trabalho ci-

tado por PANDE & SHUKLA (1981) relatou o decréscimo do pH, ocorrendo 1 hora após a alimentação. Portanto, estas duas citações bibliográficas sustentam o resultado evidenciado pela presente pesquisa (declínio do pH 1 a 2 horas pós-alimentação). Por outro lado, os valores mais altos ($P < 0,01$) de pH se registraram, nos tempos 0 e 24 horas após a alimentação, sendo eles, respectivamente, 7,43 e 7,63, iguais entre si.

Os valores observados nestes horários concordam com a afirmação de KOLB (1984), no tocante ao fato de que, em tempos de jejum (0 e 24 horas), o pH do rúmen se eleva a valores entre 7 e 8. Também, pelo exame dos resultados de pH, pode-se verificar, nesta pesquisa, que, em seguida ao consumo de alimento, houve um declínio abrupto nas 2 primeiras horas, após o qual se seguiram aumentos gradativos, de modo a alcançar, apenas depois de 16 horas, o valor 7,35, semelhante ($P > 0,01$) ao pH 7,43, registrado antes da alimentação. Os valores mais baixos de pH, correspondentes ao pico na concentração de amônia, provavelmente, refletem uma estimulação da fermentação ruminal e indicam concentrações mais altas de ácidos orgânicos. Isto é revelado, neste trabalho, pelos coeficientes de correlação significativos ($P < 0,01$) e negativos entre pH e N-NH₃ ($r = -0,60$) e entre pH e AGV totais ($r = -0,69$), conforme o Quadro 39.

As variações no pH são consideradas resultantes de mudanças nas concentrações dos ácidos orgânicos, principalmente, daqueles presentes no rúmen em decorrência da fermentação do alimento, bem como da quantidade de saliva produzida (CHURCH, 1979). Segundo SINGH & SUD (1981), a rapidez e a magnitude das mudanças de pH dependem, em parte, da dieta e da velocidade de absorção dos produtos finais da fermentação ruminal. Outros fatores que também influem são a secreção das glândulas salivares e a velocidade de passagem da ingesta para os outros compartimentos.

Pelo exame do Quadro 11 e Gráfico 8, consta-se que as concentrações de N-NH₃ são também bastante variáveis no tempo, sendo que o valor registrado, em cada horário, reflete, grandemente, o teor de N da dieta, a solubilidade e a velocidade com que os compostos nitrogenados são atacados pelos microorganismos ruminais.

Os teores de N-NH₃ (mg/100 ml de fluido) observados, na presente pesquisa, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação, foram, respectivamente: 6,58; 14,31; 19,13; 18,52; 13,41; 6,57; 3,96; 4,57 e 5,30. As concentrações máximas ($P < 0,01$) de N-NH₃ foram registradas 2 e 4 horas após a alimentação, o que concorda, em parte, com a citação de PANDE & SHUKLA (1981) que relatam pico de N-NH₃ 2 horas após o fornecimento de dieta sem uréia.

KOLB (1984) também ressalta a elevação da concentração de amônia, logo após o fornecimento de alimento, alcançando um máximo, no geral, 1 a 2 horas pós-alimentação. As curvas publicadas por DAVIS & STALLCUP (1967), BUCHANAM-SMITH & YAO (1978) e de FARIA (1982) revelam que cerca de 2 a 3 horas após a ingestão de alimentos ocorrem picos máximos de disponibilidade de amônia no conteúdo ruminal. Todas estas citações dão sustentação aos resultados evidenciados na presente pesquisa. Mais uma vez, fica caracterizado um período definido de consumo alimentar pela manhã, tendo-se em vista a presença do único pico de N-NH₃ observado 2 e 4 horas após a alimentação.

Os teores inferiores ($P < 0,01$) de N-NH₃ foram observados, na pesquisa em apreço, 12, 16 e 24 horas após o fornecimento de alimento, correspondendo, estes horários, àqueles em que os valores de pH já se encontravam entre 7,15 e 7,63. É provável que os teores mais baixos de N-NH₃, verificados nesses tempos, estejam refletindo a ocorrência de uma maior taxa de absorção de amônia, no rúmen, visto que os valores de pH correspondentes estão den-

tro da faixa 6,8 a 7,8, relatada por DECKER *et alii* (1961), como sendo aquela em que a permeabilidade da mucosa ruminal à amônia é máxima.

Por outro lado, os valores mais altos de N-NH₃, incluindo os teores máximos, ocorreram, neste trabalho, nos horários 1, 2, 4 e 6 horas pós-alimentação, os quais corresponderam a valores de pH entre 6,11 e 6,86.

A concentração inicial de N-NH₃ (0 hora), verificada nesta pesquisa, foi alta (6,58 mg/100 ml de fluido) e igual ($P > 0,01$) aos teores observados nos tempos 16 e 24 horas pós-alimentação. Esta alta concentração inicial se refletiu no pico registrado 2 e 4 horas pós-alimentação.

Pelo exame das concentrações de N-NH₃, no tempo, pode-se, ainda, notar que, somente nos horários 12 e 16 horas, os valores de N-NH₃ (respectivamente, 3,96 e 4,57 mg/100 ml de fluido) foram inferiores a 5 mg/100 ml de fluido, referido por SATTER & SLYTER (1974), como sendo o limite, a partir do qual já não se consegue melhorar a taxa de fermentação pelos microorganismos ruminais. Desta forma, os altos níveis de N-NH₃, registrados nesta pesquisa, resultantes da degradação de alimentos com altos teores proteicos, indicam uma utilização ineficiente das proteínas alimentares, de acordo com citações de LUDRI & RAZDAN (1981) e refletem, talvez, acúmulo de amônia no rúmen.

Os AGV são as principais fontes de energia dos ruminantes. Sua concentração, no rúmen, depende da natureza da dieta, da presença de carboidratos solúveis, do tipo de microorganismos predominantes, etc.

Analisando-se os teores de AGV totais, registrados no Quadro 15 e Gráfico 11, constatam-se os valores: 60,84; 91,83; 88,11; 83,85; 79,34; 80,26; 76,25; 68,83 e 54,51 mM, correspondentes, respectivamente, aos tempos

0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação.

Verifica-se, igualmente, conforme alusão acima, que, em todos os tempos, os teores de AGV totais foram altos. No entanto, percebe-se que, depois do fornecimento de alimento, a concentração dos AGV totais aumentou, no fluido ruminal, para cair, lenta e gradativamente, a seguir. Os valores mais elevados foram registrados 1, 2 e 4 horas após a alimentação. No entanto, os níveis permaneceram altos, nos tempos 6, 8 e 12 horas, tendo-se verificado aí, os valores iguais ($P > 0,01$) aos mensurados nos horários 2 e 4 horas pós-alimentação. Isto, de um lado, concorda com o conceito atual de que, logo após a ingestão de alimento, ocorre o pico máximo de produção de AGV (JARRIGE, 1978; CHURCH, 1979), porém, de outro, reitera a afirmação de que a digestão da celulose é um processo lento e gradativo (HUNGATE, 1966 e CHURCH, 1979), como pode-se verificar, indiretamente, pelos elevados teores de AGV constatados nesta pesquisa.

Como já foi ressaltado, anteriormente, no presente experimento, para as duas dietas utilizadas, deve ter ocorrido um processo fermentativo, predominantemente, de desdobramento de celulose, caracterizado por aumento na produção de ácido acético, comprovado por um coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) entre este e os AGV totais ($r = 0,92$), conforme Quadro 39. Entretanto, não se revelou um processo fermentativo típico de desdobramento de celulose porque, apesar do aumento do ácido acético, não houve a manutenção dos níveis de ácido propiônico e nem se registrou a ocorrência de pico de produção de AGV totais entre 6 e 12 horas após a alimentação, tempo necessário, segundo HALE *et alii* (1947), para que o processo de digestão da celulose seja intensificado.

Os valores inferiores ($P < 0,01$) foram evidenciados antes da alimentação (60,84 mM) e 24 horas (54,51 mM) pós-fornecimento de alimento, mas, pelo visto, eram ainda altos.

Consultando o Quadro 5 e Gráfico 3, referentes à variação do pH no tempo, verifica-se, como já foi ressaltado anteriormente, que os seus valores estão dentro da faixa 6,11 a 7,63. Segundo KOLB (1984), com valores de pH entre 5,5 e 6,5, existe grande proporção de ácidos graxos livres no rúmen, diminuindo, consideravelmente, quando ocorre elevação dos valores de pH entre 7,0 e 7,5.

Neste raciocínio, na pesquisa em pauta, existindo um coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) entre pH e AGV totais ($r = -0,69$), conforme Quadro 39, poder-se-ia propor pela análise conjunta de seus valores, nos vários tempos, que a absorção de AGV, provavelmente, dovesse ser maior, nos horários 1, 2 e 4 horas pós-alimentação que, coincidentemente, no entanto, foram os tempos onde se registraram as concentrações superiores de AGV totais e os valores mínimos de pH. Sendo assim, provavelmente, deve ter ocorrido pequena absorção de AGV, no rúmen ou maior produção. Estes fatos aliados à taxa máxima de fermentação microbiana, retratada por excesso de $N-NH_3$, em quase todos os tempos (exceção feita aos horários 12 e 16 horas), conforme já foi discutido, indicam que, provavelmente, os microorganismos também produziram mais AGV do que poderia ser utilizado no rúmen.

Talvez, a já comentada possível conversão de aminoácidos em ácidos graxos voláteis, especialmente, n-butírico e isovalérico, observação esta induzida pela constatação de coeficientes de correlação significativos ($P < 0,01$), nesta pesquisa, entre $N-NH_3$ e ácido n-butírico ($r = 0,50$) e entre $N-NH_3$ e ácido isovalérico ($r = 0,27$), conforme Quadro 39, venha ajudar a esclarecer a manutenção de níveis tão altos de AGV totais, nos vários tempos. Pode-se reforçar esta suposição, se forem analisados, agora, os coeficientes de correlação significativos ($P < 0,01$) relacionados entre AGV totais e ácido n-butírico ($r = 0,70$) e entre AGV totais e ácido isovalérico ($r = 0,49$).

Pode-se esclarecer melhor a grande preponderância do ácido acético nas produções diuturnas de AGV totais, examinando o Quadro 19 e Gráfico 14, onde estão apresentadas as concentrações do mesmo: 44,26; 64,89; 58,48; 51,28; 47,29; 48,06; 49,43; 47,43 e 39,53 mM, relativas, respectivamente, aos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas pós-alimentação. Os níveis superiores ($P < 0,01$) foram verificados 1 e 2 horas após o fornecimento de alimento. A partir do horário 4 horas, houve um pequeno declínio, estatisticamente ($P < 0,01$), significativo, registrando-se um valor (51,28 mM) inferior ($P < 0,01$) a 64,89 mM (1 hora) e superior ($P < 0,01$) a 39,53 mM (24 horas), mas igual ($P > 0,01$) a todos os outros demais. Semelhantemente aos AGV totais, constataram-se teores altos de ácido acético em todos os tempos de amostragem, visto que o valor mais inferior ($P < 0,01$), diferente dos demais, foi registrados 24 horas após a alimentação e não era, ainda, baixo (39,53 mM).

Analizando as variações diuturnas das concentrações dos ácidos propiônico e n-butírico (respectivamente, Quadros 22 e 27 e Gráficos 16 e 20), constata-se os teores: 10,38; 15,38; 38,15; 15,96; 17,07; 16,82; 17,55; 15,59; 12,80 e 9,43 mM (para o ácido propiônico) e 4,65; 9,30; 11,34; 13,10; 12,92; 12,53; 9,37; 6,96 e 4,08 mM (para o ácido n-butírico), correspondentes, respectivamente, aos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação.

Para o ácido propiônico, a manutenção de níveis superiores ($P < 0,01$) e iguais ($P > 0,01$) entre si, ocorreu a maior parte do tempo, ou seja, nos horários 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a alimentação. Houve um pequeno decréscimo ($P < 0,01$), no tempo 16 horas, sendo o seu valor (12,80 mM), ainda, igual ($P > 0,01$) ao horário 12 horas (15,59 mM) e 0 hora (10,38 mM). O teor mais inferior ($P < 0,01$) registrado ocorreu 24 horas após a alimentação, mas era igual ($P > 0,01$) à concentração inicial (tempo 0

hora). O ácido propiônico também teve uma grande participação nas concentrações dos AGV totais, comprovada através de um coeficiente de correlação (r) significativo ($P < 0,01$) e alto de 0,89 (Quadro 39). Igualmente, pelo exame do mesmo Quadro, observam-se coeficientes de correlação (r) significativos ($P < 0,01$) de 0,68; 0,82 e 0,82, respectivamente, entre as concentrações de ácido propiônico e as dos ácidos acético, n-butírico e n-valérico.

Considerando, agora, o ácido n-butírico, com prova-se a existência de semelhança de sua variação diuturna com a do ácido propiônico, uma vez que também se registraram valores superiores ($P < 0,01$) e iguais entre si, nos horários 2, 4, 6 e 8 horas pós-alimentação. No tempo 12 horas, ocorreu um leve declínio ($P < 0,01$), sendo, no entanto, o seu valor (9,37 mM) igual ($P > 0,01$) às concentrações nos tempos 1 e 2 horas pós-fornecimento de alimento. O nível mais baixo (4,08 mM) foi registrado no tempo 24 horas, mas era igual ($P > 0,01$) à concentração no tempo 0. Novamente, deve-se frisar que os teores observados para o ácido n-butírico são altos durante o dia, tal como se verificou para os ácidos acético e propiônico. Registre-se também que o coeficiente de correlação entre AGV totais e ácido n-butírico foi significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,70$), conforme Quadro 39.

No tocante aos ácidos isovalérico e n-valérico, constata-se, pelo exame dos Quadros 31 e 35 e Gráficos 23 e 26, o registro dos teores respectivos de 1,01; 1,18; 1,26; 1,23; 1,08; 0,90; 0,82; 0,86 e 0,97 mM e 0,55; 1,08; 1,07; 1,18; 1,23; 1,22; 1,04; 0,79 e 0,50 mM, correspondentes, respectivamente, aos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação.

O ácido isovalérico apresentou uma variação diuturna ímpar, revelando concentrações mais altas ($P < 0,01$) e iguais ($P > 0,01$) entre si, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a alimentação. O valor inferior (0,82

mM) registrado só foi menor ($P < 0,01$) que as concentrações correspondentes aos tempos 1, 2 e 4 horas e ocorreu 12 horas pós-administração de alimento. Portanto, comparativamente aos demais ácidos, a variação de suas concentrações no tempo foi muito pequena.

Pelo exame do Quadro 39, comprova-se um coeficiente de correlação (r) significativo ($P < 0,01$) entre AGV totais e ácido isovalérico de 0,49, inferior ao observado para todos os demais ácidos. Igualmente, o seu coeficiente de correlação com os valores de pH foi significativo ($P < 0,01$), mas muito baixo ($r = -0,20$), o que explica uma certa independência dos seus teores em relação aos valores registrados para o pH em cada tempo.

Com relação ao ácido n-valérico, a sua variação diuturna registrou teores superiores ($P < 0,01$), nos tempos 4, 6 e 8 horas após a alimentação. No horário 12 horas, houve um decréscimo, registrando-se um valor menor ($P < 0,01$) aos verificados nos três horários já citados, mas igual ($P > 0,01$) aos observados nos tempos 1, 2 e 4 horas após o fornecimento de alimento. Os valores inferiores ($P < 0,01$) foram verificados nos tempos 0 (0,55 mM) e 24 horas (0,50 mM) e eram iguais ($P > 0,01$) entre si e diferentes de todos os demais teores. Através desta análise, verifica-se que a variação de suas concentrações no tempo obedece mais à variação dos valores de pH, o que se comprova pelo coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) entre estes dois parâmetros ($r = -0,63$), de acordo com o Quadro 39. Com relação às concentrações de AGV totais e as do ácido n-valérico, observou-se um coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) de 0,72.

Após a discussão das variações diuturnas observadas em todos os parâmetros de fermentação ruminal, pode-se concluir a respeito da importância dos tempos de amostragem também nesta pesquisa, reforçando os estudos mostrados neste sentido por outros autores (STEWART et

alii, 1958; RHODES & WOODS, 1962; PUTNAM *et alii*, 1966). Os dados coletados, no presente trabalho, sugerem que a indicação de coleta de fluido ruminal, nos tempos 2 e 4 horas após a ingestão de alimentos (de FÁRIA, 1982), atualmente em uso, pode não representar bem as tendências prevalentes no rúmen, nem mostrar a atividade ruminal decorrente da atuação máxima dos microorganismos, quando as fermentações são, predominantemente, celulolíticas.

Talvez, a extensão do período de coleta de fluido ruminal para até 10 a 12 horas após a alimentação, pudesse ser usada para melhor caracterização do efeito das dietas sobre o funcionamento do rúmen. Além disso, estudos da variação diuturna da produção dos metabólitos no rúmen seriam muito interessantes para a obtenção de informações mais detalhadas sobre o efeito de diferentes regimes de alimentação. A semelhança dos dados obtidos nesta pesquisa com os relatados por de FÁRIA (1982), em dois experimentos, parece indicar que os conceitos tradicionais necessitam, talvez, de uma revisão.

5.6. Animais utilizados

É sabido que as diferenças individuais são bastante importantes e promovem, muitas vezes, uma desuniformidade nos dados colhidos, devido os animais apresentarem comportamentos diferentes face às condições de alimentação e de manejo impostas. Assim, diferenças marcantes nos padrões de fermentação ruminal podem ser observadas de um animal para outro, sob uma mesma dieta, especialmente, quando esta dieta contém alta proporção de concentrados (BATH & ROOK, 1963). Segundo estes autores, isto é consequência, em grande parte, da variação observada entre vacas, no tocante à taxa de passagem da ingesta proveniente do rúmen.

Na presente pesquisa, em virtude das duas dietas empregadas apresentarem uma alta proporção de volumosos (71,09%, na MS) e ter sido fixado o fornecimento de alimento (1 vez por dia) e também o consumo diário restrito de matéria seca (1,41% do peso vivo), as variações decorrentes das diferenças individuais assinaladas, provavelmente, foram menores do que poderiam ser, mas existiram e foram significativas ($P < 0,01$), para todos os parâmetros de fermentação ruminal.

No decorrer do experimento, tornou-se evidente a diferença entre vacas frente ao "stress" imposto pela coleta do fluido ruminal, como também quanto à velocidade de ingestão de alimento. Pesando as sobras em cada tempo de amostragem, pode-se registrar que, independentemente de dieta, a vaca 4 (mestiça holandesa) teve a maior velocidade de ingestão, gastando, em média, 3,3 horas, para ingerir toda a dieta oferecida. Seguindo-se a ela, veio a vaca 1 (flamenga), com 5,3 horas, em média, depois a vaca 2 (também flamenga), com 8 horas, em média e, por último, a vaca 3 (mestiça holandesa), com 12 horas, em média. Quanto ao comportamento no momento da coleta, as vacas 1 e 4 se revelaram mais irritadiças, secretando maiores quantidades de saliva do que as vacas 2 e 3.

Considerando o Quadro 5 e Gráfico 3, verifica-se que os valores de pH mostraram variação entre vacas, tendo-se registrado 7,03; 6,91; 6,81 e 6,94, respectivamente, para os animais 1, 2, 3 e 4. Pela análise dos dados, observa-se diferença estatística significativa ($P < 0,01$) somente entre os bovinos 1 e 3, sendo os demais iguais ($P > 0,01$) entre si. Assim, evidenciou-se diferença de pH apenas entre vacas que se comportaram de forma muito diferente, no momento da coleta de fluido ruminal e que apresentaram grandes diferenças de velocidade de ingestão de alimento. A vaca 1 (pH = 7,03) foi um animal que revelou bastante "stress" e uma salivação abundante, no momento da

coleta, além de apresentar a segunda maior velocidade de ingestão (em média, 5,3 horas) da dieta. Em contrapartida, o animal 3 foi dos mais calmos e apresentou a menor velocidade de ingestão (em média, 12 horas) da dieta.

Quanto às concentrações de N-NH₃ (mg/100 ml de fluido), registradas no Quadro 11 e Gráfico 8, constatarem-se os teores de 9,34; 10,06; 10,61 e 11,03, correspondentes, respectivamente, aos bovinos 1, 2, 3 e 4. Desta feita, observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) apenas entre as vacas 1 e 4. Assim, a vaca 4 apresentou o maior nível de N-NH₃ (11,03 mg/100 ml) e registrou um dos mais altos valores de pH (6,94). Já, a vaca 1 mostrou o menor teor de amônia (9,34 mg/100 ml de fluido) e um valor de pH, igualmente, alto (7,03).

No entanto, não se pode pensar em justificar o menor teor de N-NH₃ observado para a vaca 1 por uma provável maior taxa de absorção de N-NH₃, ocorrida no rúmen deste animal, porque os valores de pH registrados para todas as vacas estavam dentro da faixa de 6,8 a 7,8, onde, segundo DECKER *et alii* (1961), a permeabilidade da mucosa do rúmen à amônia é máxima. Assim, pelos valores de pH registrados, todas as vacas tiveram a mesma possibilidade de apresentar igual absorção do N-NH₃ através do epitélio ruminal.

Desta forma, a diferença significativa ($P < 0,01$) entre as concentrações de N-NH₃ observadas para as vacas 1 e 4 deve ter sido motivada por outras características individuais, visto que ambas as vacas implicadas mostraram maior "stress", no momento da coleta e também as duas maiores velocidades de ingestão da dieta (vaca 4 = 3,3 horas e vaca 1 = 5,3 horas). Todas as vacas, no entanto, apresentaram médias de N-NH₃ muito mais altas que o limite necessário para maximizar a taxa de fermentação ruminal, referida por SATTER & SLYTER (1974), provavelmente,

indicando, mais uma vez, a ocorrência de acúmulo de N-NH_3 , no rúmen de todas elas.

Examinando o Quadro 15 e Gráfico 11, referentes às concentrações de AGV totais, verifica-se que as vacas 1, 2, 3 e 4 apresentaram, respectivamente, os teores: 68,91; 75,12; 77,74 e 82,17 mM. As vacas 2, 3 e 4 foram iguais ($P > 0,01$) entre si. O animal 1, no entanto, foi igual ($P > 0,01$) ao 2 e inferior ($P < 0,01$) ao 3 e ao 4. Desta maneira, as vacas 1 e 2 que mostraram concentrações de AGV totais, igualmente, mais baixas, (68,91 e 75,12 mM, respectivamente) acusaram valores de pH, igualmente, mais altos (respectivamente, 7,03 e 6,91). Isto, mais uma vez, reflete o coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) e negativo existente entre pH e concentrações de AGV totais ($r = -0,69$), conforme Quadro 39.

Os teores de ácido acético: 45,42; 49,74; 51,89 e 53,24 mM, respectivamente, correspondentes aos animais 1, 2, 3 e 4 se encontraram registrados no Quadro 19 e Gráfico 14. Analisando-se estas concentrações, observa-se que os dados se comportaram da mesma forma que os teores de AGV totais, ou seja, as vacas 2, 3 e 4 foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$) entre si e a vaca 1 apresentou o menor ($P < 0,01$) teor (45,42 mM), sendo este igual ($P > 0,01$) somente ao apresentado pelo animal 2. Este comportamento igual dos AGV totais e ácido acético, mais uma vez confirma que, num padrão de fermentação, predominantemente, celulolítico, prevalece o ácido acético, na composição dos AGV totais, sendo isto visualizado pelo coeficiente de correlação significativo ($P < 0,01$) e alto ($r = 0,92$, Quadro 39), observado entre eles. Desta forma, as vacas que apresentaram maiores concentrações de AGV totais, também o fizeram para o ácido acético.

O exame do Quadro 22 e Gráfico 16 evidencia os teores de ácido propiônico como sendo: 13,50; 14,11; 15,13 e 15,47 mM, respectivamente, para os animais 1, 2,

3 e 4. Verificou-se que somente as vacas 1 e 4 apresentaram concentrações, estatisticamente, diferentes ($P < 0,01$). Tal como para o $N-NH_3$, ocorreram diferenças significativas ($P < 0,01$) apenas entre os animais 1 e 4 (1=flamengo e 4=mestiço holandês) que apresentaram os dois valores de pH mais altos, as duas maiores velocidades de ingestão de alimento e um "stress", igualmente, grande frente à coleta de fluido ruminal. As diferenças individuais tornaram marcante a variação de concentração deste ácido observada para os animais 1 e 4, tendo sido favorável ao animal 4 (mestiço holandês).

Com relação aos teores de ácido n-butírico (Quadro 27 e Gráfico 20), constata-se os valores: 8,25; 9,22; 8,69 e 11,27 mM, correspondentes, respectivamente, aos animais 1, 2, 3 e 4. Evidenciou-se que os bovinos 1, 2 e 3 apresentaram concentrações iguais ($P > 0,01$) de ácido n-butírico, mas foram todos inferiores ($P < 0,01$) ao animal 4. Assim, o maior teor de ácido n-butírico foi associado ao bovino 4 que apresentou dos mais altos níveis de ácido acético, um valor elevado de pH (6,94) e um alto teor de $N-NH_3$ (11,03 mg/100 ml de fluido). As análises de correlação indicaram coeficientes significativos entre ácido n-butírico, de um lado, e ácido acético ($r = 0,38$), pH ($r = -0,55$) e $N-NH_3$ ($r = 0,50$), do outro, como mostra o Quadro 39.

Analisando o Quadro 31 e Gráfico 23, referentes aos níveis de ácido isovalérico, verifica-se que as vacas 1, 2, 3 e 4 apresentaram, respectivamente, os teores: 0,84; 1,12; 1,00 e 1,17 mM. O menor ($P < 0,01$) teor de ácido isovalérico foi registrado para a vaca 1 que foi diferente ($P < 0,01$) daquele das vacas 2 e 4 (iguais entre si). Esses três animais revelaram um valor de ácido isovalérico semelhante àquela da vaca 3.

Por último, verificando-se os teores de ácido n-valérico presentes no Quadro 35 e Gráfico 26, consta

ta-se que os animais 1, 2, 3 e 4 apresentaram, respectivamente, as concentrações: 0,89; 0,92; 1,02 e 1,02 mM. Os animais 2, 3 e 4 foram iguais ($P > 0,01$) entre si, com relação aos teores do referido ácido orgânico. Já, o animal 1 apresentou teor de ácido n-valérico igual ($P > 0,01$) ao animal 2 e menor ($P < 0,01$) do que o mostrado pelos bovinos 3 e 4. É interessante ressaltar que a vaca número 1, flamenga, no geral, apresentou no líquido ruminal o menor teor de N-NH₃ (9,34 mg/100 ml de fluido), menores níveis de AGV totais e dos ácidos acético, propiônico, n-butírico, isovalérico e n-valérico, maior valor do pH (7,03), a segunda maior velocidade de ingestão (5,3 horas) e "stress" no momento da coleta.

Após todas estas comparações entre os animais, pode-se enfatizar que as diferenças individuais existem e são marcantes. Analisando-se os resultados, é possível afirmar-se que as variações observadas provêm de diferenças acentuadas no padrão de fermentação ruminal apresentado pelos animais, independentemente da dieta, explicadas, em parte, pela existência de diferenças entre vacas quanto à taxa de passagem da ingesta pelo rúmen (BATH & ROOK, 1963).

A estas causas de variação, acrescente-se, ainda, o efeito do "stress" sobre o animal, motivado, sobretudo, pela operação de coleta do fluido ruminal e tendo, como consequência, uma maior salivação por parte do mesmo. A saliva tem um grande efeito, aumentando a taxa de diluição da fase líquida do rúmen (HARRISON *et alii*, 1975), já, geralmente, maior em animais alimentados com dieta contendo alta proporção de volumosos (BAUMAN *et alii*, 1971; HODGSON & THOMAS, 1972).

O aumento da taxa de diluição da fase líquida do rúmen afeta os microorganismos ruminais e suas atividades, a degradação dos constituintes das dietas e o "status" metabólico e nutricional do animal (HODGSON & THO-

MAS, 1972; HARRISON *et alii*, 1975). Conforme HOOVER *et alii* (1984), em pH 6,5 (próximo à média de 6,92, obtida entre os animais, nesta pesquisa), o aumento na taxa de diluição da fase líquida do rúmen promover aumentos tanto na digestão de proteína, como no crescimento microbiano e na sua eficiência. No entanto, segundo HODGSON & THOMAS (1972) e HARRISON *et alii* (1975), as taxas de diluição verificadas, em cada animal, comendo uma mesma dieta, nem sempre são si milares e parece que são modificadas pelas características individuais dos mesmos e pelo tipo de dieta fornecido. O acréscimo, via saliva, de sais minerais ao ambiente ruminal, aumenta a taxa de diluição, somente, nos animais que, normalmente, tinham taxas baixas de diluição (HARRISON *et alii*, 1975). Assim, nesta pesquisa, a saliva, provavelmente, só deve ter melhorado a taxa de diluição do animal 4 e muito pouco a do animal 1, face aos teores menores por ele apresentados sempre.

Com base nestas observações, ao que tudo indica, a vaca 4 foi a que evidenciou maior diferença no padrão de fermentação ruminal, comparativamente, às vacas 1, 2 e 3. Isto, provavelmente, foi influenciado pelo comportamento nervoso frente à coleta de fluido ruminal, bem como pelo consumo, exageradamente, rápido (3,3 horas) dos 22,09 kg de ração que constituíam a refeição diária de cada animal.

Observando-se o Quadro 25 e Gráfico 19, registra-se a interação significativa ($P < 0,01$) entre tempo e animal, verificada apenas para o parâmetro ácido propiônico, comprovando a existência de diferenças dentro e entre animais.

Analisando a vaca 1, registraram-se os teores de ácido propiônico: 12,33; 14,30; 14,14; 13,81; 13,07; 16,80; 15,82; 12,78 e 8,42 mM, correspondentes, respectivamente, aos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação. Evidencia-se a ocorrência de diferen-

ças significativas ($P < 0,01$) apenas entre o menor valor (8,42 mM), verificado no horário 24 horas e os maiores teores, correspondentes aos tempos 1, 2, 8 e 12 horas (respectivamente, 14,30; 14,14; 16,80 e 15,82 mM) que, por sua vez, são iguais ($P > 0,01$) entre si.

Para o bovino 2, no Quadro e Gráfico acima referidos, constam os seguintes teores de ácido propiônico: 10,54; 15,48; 14,59; 14,47; 16,82; 17,80; 15,16; 12,39 e 9,73 mM, respectivamente, correspondentes a 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas pós-administração da dieta. Verifica-se que o menor teor (9,73 mM), observado às 24 horas após a alimentação, apenas diferiu, estatisticamente ($P < 0,01$), dos teores registrados, nos tempos 1, 6 e 8 horas (respectivamente, 15,48; 16,82 e 17,80 mM, iguais entre si). Por outro lado, o segundo menor valor (0 horas = 10,54 mM) foi diferente ($P < 0,01$) apenas das concentrações relativas aos horários 6 e 8 horas. Não ocorreu diferença, estatisticamente, significativa ($P > 0,01$) entre os demais contrastes.

Considerando o bovino 3, foram registrados as seguintes concentrações de ácido propiônico: 9,57; 14,77; 16,82; 19,28; 18,81; 17,76; 16,09; 13,37 e 9,73 mM, respectivamente, verificadas, nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após a alimentação. Os teores registrados às 0 e 24 horas (respectivamente, 9,57 e 9,73 mM, iguais entre si) foram menores ($P < 0,01$) do que os níveis correspondentes aos demais tempos, excetuando-se aqueles dos tempos 1 hora (14,77 mM) e 16 horas (13,37 mM). A concentração registrada no horário 4 horas é, estatisticamente, igual ($P > 0,01$) aos teores verificados 1, 2, 6, 8 e 12 horas, mas é maior ($P < 0,01$) que os observados nos demais horários. O teor observado no tempo 16 horas é, estatisticamente, igual aos níveis observados nos demais horários, excetuando-se o tempo 4 horas. Nos demais horários, as concentrações foram semelhantes ($P > 0,01$) entre si (16,82; 19,28; 18,81; 17,76 e 16,09 mM, correspondentes a 2, 4, 6, 8 e 12 horas pós-alimentação).

Com relação à vaca 4, os teores de ácido propiônico foram: 9,07; 16,97; 18,29; 20,70; 18,57; 17,83; 15,30; 12,66 e 9,86 mM, constatados, respectivamente, nos horários 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas após o fornecimento de alimento. Pelo exame do Quadro e Gráfico acima citados, registra-se que não ocorreram diferenças, estatisticamente, significativas ($P > 0,01$) entre os níveis de ácido propiônico verificados nos horários 1 hora (16,97 mM); 2 horas (18,29 mM); 4 horas (20,70 mM); 6 horas (18,57 mM); 8 horas (17,82 mM) e 12 horas (15,30 mM) após a alimentação. Por outro lado, estes valores foram superiores ($P < 0,01$) ao nível verificado no tempo 0 hora (9,07 mM) que, por sua vez, foi igual ($P > 0,01$) àqueles registrados nos horários 16 e 24 horas (respectivamente, 12,66 e 9,86 mM, iguais entre si). As concentrações de ácido propiônico registradas nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 horas superaram, estatisticamente ($P < 0,01$), o teor registrado às 24 horas. Por último, os níveis de ácido propiônico, correspondentes aos tempos 1, 2, 8 e 12 horas, foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$) aos observados no horário 16 horas após a alimentação, ao mesmo tempo em que os teores verificados às 12, 16 e 24 horas também foram, estatisticamente, iguais ($P > 0,01$) entre si.

Considerando as diferenças entre vacas nos horários de amostragem do fluido ruminal, observa-se, pelo exame dos já referidos Quadro 25 e Gráfico 19, que as diferenças ocorreram apenas nos tempos 4 e 6 horas após a alimentação.

No tempo 4 horas, a vaca 1 apresentou menor ($P < 0,01$) teor de ácido propiônico (13,81 mM), em relação às vacas 3 e 4 (respectivamente, 19,28 e 20,70 mM, iguais entre si). A concentração de ácido propiônico mensurada no animal 2 (14,47 mM) foi, estatisticamente, igual ($P > 0,01$) à dos animais 1 e 3 e menor ($P < 0,01$) que a apresentada pelo animal 4.

Já, às 6 horas após a alimentação, evidenciava-se que a vaca 1 continuou apresentando menor ($P < 0,01$) teor de ácido propiônico (13,07 mM), em relação às vacas 3 e 4 (respectivamente, 18,81 e 18,57 mM, iguais entre si). No entanto, o bovino 2 registrou nível de ácido propiônico (16,82 mM), estatisticamente, igual ($P > 0,01$) aos observados para os bovinos 1, 3 e 4.

Portanto, através do estudo feito sobre a interação tempo x animal, pode-se evidenciar que todas as vacas apresentaram variação diuturna na concentração de ácido propiônico. No entanto, fazendo uma comparação entre os animais, é possível afirmar-se que a vaca 4 sobressaiu-se, dentre as demais, ao mostrar uma maior variação, no tempo, para os teores de ácido propiônico, seguida pelas vacas 2 e 3 e, cabendo a derradeira posição para a vaca 1.

Considerando as concentrações deste mesmo ácido, nos dois horários (4 e 6 horas) em que a interação animal x tempo foi significativa ($P < 0,01$), evidencia-se que a vaca 4 foi sempre igual à vaca 3, ambas mestiças holandesas, mas foi sempre diferente da vaca 1 e, às vezes, também diferente da vaca 2, ambas flamengas. Isto, provavelmente, dá uma indicação de que, apesar das diferenças individuais, alguns animais ainda mostram uma certa semelhança, no tocante ao padrão de fermentação ruminal.

A partir destas observações, deve-se recomendar cautela com inferências feitas para uma população, com base em estudos de ruminologia realizados com poucos animais porque os resultados desta pesquisa mostram com veemência que os dados obtidos estão sujeitos a uma grande variação, determinada, sobretudo, pelas diferenças individuais, visto que a parcela experimental é o animal como um todo e não apenas o rúmen adulto.

6. CONCLUSÕES

A análise dos dados experimentais descritos nesta pesquisa permitiu que se tirassem as seguintes conclusões:

1. Os parâmetros pH, N-NH₃ e AGV são influenciados, diretamente, pelo método de coleta do fluido ruminal empregado, tendo-se em vista o efeito da saliva, alterando o tamponamento do ambiente do rúmen, no momento da amostragem processada via sonda esofagiana.

2. As amostras obtidas via sonda esofagiana apresentaram valor médio de pH maior, teor médio de N-NH₃ menor e concentrações médias de AGV totais e individuais menores do que os correspondentes valores mensurados em amostras colhidas através de fístula ruminal.

3. Em todos os horários de coleta, as amostras obtidas por sonda esofagiana apresentaram valores de pH superiores e níveis de AGV totais inferiores, devido, em ambos os casos, à grande interferência da saliva, nas amostras coletadas por este método.

4. Por permitir a obtenção de uma amostra mais representativa do conteúdo do rúmen, é aconselhável optar-se pelo método de coleta por fístula ruminal, pois assim, os valores resultantes da mensuração dos parâmetros de fermentação serão mais reais, em termos de magnitude.

5. O método de coleta por sonda esofagiana deve ser utilizado, quando se tem interesse apenas em dar uma indicação de como se comportaram as dietas, com respeito ao padrão de fermentação ruminal por elas apresentado, sem a preocupação de se retratar, com fidedignidade, a magnitude dos parâmetros de fermentação mensurados.

6. A dieta contendo levedura de fermentação alcoólica foi superior, em termos de padrão de fermentação ruminal apresentado, uma vez que, a par de mostrar níveis semelhantes de N-NH₃, AGV totais, ácido acético e ácido isovalérico, evidenciou concentrações maiores dos ácidos propiônico, n-butírico e n-valérico, em relação à dieta com farelo de algodão.

7. A dieta com levedura de fermentação alcoólica apresentou, comparativamente à dieta com farelo de algodão, um padrão de fermentação ruminal caracterizado por uma queda mais rápida de pH (1 a 2 horas após o fornecimento de alimento) e de N-NH₃ (2 a 4 horas após a alimentação).

8. A dieta com farelo de algodão, bem como a com a levedura de fermentação alcoólica, não apresentaram variações diuturnas, nas concentrações dos AGV totais e ácido acético, com tendência, no entanto, em se registrarem os respectivos picos 1 a 2 horas após a alimentação.

9. Relativamente aos ácidos propiônico, n-butírico, isovalérico e n-valérico, a dieta contendo farelo de algodão apresentou uma certa similariedade nas tendências, uma vez que as correspondentes concentrações máximas ocorreram sempre 4 horas após o seu fornecimento.

10. A dieta com levedura registrou concentrações iguais, para o ácido isovalérico, em todos os tempos de amostragem e, quanto aos ácidos propiônico, n-butírico

e n-valérico só foi apresentar os correspondentes níveis maiores 8 horas após o seu fornecimento, portanto, mais tardiamente do que a dieta com farelo de algodão.

11. Ambas as dietas experimentais apresentaram boa disponibilidade de N-NH₃ e de AGV, para os microorganismos ruminais.

12. Para as duas dietas experimentais, considerando-se os animais empregados, pode-se evidenciar que os tempos de amostragem até 10-12 horas após a alimentação foram aqueles em que se detectaram diferenças estatisticamente significativas, para os parâmetros de fermentação analisados.

13. Os tempos de amostragem de 2 a 4 horas após o fornecimento de alimento, comumente utilizados, não representaram bem as tendências prevalentes no rúmen, nem mostraram a atividade ruminal decorrente da atuação máxima dos microorganismos. Assim sendo, para dietas semelhantes às empregadas nesta pesquisa é necessário a extensão dos tempos de coleta de fluido ruminal para até 10 a 12 horas após a alimentação.

14. Houve diferença entre vacas frente ao "stress" imposto pela coleta do fluido ruminal, sobretudo, via sonda esofagiana, como também quanto à velocidade de ingestão das dietas.

15. Em ruminologia, é aconselhável, sempre que possível, a utilização de um grande número de repetições porque as diferenças individuais promoveram variações consistentes nos dados coletados, visto que a parcela experimental é o animal e não apenas o rúmen adulto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRAR, M. & SCHINGOETHE, D.J. Heat-treated soybean meal as protein supplement for lactating cows. J. Dairy Sci., Champaign, 62(6):932-40, 1979.

ALLEN, C.K. Ammonium salts of organic acids as sources of crude protein for feed lot cattle. East Lansing, 1972. 118p. (Ph.D. - Michigan State University).

ANNISON, E.F. & LEWIS, D. El Metabolismo en el Rumen. México, Union Tipografica Editorial Hispano Americana, 1966. 200p.

ANNISON, E.F.; CHALMERS, M.I.; MARSHALL, S.B.M.; SYNGER, R.L.M. Ruminal ammonia formation in relation to the protein requirements of sheep. III. Ruminal ammonia formation with various diets. J. agric. Sci., Cambridge, 44(3):270-3, 1954.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12 ed. Washington, 1975. 1015p.

BALCH, D.A. & ROWLAND, S.J. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of dairy cows receiving a variety of diets. Br. J. Nutr., Cambridge, 11(3):288-98, 1957.

BARNEY, D.J.; GRIEVE, D.G.; MACLEOD, G.K.; YOUNG, L.G. Response of cows to a reduction in dietary crude protein. J. Dairy Sci., Champaign, 64(1):25-33, 1981.

BATH, I.H. & ROOK, J.A.F. The evaluation of cattle foods and diets in terms of the ruminal concentration of volatile fatty acids. I. The effects of level of intake, frequency of feeding, the ratio of hay concentrates in the diet, and of supplementary feeds. J. agric. Sci., Cambridge, 61(3):341-8, 1963.

BATH, I.H. & ROOK, J.A.F. The evaluation of cattle foods and diets in terms of the ruminal concentrations of volatile fatty acids. II. Roughages and succulents. J. agric. Sci., Cambridge, 64(1):67-75, 1965.

BAUMAN, D.E.; DAVIS, C.L.; FROBISH, R.A.; SACHAN, D.S. Evaluation of polyethylene glycol method in determining rumen fluid volume in dairy cows fed different diets. J. Dairy Sci., Champaign, 54(6):928-30, 1971.

BAILEY, C.B. & BALCH, C.C. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. Br. J. Nutr., Cambridge, 15(7):383-402, 1961.

BEEVER, D.E.; THOMSON, D.J.; PFEFFER, E.; ARMSTRONG, D.G. The effect of drying and ensiling grass on its digestion by sheep. Sites of energy and carbohydrate digestion. Br. J. Nutr., Cambridge, 26(2):123-34, 1971.

BLOOMFIELD, R.A.; KEARLEY, E.O.; CREACH, D.O.; MUHRER, M. E. Ruminal pH and absorption of ammonia and VFA. J. Anim. Sci., Albany, 22(3):833, 1963.

BRIGGS, P.K.; HOGAN, J.P.; REID, R.L. The effect of volatile fatty acids, lactic acid and ammonia on rumen pH in sheep. Aust. J. agric. Res., Melbourne, 8(6):674-90, 1957.

- BRYANT, A.M. Variations in the pH and volatile fatty acid concentration within the bovine reticulo-rumen. N.Z.J. agric. Res., Wellington, 7(4):694-706, 1964.
- BRYANT, M.P. & ROBINSON, I.M. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. J. Bact., Baltimore, 84(4):605-14, 1962.
- BUCHANAN-SMITH, J.G. & YAO, Y.T. Non-protein nitrogen in corn silage: a partial characterization in the rumen and effect upon digestibility and retention of nitrogen in lambs. Can. J. Anim. Sci., Ottawa, 58(4):681 - 90, 1978.
- CAMPBELL, C.M.; ENG Jr., K.S.; NELSON, A.B.; POPE, L.S. Use of the esophageal fistula in diet sampling with beef cattle. J. Anim. Sci., Albany, 27(1):231-3, 1968.
- CASTLE, M.E. & WATSON, J.N. Effect of level of protein in silage on the intake and production of dairy cows. J. Br. Grassld. Soc., Aberystwyth, 24(3):187-94, 1969.
- CASTLE, M.E. & WATSON, J.N. Silage and milk production; a comparison between grass silages made with and without formic acid. J. Br. Grassld. Soc., Alberystwyth, 25(1):65-70, 1970.
- CHALMERS, M.I. Protein synthesis in the rumen. In: Digestive Physiology and Nutrition of the Ruminant. London, Butterworths, 1961. p.205-25.
- CHENG, K.J. & HIRONAKA, R. Influence of feed particle size on pH, carbohydrate content, and viscosity of rumen fluid. Can. J. Anim. Sci., Albany, 53(3):412 - 22, 1973.

CHURCH, D.C. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. Vol. 1 - Digestive Physiology. 3ed. Oxford Press Inc., 1979. 350p.

CLARK, R. & WEISS, K.E. Reflex salivation in sheep and goat initiated by mechanical stimulation of the cardiac area of forestomach. J.S. Afr. vet. med. Ass., Johannesburg, 23(4):163-5, 1952.

COMLINE, R.S. & KAY, R.N.B. Reflex secretion by parotid gland of sheep. J. Physiol., Cambridge, 129(3):55p-6p, 1955.

DAVIS, G.V. & STALLCUP, O.T. Effect of soybean meal, raw soybeans, corn gluten feed, and urea on the concentration of rumen fluid components at intervals after feeding. J. Dairy Sci., Champaign, 50(10):1638-44, 1967.

DAVISON, M.E. The effect of varying the roughage to concentrate ratio on production of volatile fatty acids in the bovine rumen with observations on the effect of location of sampling site. Diss. Abstr., Ann Arbor, 26:4925, 1965.

DECKER, P.; GÄRTNER, K.; KÖRNICKE, H.; HILL, H. Fortlaufende messung von harnstoffbildung und harnstoffrückfluss in den pansen in abhängigkeit von harnffluss mit hilfe von ¹⁴C-harnstoff bei zeigen. Pflügers Arch. ges. Physiol., Bonn, 274(2):289-94, 1961.

DE FARIA, V.P. Efeito de níveis de energia e de proteína sobre a fermentação no rúmen, a digestibilidade de princípios nutritivos e o desaparecimento de matéria seca de forragem na fermentação "in vitro" e em sacos suspensos no rúmen. Piracicaba, 1982. 137p. (Livre Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- DIRKSEN, G. & SEIDEL, W. Experiences with the sampling of rumen fluid in cattle with special reference to use of the digestible stomach tube. Tierärztl. Umsch., Konstantz, 30(8):370-3, 1975.
- EL-SHAZLY, K. Degradation of protein in the rumen of the sheep. 1. Some volatile fatty acids, including branched-chain isomers, found in vivo. Biochem. J., Cambridge, 51(5):640-53, 1952
- ERFLE, J.D.; BOILA, R.J.; TEATHER, R.M.; MAHADEVAN, S.; SAUER, F.D. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. J. Dairy Sci., Champaign, 65(8):1457-64, 1982.
- ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci., Champaign, 44(9):1768-71, 1961.
- ESDALE, W.J. & SATTER, L.D. Manipulation of ruminal fermentation. IV. Effect of altering ruminal pH on volatile fatty acid production. J. Dairy Sci., Champaign, 55(7):964-70, 1972.
- FOLDAGER, J. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. East Lansing, 1977. (Ph.D. - Michigan State University).
- GOERING, H.K. & VAN SOEST, P.J. Forage Fiber Analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Agric. Handb. Forest Serv. U.S., Washington, (379):1-20, 1970.
- GRAY, F.V. The absorption of volatile fatty acids from the rumen. II. The influence of pH absorption. J. exp. Biol., Cambridge, 25:135, 1948.

GRAY, F.V. & PILGRIM, A.F. Fermentation in the rumen of sheep. II. The production and absorption of volatile fatty acids during fermentation of wheaten hay and lucern hay in the rumen. J. exp. Biol., Cambridge, 28: 83, 1951.

GRIFFITHS, T.W. & BATH, I.H. Effects of energy and nitrogen supplementation of silage diets on rumen fermentation in fistulated heifers. J. agric. Sci., Cambridge, 80(1):89-95, 1973.

GRIFFITHS, T.H.; SPILLANE, T.A.; BATH, I.H. Studies on the nutritive value of silage with particular reference to the effects of energy and nitrogen supplementation in growing heifers. J. agric. Sci., Cambridge, 80(1): 75-88, 1973.

HALE, E.B.; DUNCAN, C.W.; HUFFMAN, C.F. Rumen digestion studies. II. Studies in the chemistry of rumen digestion. J. Nutr., Bethesda, 34(6):747-58, 1947.

HARRISON, D.G.; BEEVER, D.E.; THOMSON, D.J.; OSBOURN, D. F. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing rate of flow of water from the rumen. J. agric. Sci., Cambridge, 85(1):93-101, 1975.

HARROP, C.J.F. & PHILLIPSON, A.T. Nitrogen metabolism in the ovine stomach. 1. The transfer of urea from the blood to the rumen. J. agric. Sci., Cambridge, 82(3): 399-408, 1974.

HEAD, M.J. Protein utilization by the dairy cows. Proc. Nutr. Soc., London, 18(2):108-12, 1959.

HEAD, M.J. & MURDOCH, J.C. The influence of supplements of flaked maize on the digestibility by steers of silage, fresh lucerne and hay. J. Br. Grassld. Soc., Aberystwyth, 20(2):106-9, 1965.

HOBSON, P.N. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. J. gen. Microbiol., London, 38(2):167-80, 1965.

HOBSON, P.N. Physiological characteristics of rumen microbes and relation to diet and fermentation patterns. Proc. Nutr. Soc., London, 31(2):135-9, 1972.

HODGSON, J.C. & THOMAS, P.C. A relationship between the molar proportion of propionic acid and the clearance rate of the liquid phase in the rumen of the sheep. Br. J. Nutr., Cambridge, 33(3):447-56, 1975.

HODGSON, J.C. & THOMAS, P.C. The chemical composition and dilution rate of rumen fluid in sheep receiving a diet of barley, hay and flaked maize. Proc. Nutr. Soc., London, 31(2):57A-8A, 1972.

HOFIREK, B.A. Simple method for collecting of the rumen liquor of cattle for diagnostic purpose. Vet. Med., Praha, 15(3):75-85, 1970.

HOOVER, W.H.; KINCAID, C.R.; VARGA, G.A.; THAYNE, W.V.; JUNKINS, Jr., L.L. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. J. Anim. Sci., Albany, 58(3):692-9, 1984.

HUGHES, A.D. The non-protein nitrogen composition of grass silages. II. The changes occurring during the storage of silage. J. agric. Sci., Cambridge, 75(3):421 - 31, 1970.

HUNGATE, R.E. The Rumen and its Microbes. New York, Academic Press, 1966. 533p.

JARRIGE, R. Principles de la Nutrition et de l'alimentation des Ruminantes. Institute National de la Recherche Agronomic, Versailles, 1978.

JOHNSON, V.W. & SUTTON, J.D. The continuous recording of the pH in the bovine rumen. Br. J. Nutr., Cambridge, 22(2):303-6, 1968.

KAUFMAN, W. Influence of composition of the ration and the feeding frequency on pH regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. Livest. Prod. Sci., Amsterdam, 3(2):103-14, 1976.

KAY, R.N.B. The effect of sympathetic stimulation on the flow of parotid saliva in the sheep. J. Physiol., Cambridge, 125(1):24p-5p, 1954.

KAY, R.N.B. The action of adrenaline on the flow of parotid saliva in sheep. J. Physiol., Cambridge, 130(2):15p-6p, 1955.

KISTNER, A. Possible factors influencing the balance of different species of cellulolytic bacteria in the rumen. In: DOUGHERTY, R.W.; ALLEN, R.S.; BURROUGHS, W.; JACOBSON, N.L.; Mc GILLIARD, A.D. Physiology of Digestion in the Ruminant. Washington, Butterworths, 1962. session VII, p.419-32.

KOLB, E. Fisiologia Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S/A, 1984. 612p.

KULASEK, G. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. Pol. Arch. Wet., Warsaw, 15(4):801-10, 1972.

LANE, G.T.; CUMMINGS, K.R.; NOLLER, C.H.; COLENBRANDER, V. F. A continuous flow device for obtaining ruminanticular pH values and fluid samples. J. Anim. Sci., Albany, 25(4):1256, 1966.

LANE, G.T.; NOLLER, C.H.; COLENBRANDER, V.F.; CUMMINGS, K.R.; HARRINGTON, R.B. Apparatus for obtaining rumino reticular samples and the effect of sampling location on pH and volatile fatty acids. J. Dairy Sci., Champaign, 51(1):114-6, 1968.

LENG, R.A. Salient Features of the Digestion of Pastures by Ruminant and Other Herbivore. Chemistry and Biochemistry of Herbage. (Vol. 3). New York, Academic Press, 1973.

LEWIS, D. & McDONALD, I.W. The interrelationships of individual proteins and carbohydrates during fermentation in the rumen of the sheep. 1. The fermentation of casein in the presence of starch or other carbohydrate materials. J. agric. Sci., Cambridge, 51(1):108 - 18, 1958.

LUDRI, R.S. & RAZDAN, M.N. Effect of variable amount of dietary nitrogen on pH, VFA and total and particulate nitrogen in the rumen of cows and buffaloes. Indian J. Dairy Sci., New Delhi, 34(3):272-7, 1981.

MACHADO, P.F. Valor nutritivo da levedura, resíduo da produção de álcool, para vacas em lactação. São Paulo, 1983. 110p. (Doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP).

MAHADEVAN, S.; SAUER, F.D.; ERFLE, J.D.; TEATHER, R.M.; MORSE, P.M. Changes in ammonia concentration, bacterial counts, pH and volatile fatty acid concentration in rumen of cows fed alfalfa hay or concentrate: urea-corn silage. Can. J. Anim. Sci., Ottawa, 62(1):249-58, 1982.

Mc CULLOUGH, M.E. & SMART Jr., W.W.G. Rumen fermentation and in vivo and in vitro digestibility of all in one dairy rations. J. Dairy Sci., Champaign, 53(11):1560 - 7, 1970.

- Mc DONALD, I.W. The role of ammonia in ruminal digestion of protein. Biochem. J., Cambridge, 51(1):86-90, 1952.
- Mc NAUGHT, M.L.; OWEN, E.C.; HENRY, K.M.; KON, S.K. The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 8. The nutritive value of the protein of preparations of dried rumen bacteria, rumen protozoa and brewer's yeast for rats. Biochem. J., Cambridge, 56(1) : 151-6, 1954.
- Mc NAUGHT, M.L.; SMITH, J.A.B.; HENRY, K.M.; KON, S.K. The utilization of non protein nitrogen in the bovine rumen. 5. The isolation and nutritive value of a preparation of dried rumen bacteria. Biochem. J., Cambridge, 46(1):32-6, 1950.
- MOIR, R.J. & SOMERS, M. Ruminal flora studies. VIII. The influence of rate and method of feeding a ration upon its digestibility upon ruminal function and upon the ruminal population. Aust. J. agric. Res., Melbourne, 8(3):253-65, 1957.
- MÜLLER, R. & KIRCHNER, I. [Urea metabolism in rumen fluid studied in vitro. 1. Effect of method of study of ureolysis.] Nutr. Abst. Rev., Aberdeen, 41(3):961, 1971.
- MÜLLER, R. & KIRCHNER, I. [Urea metabolism in rumen fluid studied in vitro. 3. Liberation of urea from feeds in rumen fluid.] Nutr. Abstr. Rev., Aberdeen, 42(2):514, 1972.
- MUNRO, H.N. Technical aspects of the study of protein metabolism. A general survey of techniques used in studying protein metabolism in whole animals and intact cells. In: MUNRO, H.N. & ALLISON, J.B. Mammalian Protein Metabolism, New York, Academic Press, 1964. Part. V, p.235-62.

- NOLAN, J.V.; NORTON, B.W.; LENG, R.A. Nitrogen cycling in sheep. Proc. Nutr. Soc., London, 32(2):93-8, 1973.
- ORSKOV, E.R.; FLATT, W.P.; MOE, P.W. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. J. Dairy Sci., Champaign, 51(9):1429-35, 1968.
- ORTOLANI, E.L. Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH. Arq. Esc. vet. Univ. Minas Gerais, Belo Horizonte, 33(2):269-75, 1981.
- PANDE, M.B. & SHUKLA, P.C. Effect of feeding digestible crude protein levels and urea of rumen liquor nitrogen fractions and volatile fatty acids. Indian vet. J., Madras, 58(11):894-900, 1981.
- PUTNAM, P.A.; LEHMANN, R.; DAVIS, R.E. Feed intake and salivary secretion by steers. J. Anim. Sci., Albany, 25(3):817-20, 1966.
- PUTNAM, P.A.; OLTJEN, R.R.; WILLIAMS Jr., E. Type of fistulation and ruminal pH and VFA in steers. J. Anim. Sci., Albany, 28(6):876, 1969.
- PROKOP, M.J.; WOODS, W.; KOPPFENSTEIN, T.J. Factors affecting ruminal urease activity. J. Anim. Sci., Albany, 33(5):1169, 1971.
- RAUN, N.S. & BURROUGHS, W. Suction strainer technique in obtaining rumen fluid samples from intact lambs. J. Anim. Sci., Albany, 21(3):454-7, 1962.
- REIS, P.J. & REID, R.L. In vitro studies on the effect of pH and of glucose on ammonia accumulation in the rumen of sheep. Aust. J. agric. Res., Melbourne, 10(1):71-80, 1959.

- RHODES, R.W. Influence of nutrient addition, physical form of the ration and interval of feeding on performance of lambs. Ames. 1961. (Ph.D. - Iowa State University of Science and Technology).
- RHODES, R.W. & WOODS, W. Volatile fatty acid measurements on the rumen contents of lambs fed ration of various physical forms. J. Anim. Sci., Albany, 21(3):483-8, 1962.
- ROFLER, R.E. & SATTER, L.D. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. 1. Development of a model for predicting non-protein nitrogen utilization by cattle. J. Dairy Sci., Champaign, 58(12):1880-8, 1975.
- RUMSEY, T.S.; PUTNAM, P.A.; BOND, J.; OLTJEN, R.R. Influence of level and type of diet on ruminal pH and VFA, respiratory rate and EKG patterns of steers. J. Anim. Sci., Albany, 31(3):608-16, 1970.
- RUSSEL, J.B. & DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth of pure cultures rumen bacteria in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 39(3):604-10, 1980.
- SATTER, L.D. & SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Br. J. Nutr., Cambridge, 32(2):199-208, 1974.
- SATTER, L.D.; SUTTIE, J.W.; BAUMGARDT, B.R. Dietary induced changes in volatile fatty acid formation from a-cellulose-C¹⁴ and hemicellulose-C¹⁴. J. Dairy Sci., Champaign, 47(12):1365-70, 1964.
- SCHAADT Jr., H. & JOHNSON, R.R. VFA production in the rumen of sheep fed limestone and urea treated corn silage. J. Anim. Sci., Albany, 29(5):839-47, 1969.

- SINGH, N. & SUD, S.C. Effect of different diets on pH and protein fractions in the rumen of buffaloes. Indian J. Dairy Sci., New Delhi, 34(3):284-7, 1981.
- SLYTER, L.L. Monensin and dichloroacetamide influences on methane and volatile fatty acid production by rumen bacteria in vitro. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 37(2):283-8, 1979.
- SLYTER, L.L.; BRYANT, M.P.; WOLIN, M.J. Effect of pH on population and fermentation in a continuously cultured rumen ecosystem. Appl. Microbiol., Washington, 14(4):573-8, 1966.
- SLYTER, L.L.; MOSI, A.K.; WARD, G.M. Wood pulp, urea, acid growth factors and rumen microbe synthesis in vitro. J. Anim. Sci., Albany, 41(1):432, 1975.
- SLYTER, L.L.; SATTER, L.D.; DINIUS, D.A. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. J. Anim. Sci., 48(4):906-12, 1979.
- SMITH, R.H. Digestion and metabolism in the ruminant. Armidale, Australia, I.W. Mc Donald and A.C.I. Warner, eds. of New England Press, 1975. 400p.
- SMITH, V.R. In vivo studies of hydrogen ion concentrations in the rumen of the dairy cow. J. Dairy Sci., Champaign, 24(8):659-65, 1941.
- SMITH, P.H.; SWEENEY, H.C.; ROONEY, J.R.; KING, K.W.; MOORE, W.E. Stratifications and kinetic changes in the ingesta of the bovine rumen. J. Dairy Sci., Champaign, 39(5):598-609, 1956.

STANLEY, R.W.; KANJANIPIBUL, N.; MORITA, K.; ISHIZAKI, S. M. Effect of feeding buffered concentrate rations on the performance and metabolism of lactating dairy cattle in a subtropical environment. J. Dairy Sci., Champaign, 55(7):959-63, 1972.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and Procedures of Statistics. New York, Mc Grow-Hill, 1960. 481p.

STEWART, W.E.; STEWART, D.G.; SCHULTZ, L.H. Rates of volatile fatty acid production in the bovine rumen. J. Anim. Sci., Albany, 17(3):723-36, 1958.

TELLER, E.; GODEAU, J.M.; de BAERE, R. Influence du moment d'échantillonnage et de l'alimentation sur la composition du liquide du rumen. Revue Agric., Brussels, 30(4):979-89, 1977.

TREMER, A.W.; MERRILL, W.G.; LOOSLI, J.K. Adaptation to high concentrate feeding as related to acidosis and digestive disturbances in dairy heifers. J. Dairy Sci., Champaign, 51(7):1065-72, 1968.

WOHLT, J.E.; CLARK, J.H.; BLAISDELL, F.S. Effect of sampling location, time, and method of concentration of ammonia nitrogen in rumen fluid. J. Dairy Sci., Champaign, 59(3):459-64, 1976.