UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

KATHYA REGINA FIORAVANTI PADOVANI

Ureia de liberação controlada e a cinética da fermentação *in vitro* de *Brachiaria brizantha* cv.
Marandu em duas idades de rebrotação.

Pirassununga-SP
2014

KATHYA REGINA FIORAVANTI PADOVANI

Ureia de liberação controlada e a cinética da fermentação *in vitro* de *Brachiaria brizantha* cv.
Marandu em duas idades de rebrotação.

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo
como requisito para obtenção do título de mestre em
Zootecnia.

Área de Concentração Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdo Rodrigues Herling

Pirassununga-SP
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

P124u Padovani, Kathya Regina Fioravanti
 Ureia de liberação controlada e a cinética da
 fermentação *in vitro* de Brachiaria brizantha cv.
 Marandu em duas idades de rebrotação / Kathya Regina
 Fioravanti
 Padovani. -- Pirassununga, 2014.
 84 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Zootecnia.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
 Orientador: Prof. Dr. Valdo Rodrigues Herling.

 1. Ácidos graxos de cadeia curta 2. Braquiário
3. Degradação de fibra 4. Nitrogênio amoniacal
5. Produção de gases I.Título.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter despertado em mim a vontade de realizar...

Agradeço a todos amigos queridos e profissionais sem os quais este trabalho não seria iniciado, executado ou concluído:

Ao meu orientador Professor Dr. Valdo Herling por acreditar,

Aos profissionais e amigos Dr. Edmar Freitas, Dr. Marcio Bonin, Dr. Marcelo Manella, Dra. Andrea Malaguido, pelo incentivo e motivação,

Aos profissionais e amigos da FZEA-Zootecnia, alguns de muito tempo, outros recentes, todos porém, parte essencial desta história – Professores Dr. Ives Bueno, Dra. Catarina Gomide, Dr. César Lima ; aos Funcionários Marcos Ferraz, Priscila Maldonado, Raphael Corradini Jr, Roseli Lacerda, Rosilda Clarete Louira; aos estagiários Renata Ferigato, Natália, Bárbara Ramos, Diego do Vale; e aos colegas GEFEP Agrárias: Fábio, Gabriela, Jessica, Vanessa, Cesar, João, Seida e Damião;

Aos meus familiares, por me ajudarem e apoiarem de tantas formas: Osvaldir e Maria Aparecida, Marielen e Paulo Rogério, Heloise e Vladimir;

Às empresas CONNAN e ALLTECH, por viabilizarem a realização deste sonho;

Aos amigos do coração Andreza Quintino, Luis Henrique, Giorgio Souza e Evandro Moraes,

A vocês um super obrigada!

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que fazem minha vida especial:

Celso, Rita e Lia, meus pais e irmã, minha essência. Exemplos de força interior, superação e amor incondicional.

Aos meus filhos queridos, Giulia e Vinícius, presentes de Deus, amor maior, motivação e orgulho.

Ao amor da minha vida, Regi, cúmplice em minhas aventuras de viver, que me apoia, me conforta, me completa.

À minha querida vó Arlete (in memoriam) e tio Junior, por me mostrarem que ao abrir um livro, descobrimos um mundo cheio de possibilidades.

Epígrafe

“Somos resultado das viagens que fazemos, dos livros que lemos e das pessoas que amamos”

Airton Ortiz

Resumo

PADOVANI, K.R.F. **Ureia de liberação controlada e a cinética da fermentação *in vitro* de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em duas idades de rebrotação.** 2014. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2014.

Foi realizado no Laboratório de Ciências Agrárias da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, um bioensaio de fermentação *in vitro* para avaliar a inclusão de doses crescentes de ureia de liberação controlada (ULC) em lâminas foliares de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em duas idades de rebrotação. Amostras colhidas em duas idades de rebrotação (28 e 65 dias, S_{28} e S_{65} , respectivamente) foram incubadas em frascos com doses crescentes de ureia de liberação controlada (ULC – D_0 , D_5 , D_{10} e D_{20}), em três inóculos distintos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados fatorial 2×4 . Foram realizadas análise de regressão e comparação entre médias pelo teste Tukey 5%. Durante 96 horas de fermentação foram colhidas as informações de leitura da produção de gases (tempos 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h), concentração de $N-NH_3$ (tempos 6, 12, 24, 48 e 96 h), e AGCC no fluido ruminal (tempos 24 e 48 h), pH (tempo 0 e 96h) e desaparecimento da FDN e MO (tempos 24, 48 e 96 h). Foram calculadas e analisadas as variáveis matemáticas geradas a partir do modelo exponencial indicando tempo de colonização (L), assíntota da curva de produção de gases (A), taxa de fermentação (μ), relação entre os tempos 48 e 96 h (R_1), relação entre o tempo 96 h e Assíntota A (R_2), $t_{1/2}$ da curva de produção de gases, Fatos de Partição MOD e AGCCtot com a produção acumulada de gases. Não foi observado efeito de doses sobre a produção total ou fracionada de AGCC em 24 e 48 horas de fermentação. Houve efeito de substrato para a síntese de AGVCR – valerato, isovalerato e outros, sendo maiores para o substrato S_{28} , em 24 e 48 horas, indicando maior fermentação proteica. Em 24 horas, frascos contendo substrato S_{28} mantiveram níveis mais baixos de $N-NH_3$ no fluido ruminal que aqueles contendo substrato S_{65} para doses 0, 5 e 10. Em 48 horas, as concentrações de $N-NH_3$ indicam que a fermentação do substrato S_{65} foi mais eficiente na utilização de $N-NH_3$, com concentrações significativamente inferiores de $N-NH_3$ no fluido. O pH encontrado ao final da incubação indica adequação do processo fermentativo favorecendo microrganismos celulolíticos no fluido ruminal. Em relação à cinética fermentativa, S_{28} apresentou menor tempo

de colonização, menor potencial de produção de gases e maiores taxas de fermentação (μ) em todos os tempos estudados. DIVMO e DIVFDN apresentaram efeito cúbico de doses para o substrato S_{28} durante as 24 horas de incubação. Embora o substrato S_{65} tenha apresentado taxa fermentativa mais lenta e apresentado menor degradação de MO e FDN nos períodos de 24, 48 e 96 horas, foi mais eficiente quando avaliado quanto ao Fator de Partição. Em conclusão, o fornecimento de Ureia de Liberação Controlada em lâminas foliares de capim-marandu foi mais eficiente na redução de $N-NH_3$ em substratos com 65 dias de idade de rebrotação entre 24 e 48 horas de fermentação, que pode indicar maior conversão em proteína microbiana.

Palavras chave: ácidos graxos de cadeia curta, braquiário, degradação da fibra, nitrogênio amoniacal, produção de gases.

Abstract

PADOVANI , K.R.F. **Slow-release urea and the kinetics of *in vitro* fermentation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu in two regrowth ages.** 2014. 78p. Thesis (Master). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, University of São Paulo, Pirassununga, 2014.

Was conducted at the Laboratory of Agricultural Sciences , Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, a *in vitro* fermentation bioassay to assess the inclusion of increasing doses of urea slow-release (USR) in leaf blades of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu in two regrowth ages. Samples collected in two regrowth ages (28 and 65 days, S₂₈ and S₆₅, respectively) were incubated with increasing doses of slow-release urea (USR - D₀ , D₅ , D₁₀ and D₂₀) , in three different inocula . The experimental design was a randomized block factorial 2 x 4. Regression analysis and comparison of means by Tukey test 5 % were performed . During 96 hours of fermentation were reading information by gas production (4, 8 ,12, 18, 24 ,30, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 h) , concentration of NH₃-N (6, 12, 24, 48 and 96 h) , and SCFA in ruminal fluid (24 and 48h) , pH (time 0 and 96 h) and disappearance of NDF and OM (24 , 48 and 96 h) . Were calculated and analyzed the mathematical variables generated from the exponential model indicating colonization time (L) , asymptote of gas production (A) , fermentation rate (μ) , relationship between times 48 and 96 h (R^1) , relationship between time 96 and asymptote A (R^2) , t_{1/2} of the gas production curve , Factors of Partition from MOD , FDNcD and AGCCtot with the total gas production . No dose effect was observed on total production of SCFA and fractionated at 24 and 48 hours of fermentation . An effect of substrate for the synthesis of AGVCR - valerate , isovalerate and others being higher for substrate S₂₈ , 24 and 48 hours , indicating higher protein fermentation. In 24 hours , flasks containing substrate S₂₈ maintained lower levels of NH₃-N in rumen fluid than those containing substrate S₆₅ for doses 0 , 5 and 10 . Within 48 hours, the concentrations of NH₃-N indicate that fermentation substrate S₆₅ was in more efficient use of NH₃-N , with significantly lower concentrations of NH₃-N in the fluid. The pH found at the end of the incubation indicates suitability of the fermentation process favoring cellulolytic microorganisms. Regarding the fermentation kinetics, S₂₈ showed lower colonization time , less potential for gas production and higher fermentation rates (μ) at all time points . DIVMO DIVFDN and had a cubic effect doses for the substrate S₂₈ at 24 hours of incubation. Although the substrate S₆₅ has shown slower fermentation rate , and showed less degradation of OM and NDF in periods of 24 , 48 and 96 hours , was more efficient when assessed for Factor Partition . On 24 and 48 hours of incubation was more efficient in the degradation of OM and NDF . At 96 hours remained greater efficiency for degradation of NDF, however, no significant differences for the degradation of MO . In conclusion, the supply of urea slow-release in leaf blades of Marandu-grass was more effective in reducing NH₃-N substrates 65 days old regrowth between 24 and 48 hours of fermentation, which may indicate higher conversion protein microbial .

Keywords : short chain fatty acids , braquiarão , fiber degradation , ammonia , gas production

LISTA FIGURAS

FIGURA 1. DESAPARECIMENTO <i>IN SITU</i> DE FONTES DE NITROGÊNIO NÃO PROTEICO E FARELO DE SOJA (AKAY ET AL, 2004).	- 28 -
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RELAÇÃO ENTRE DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA E SÍNTESE PROTEICA NO FLUIDO RUMINAL <i>IN VITRO</i> . A = N-NH ₃ APÓS INOCULAÇÃO DO ALIMENTO SOZINHO; B = N-NH ₃ APÓS INCUBAÇÃO DO ALIMENTO COM AMIDO, C = PRODUÇÃO DE GÁS A PARTIR DO ALIMENTO SOZINHO, D = PRODUÇÃO DE GÁS A PARTIR DO ALIMENTO + AMIDO, EFG= N MICROBIANO ESPERADO COMO ORIGINADO DO N-NH ₃ , AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS, QUANDO O ALIMENTO É INCUBADO SOZINHO; H = N-NH ₃ ESPERADO EM AUSÊNCIA DE PRODUÇÃO DE GÁS. FONTE: RAAB ET AL. (1983).	- 34 -
FIGURA 3. PERFIL GRANULOMÉTRICO DA ULC (%)	- 54 -
FIGURA 4. REGRESSÃO QUADRÁTICA ENTRE PRESSÃO (PSI) E VOLUME DE GÁS (ML) PARA FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> EM 96 HORAS DE INCUBAÇÃO.	- 60 -
FIGURA 8. CURVA AJUSTADA DA PRODUÇÃO ACUMULADA DE GASES (ML.MO ⁻¹ _{INCUBADA}) DOS SUBSTRATOS S ₂₈ E S ₆₅ , COM DIFERENTES DOSES DE ULC, DURANTE 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES.	- 73 -
FIGURA 9. TAXAS DE FERMENTAÇÃO (M) DO MODELO DE FRANCE ET AL (1993), DE 96 HORAS DE INCUBAÇÃO SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES, PARA OS SUBSTRATOS S ₂₈ E S ₆₅ COM DIFERENTES DOSES DE ULC.....	- 74 -
FIGURA 10. TAXA MÉDIA AJUSTADA DE FERMENTAÇÃO (M) DO MODELO DE FRANCE ET AL (1993), EM 96 HORAS DE INCUBAÇÃO SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES, PARA OS SUBSTRATOS S ₂₈ E S ₆₅ COM DIFERENTES DOSES DE ULC.	- 74 -
FIGURA 11. EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE DOSES DE ULC E SUBSTRATOS SOBRE A DIVMO EM 24 HORAS DE FERMENTAÇÃO SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES (• S ₆₅ ; ▪ S ₂₈)	- 75 -
FIGURA 12. EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE DOSES DE ULC E SUBSTRATOS, SOBRE A DIVFDN EM 24 HORAS DE FERMENTAÇÃO SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES (• S ₆₅ ; ▪ S ₂₈)	- 76 -

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PERDAS DIÁRIAS DE PROTEÍNA EM ESPÉCIES TROPICAIS	- 19 -
TABELA 2. VIAS DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS NO RÚMEN	- 24 -
TABELA 3. RELAÇÃO DE PB (%MS) SUPLEMENTADA A PARTIR DA ULC	- 55 -
TABELA 4. COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE LÂMINA FOLIAR DE CAPIM-MARANDU AOS 28 E 65 DIAS (S_{28} E S_{65}) APÓS REBROTAÇÃO E DE UREIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA (ULC)	- 55 -
TABELA 5. SOLUÇÃO FINAL DO MEIO DE CULTURA UTILIZADO PARA A FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	- 57 -
TABELA 6. VALORES DE PH OBSERVADOS EM FLUIDO RUMINAL APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> ..	- 63 -
TABELA 7. CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE $N-NH_3$ ($MG.DL^{-1}$) NO LÍQUIDO RUMINAL EM 24 HORAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	- 65 -
TABELA 8. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO AJUSTADAS EM FUNÇÃO DE SUBSTRATOS E DOSES TESTADAS, E AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE $N-NH_3$ ($MG.DL^{-1}$) NO LÍQUIDO RUMINAL APÓS 48 HORAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	- 66 -
TABELA 9. EQUAÇÕES DE REGRESSÃO AJUSTADAS EM FUNÇÃO DE SUBSTRATOS E DOSES TESTADAS, E AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE $N-NH_3$ ($MG.DL^{-1}$) NO LÍQUIDO RUMINAL APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	- 67 -
TABELA 10. TEORES DE AGCC ENCONTRADOS NO FLUIDO RUMINAL APÓS 24 HORAS DE INCUBAÇÃO PELA TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> , E A RELAÇÃO DE EFICIÊNCIA REFERENTE A DEGRADABILIDADE DA MO	- 69 -
TABELA 11. TEORES DE AGCC ENCONTRADOS NO FLUIDO RUMINAL APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO PELA TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> , E A RELAÇÃO DE EFICIÊNCIA REFERENTE A DEGRADABILIDADE DA MO E DE FDN-70 -	
TABELA 12. PARÂMETROS DO MODELO DE FRANCE ET AL. (1993) APÓS 96 HORAS DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CAPIM-MARANDÚ EM DUAS IDADES DE REBROTAÇÃO , INCUBADOS COM DIFERENTES DOSES DE UREIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.	- 71 -
TABELA 13. DIVFDN E DIVMO DOS SUBSTRATOS S_{28} E S_{65} INCUBADOS COM DIFERENTES DOSES DE ULC, SOB A TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES.....	- 78 -

SUMARIO

Capítulo 1. Introdução.....	14 -
Capítulo 2. Revisão de literatura.....	18 -
2.1 <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	18 -
2.2 Efeito de idade e a morfologia em gramíneas tropicais	18 -
2.3 Utilização de carboidratos estruturais e nitrogênio por ruminantes	22 -
2.4 Fermentação <i>in vitro</i>	30 -
2.4.1 Produção acumulada de gases como indicador de fermentação ruminal	31 -
2.4.2 Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) no rúmen como indicador de síntese microbiana	33 -
2.4.3 Fator de partição como indicador da eficiência microbiana	35 -
2.4.4 AGCC como indicador da eficiência fermentativa.....	36 -
2.5 Referências bibliográficas.....	38 -
Capítulo 3. Ureia de liberação controlada na cinética de fermentação, síntese de AGCC e desaparecimento do substrato de capim- marandu de diferentes idades sob fermentação <i>in vitro</i> ..	49 -
3.1. Resumo	49 -
3.2. Abstract.....	50 -
3.3. Introdução.....	51 -
3.4. Material e métodos	53 -
3.4.1. Local	53 -
3.4.2. Substrato	53 -
3.4.3. Ureia de liberação controlada (ULC).....	54 -
3.4.4. Fermentação <i>in vitro</i>	55 -
3.4.5. Variáveis analisadas.....	57 -
3.4.6. Resultados e discussão	62 -
3.4.7. Conclusão e implicações	79 -
3.4.8. Revisão bibliográfica.....	80 -
Capítulo 4. Considerações finais	84 -

Capítulo 1. Introdução

No terceiro trimestre de 2013 a produção em equivalente-carcaça de bovinos alcançou novo recorde consecutivo, com a marca de 2,137 milhões de toneladas. Com o aumento de 11,4% referente ao mesmo período de 2012, o país atingiu novo recorde histórico, exportando, ainda, 326,5 toneladas de carne *in natura* (IBGE, 2013). Os dados divulgados confirmam a importância do Brasil no cenário mundial como maior rebanho comercial e maior exportador de carne bovina *in natura*.

A pecuária brasileira é sustentada principalmente pelo sistema de produção em pasto, sendo as forragens o principal componente e fonte de nutrientes da dieta. No entanto, as áreas com aptidão agrícola têm impulsionado o preço da terra, redefinindo as áreas destinadas à pastagens e a sua intensificação de uso pela pecuária (ANUALPEC, 2013).

Para promover incremento em produtividade neste sistema de criação, pode-se lançar mão de práticas de manejo que favoreçam a relação solo – planta forrageira – animal, e que aumentem a capacidade de suporte e a taxa de lotação da área produtiva, maximizando o fornecimento de nutrientes e o desempenho animal de acordo ao seu potencial genético. Pode-se, ainda, manipular diretamente a dieta dos animais suplementando-os com outros alimentos, e utilizando aditivos nutricionais que melhorem o aproveitamento dos nutrientes disponíveis no pasto.

Sabe-se que a alta incidência luminosa e de temperatura dos trópicos favorecem a síntese de tecidos vegetais, bem como interferem na complexação dos mesmos por compostos fenólicos. Desta forma, as plantas forrageiras tropicais apresentam maior produção de massa verde, maior produção de parede celular, no entanto maior lignificação destes tecidos.

A utilização da fibra detergente neutro (FDN) no trato gastrointestinal do ruminante é influenciada pelos demais componentes dietéticos e a variação na intensidade de sua utilização e eficiência como fonte energética da dieta dependem de como atuam os complexos enzimáticos dos microrganismos em sua degradação (ARROQUY; COHCRAN; NAGARAJA, 2005; SOUZA, 2007).

Considerando seu alto potencial como fonte energética, entender como explorar a FDN no sistema digestivo dos ruminantes implica otimizar os sistemas de produção animal nos trópicos (DETMAN; PAULINO; VALADARES FILHO, 2008).

Segundo Silveira et al. (2008), o fluxo de nutrientes no rúmen, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e proteína microbiana, sofre grande influência da microbiota ruminal, que por sua vez depende de fontes energéticas e proteicas fermentescíveis no rúmen para suas atividades metabólicas. Clark; Klusmeyer; Cameron (1992) indicam que a disponibilidade ruminal de energia e proteína são os fatores mais limitantes para o crescimento microbiano e para potencializar a fermentação e a síntese de proteína microbiana é necessário a sincronização da energia fermentável disponível e da proteína degradável no rúmen.

Apesar dos teores adequados de proteína bruta (PB) em forragens tropicais na época das chuvas, os ganhos de peso encontrados são inferiores aos observados em regiões de clima temperado. Uma das razões é que esta proteína tem alta solubilidade gera perdas de nitrogênio na forma de amônia e conseqüentemente, as exigências para ganhos elevados não seriam atendidas. A limitação no uso destes compostos seria devido à sua alta degradabilidade ou descompasso entre a velocidade de degradação de nitrogênio e carboidratos fibrosos (DETMAN; PAULINO; VALADARES FILHO, 2005).

Costa et al. (2009) observaram que, para as forragens de alta qualidade, a suplementação exclusiva de carboidratos solúveis (amido e pectina) reduziu a taxa de degradação da FDN, similarmente à suplementação exclusiva de proteína verdadeira. A degradação da FDN foi melhor para a suplementação simultânea de carboidratos solúveis e proteína verdadeira. Zorzi et al. (2009) encontraram efeito da suplementação proteica com caseína a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em gramíneas tropicais durante a estação chuvosa, aumentando a taxa de degradação potencial da FDN em 0,1%. Os níveis de suplementação com ureia não afetaram a degradação da FDN, embora tenham aumentado os níveis de N-NH_3 no rúmen, ainda que suplementado em valores referentes similares à caseína.

Com o avanço da idade de rebrotação das gramíneas tropicais, Henriques (2007) encontrou redução nos níveis de compostos nitrogenados não proteicos.

Para avaliação da degradabilidade das forragens e seu potencial fermentativo, as técnicas de produção de gases *in vitro* têm sido amplamente utilizadas, devido sua facilidade de adoção, repetitividade e custos reduzidos, além da obtenção de informações que possibilitam a avaliação da interação de ingredientes e aditivos, com capacidade de prover dados de cinética ruminal e taxas de digestão para a avaliação da qualidade nutricional de ingredientes (GETACHEW et al. 2005).

A sincronização no fornecimento de nitrogênio e carboidratos degradados no rúmen favorece a fermentação microbiana e a degradação da fração fibrosa. A utilização de nitrogênio de liberação controlada tem sido eficaz no suprimento de nitrogênio para os microrganismos ruminais, promovendo melhor aproveitamento da dieta.

Deste modo, considerando o potencial de melhores ganhos de peso com o suprimento do *déficit* metabólico de nitrogênio para gramíneas tropicais durante a época das chuvas; elevados teores de FDN e carboidratos solúveis em folhas de gramíneas tropicais e a redução nos teores de proteína e de compostos nitrogenados com o aumento na idade de rebrotação; a necessidade de sincronização de fontes de nitrogênio e cadeia carbônica para a síntese microbiana e a eficiente utilização de nitrogênio não proteico por microrganismos celulolíticos, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com ureia de liberação controlada na sincronização de fornecimento de nitrogênio para a síntese microbiana, associada à degradabilidade da parede celular.

Como objetivos específicos, avaliaram-se os efeitos das doses crescentes de ureia de liberação controlada na disponibilidade gradual de $N-NH_3$ no rúmen e sua utilização a partir do pH ruminal e da produção de AGCC sob a técnica de fermentação *in vitro* e na eficiência de síntese de produtos da fermentação ruminal devido à sincronização de nutrientes, através da cinética da produção acumulada de gases e fator de partição durante a fermentação *in vitro* em 24, 48 e 96 horas de incubação.

A partir destes objetivos, as seguintes hipóteses passam a ser testadas:

H₀: Não há efeito de doses de ureia de liberação controlada sobre as variáveis analisadas em substrato de capim-marandu de diferentes idades de rebrotação;

H₁: Há efeito de doses de ureia de liberação controlada sobre as variáveis analisadas em substrato de capim-marandu em diferentes idades de rebrotação.

Capítulo 2. Revisão de literatura

2.1 *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

Originária da África, a espécie pertencente ao gênero *Brachiaria*, classificada como *Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu foi introduzida no Brasil em 1967 (NUNES; BOOCK; PENTEADO, 1984). Gramínea perene propagada por sementes, de hábito de crescimento cespitoso, apresenta potencial de produção, vigor de rebota e qualidade de forragem satisfatórios (EVANGELISTA; ROCHA, 1997 e BOTREL, 1998). Pouco tolerante à temperaturas baixas ou geadas, tem como temperatura ótima ao redor de 30°C, sendo que em temperaturas inferiores a 25°C apresenta menor taxa de crescimento. Adapta-se a solos de baixa a média fertilidade (DA SILVA, 1995), e apresenta alta resistência a cigarrinha das pastagens, alta resposta a utilização de fertilizantes, alta cobertura de solo sobrepondo às plantas invasoras, alta produção de raízes e sementes. Moderadamente resistente a seca e pouco tolerante a solos mal drenados.

Estas características promoveram alta disseminação, sendo hoje a espécie forrageira mais encontrada nas pastagens brasileiras.

2.2 Efeito de idade e a morfologia em gramíneas tropicais

Gramíneas de clima tropical apresentam teores mais elevados de parede celular potencialmente degradado no rúmen, decorrentes da alta taxa fotossintética, e taxa de degradação e fermentação ruminal relativamente lenta quando comparadas a gramíneas de clima temperado ou leguminosas, devido às características de composição química e estrutura anatômica (VAN SOEST, 1994).

Estas forragens possuem maior proporção de tecido fibrosos, tais como tecidos vascular, bainha parenquimática de feixes e esclerênquima nas folhas que as espécies de clima temperado (MINSON; WINSON, 1980) e que são positivamente correlacionados aos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, e negativamente com a proteína bruta (PB) (QUEIROZ; GOMIDE; MARIA, 2000).

Com a maturidade, a produção de matéria seca aumenta, e as alterações que ocorrem nos teores de compostos estruturais, como a celulose, a hemicelulose e a lignina afetam a concentração de conteúdo celular. (MINSON, 1990; VAN SOEST, 1994). Consequentemente, há queda no valor nutricional e alteração no comportamento da forragem no trato digestivo dos animais. Brito et al. (2003) relatam que a deposição de lignina aumenta com a maturação fisiológica e diminui a digestibilidade dos polissacarídeos estruturais pelos ruminantes em gramíneas tropicais.

Brito et al. (1999) estudaram o efeito da maturidade em três cultivares de capim-elefante, sobre a porcentagem dos tecidos presentes nas folhas e nos colmos. Avaliaram ainda a sequência de degradação destes tecidos após a incubação *in vitro* em líquido ruminal de bovinos, e concluíram que a área ocupada pelo tecido lignificado aumentou nas folhas assim como nos colmos com o crescimento das plantas. A degradação dos tecidos presentes nas diferentes estruturas diminuiu com a idade da planta. Minson, (1990) descreve as perdas proteicas que ocorrem em forragens com o avanço da idade (Tabela 1).

Tabela 1. Perdas diárias de proteína em espécies tropicais

Espécie	Perda em PB (g.kgMS.d ⁻¹)
<i>Brachiaria mutica</i>	1,5
<i>Cynodon dactylon</i>	1,7
<i>Digitaria decumbens</i>	1,6
<i>Panicum máximum</i>	2,9
<i>Stylosanthes humilis</i>	0,9
Adaptado de Minson, (1990)	

Em revisão, Carvalho; Pires (2008) concluíram que as características anatômicas e nutricionais são influenciadas pelo estágio de desenvolvimento e pelo nível de inserção da folha no perfilho. Dentre os fatores que afetam a qualidade da forragem, a idade da planta é o fator isolado com maior contribuição.

Intervalos menores entre cortes (15 e 30 dias de rebrotação), segundo Mari et al. (2004), apresentaram maior proporção de folhas na matéria seca (71,8 e 69,8%, respectivamente), e à

medida que os cortes tornaram-se mais espaçados, a participação diminuiu, chegando ao mínimo de 52,1% em 90 dias. Como o ciclo de crescimento do capim-marandu está em torno de 30 a 35 dias, espera-se que a partir deste período aumente a participação de material senescente na composição morfológica da planta, assim como o teor de proteína bruta diminua com o aumento do intervalo entre cortes.

Vailhé et al. (2000) encontraram em internós apicais seccionados de festuca, maior conteúdo de parede celular primária na secção basal de tecidos jovens. As células vegetais das secções mais velhas apresentaram maior proporção de xilose/arabinose e lignina, condições típicas de extenso desenvolvimento da parede celular secundária. A extensão da degradação da parede celular após 48h de incubação no rúmen apresentou correção negativa à maturidade, passando de 835 g/kg MS nas secções mais jovens, para 396 g/kg MS nas secções mais maduras. A taxa e extensão da degradação da parede celular foram negativamente relacionadas aos níveis de xilose-arabinose e lignina. Foi evidenciado que o conteúdo e extensão das ligações de lignina a outros polímeros influem marcadamente na taxa e extensão da degradação.

Estudando as diferenças entre morfologia de folhas entre espécies de gramíneas, aos 28 e 42 dias de rebrotação, Herrero et al. (2001) não observaram efeitos de idade na composição química de capim-marandu, assim como para outras espécies estudadas. Os teores encontrados foram de 12,2 e 74% na MS para proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN), respectivamente. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi correlacionada negativamente ao teores de FDN e lignina encontrados.

No entanto, em plantas inteiras, Cone et al. (1999) encontraram efeito do grau de maturação na composição química, degradabilidade da matéria orgânica e parâmetros da fermentação ruminal. Com a maturidade houve aumento nos teores de MS, FDN, FDA e lignina e redução da PB para o capim do gênero *Lolium*, e, conseqüentemente, na degradabilidade da matéria orgânica. Houve maior produção de gases acumulados ao final de 46h de fermentação, observados para os cortes mais maduros. A taxa de fermentação entre 5 e 10 horas de fermentação foi mais elevada para capim mais novo, e menos acentuada, porém também superior entre 5 e 15 horas de fermentação. O capim com maior idade de rebrotação também

apresentou menor potencial de produção de gases, e maior tempo necessário para atingir 50% da curva de fermentação.

Queiroz (2007) encontrou diferenças entre idades de rebrotação (30 e 60 dias), nos teores nutricionais de capim-marandu, com teores de MO em 89,36 e 91,31 %, de PB em 11,43 e 7,51%, de FDN em 66,74 e 69,7% e de FDA em 35,39 e 37,45% para 30 e 60 dias de rebrotação, respectivamente. No mesmo estudo, nas duas idades de rebrotação houve altas concentrações das frações proteicas A (rápida degradação) e B₂ (degradação intermediária) e baixa concentração da fração C (não degradável), o que o torna um volumoso interessante na alimentação de ruminantes. Houve ainda a ocorrência de níveis consideráveis da fração B₁ (peptídeos e oligopeptídeos de degradação rápida) para o cultivar Marandu nas duas idades de rebrotação durante o verão. Para 60 dias de rebrotação, MALAFAIA et al. (1997) encontraram para o mesmo cultivar níveis de PB de 7,5%, FDN 80,45%, e a fração A (rápida degradação) representando 11,58% da proteína.

Sniffen et al. (1992) descreve o fracionamento de carboidratos de acordo à sua taxa de degradação ruminal (h⁻¹). A partir de análises laboratoriais, o valor total de carboidratos de um alimento (Equação 1), pode ser composto pelas frações A, B₁, B₂ e C.

$$CT = 100 - (PB + EE + MM), \text{ onde} \quad (1)$$

CT = carboidratos totais

PB: Teor de Proteína Bruta no alimento

EE: Teor de Extrato Etéreo no alimento

MM: Teor de cinzas no alimento

A fração A representa os carboidratos de degradação rápida, composta por carboidratos de baixo peso molecular como açúcares simples e seus conjugados, ácidos orgânicos ou aldeídos e cetonas polidroxilados. A fração B₁ representa carboidratos de cinética de degradação intermediária. São considerados dentro desta fração compostos de reserva das plantas como amido, frutanas e galactanas e polissacarídeos da parede celular como pectinas e β-glucanas. A fração B₂ é composta por carboidratos de degradação lenta como os

polissacarídeos de parede celular (celulose e hemicelulose), sendo considerada a fração de fibra disponível e utilizada na predição da digestão ruminal da fibra e da síntese de proteína microbiana a partir de microrganismos que digerem carboidratos estruturais. Pode ser calculada a partir da equação (2):

$$B2 = FDN - (NIDN \cdot 5,25) - C, \text{ onde} \quad (2)$$

NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro

C: fração de fibra indigestível

A fração C representa a fração não digestível. É estimada como o valor analítico de lignina multiplicado por 2,4. Porém, em alimentos de lignificação reduzida, este cálculo pode ser superestimado.

Kisuya et al (2008), em estudo da degradação da parede celular e seus compostos em gramíneas tropicais e temperadas, encontraram valores médios de 52%, 65,7% e 68,2% durante 24, 48 e 96 horas de incubação, respectivamente, para a degradabilidade do FDN de gramíneas tropicais. Observaram ainda que a degradabilidade da parede celular de tecidos como parênquima ou mesófilos foi superior à de tecidos como esclerênquima ou vasculares, por serem mais finos e com menor teor de xilose. Tecidos com altos teores de xilose apresentam maior resistência à degradação devido à sua complexação de carboidratos e lignina.

2.3 Utilização de carboidratos estruturais e nitrogênio por ruminantes

Os ruminantes são herbívoros altamente adaptados. A fermentação pré-gástrica permite que utilizem dietas de alta inclusão de material fibroso, a partir da capacidade dos microrganismos em desdobrar a celulose, liberando o conteúdo intracelular e permitindo que ela mesma seja a principal fonte de energia da dieta, além de permitir a utilização de fontes proteicas de baixo valor biológico, como proteínas vegetais ou ainda fontes de nitrogênio não proteico ou produtos metabólicos nitrogenados (ureia), convertendo-as em proteína microbiana de alto valor biológico (VAN SOEST, 1994).

Dietas com alta proporção de concentrados e grãos apresentam altos teores de carboidratos não estruturais ou seus intermediários, em detrimento ao fornecimento de

alimentos fibrosos ricos em carboidratos estruturais da parede celular como celulose, hemicelulose, pectina. Nestas condições, os custos metabólicos para manter o equilíbrio e bom funcionamento da câmara fermentativa pode demandar muita energia e causar alterações digestivas e metabólicas ao animal (LEEK, 1996).

Para hidrolizar as cadeias carbônicas dos carboidratos estruturais de ligação β -1,4, são necessárias enzimas fibrolíticas específicas, encontradas apenas em microrganismos e plantas. Por isso a relação simbiótica entre os ruminantes e os microrganismos que habitam os pré-estômagos é essencial para sua fisiologia digestiva (VAN SOEST, 1994).

Segundo Berchielli; Pires; Oliveira (2006), a população de microrganismos ruminais é composta por uma variedade de bactérias, protozoários e fungos. As bactérias primárias, capazes de digerir o alimento da dieta, são chamadas de celulolíticas ou amilolíticas de acordo à sua especificidade em digerir um ou outro tipo de alimento. Já as bactérias secundárias usam como substrato os produtos finais da degradação dos alimentos feita pelas bactérias primárias, como as propionobactérias que utilizam lactato para síntese de propionato, ou as arqueias que utilizam hidrogênio para síntese de metano. Os protozoários alimentam-se de bactérias ruminais, grânulos de amido e outros nutrientes prontamente digestíveis. O pH é importante na seleção dos microrganismos que preponderam no rúmen. Bactérias celulolíticas, protozoários e algumas bactérias secundárias necessitam um pH mínimo de 6,2, enquanto as bactérias amilolíticas necessitam pH em torno de 5,8. Sob alta disponibilidade de propionato, microrganismos como lactobacilos, podem se proliferar acentuadamente, e agravar a queda de pH, devido a maior concentração de seu produto final, o lactato.

Manella et al. (2003), avaliaram as características de fermentação ruminal de bovinos Nelore em pastagem de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*, encontraram valor de pH ruminal de 7,1 na média dos tratamentos.

Segundo as vias de fermentação ruminal de carboidratos (LEEK, 1996), o primeiro estágio fermentativo, os polissacarídeos são convertidos em seus monossacarídeos correspondentes, e então são convertidos a frutose 1,6 bifosfato. No segundo estágio, ocorre a oxidação deste componente a piruvato. No estágio 3, ocorre a síntese de metabólitos finais da fermentação,

como acetato, butirato e propionato. O estágio 3 seria então quando ocorre a síntese de compostos microbianos, como aminoácidos através da transaminação dos produtos do estágio 1 (Tabela 2).

Tabela 2. Vias de fermentação de carboidratos no rúmen

Estágio	Amido		Celulose		Frutosana		Hemicelulose		Pectina
(i)		↘ ↙ GLICOSE	→		↓ Frutose 1,6 bifosfato		←	↘ ↙ XILOSE	
(ii)		Formato	←		↓ Fosfoenolpiruvato (PEP)		→	Piruvato	
(iii)	8H→	↓ METANO	←CO ₂ ↓ CO ₂		↓ ACETATO →		↙	↓	↘
							Acetil CoA ↓ Aceto Acetato ↓ B-OH-butirato ↓ BUTIRATO	Lactato ↓ Acrilato	Oxalacetato ↓ Succinato
								↘ ↙ PROPIONATO	

Adaptado de Leek, (1996)

A degradação de compostos com ligação glicosídica β 1-4 como a celulose, hemicelulose, frutanas e pectina é realizada por diversas espécies de bactérias celulolíticas primárias, que desdobram estes carboidratos nos quatro estágios citados, exceto na síntese de metano, que ocorre através das bactérias metanogênicas secundárias. Devido à sua baixa taxa metabólica, as bactérias celulolíticas fermentam lentamente seus substratos, levando até 18 horas para que dupliquem seu número. Para a síntese proteica, estas bactérias não necessitam de um suprimento de aminoácidos, mas de nitrogênio na forma de amônia, de produtos intermediários dos estágios 2 e 3 e de alguns isoácidos sintetizados a partir da desaminação de aminoácidos ramificados de proteínas vegetais. Para síntese de metano, as bactérias metanogênicas demandam formato, CO₂, unidades redutoras (2H), e aminoácidos para sua exigência proteica, em pH similar ao ótimo das bactérias celulolíticas. Em geral, a proporção entre os AGCC a partir da fermentação de celulose é 70:15:10 entre acetato:propionato:butirato (LEEK, 1996).

Os microrganismos que utilizam carboidratos não-estruturais apresentam taxa de fermentação mais rápida, tempo de multiplicação mais curtos (entre 0,25 e 4 horas para sua

duplicação) e pH ótimo em torno de 5,5 a 6,6 decorrentes da alta concentração de AGCC e em alguns casos de lactato. Necessitam nitrogênio na forma de amônia e também de aminoácidos e peptídeos para síntese proteica. Em pH abaixo de 5,5 ocorre a inativação e morte de protozoários (RUSSELL et al., 1992).

Dessa forma, observa-se que a maioria dos microrganismos ruminais não utiliza proteínas, lipídeos e ácidos graxos voláteis como fontes de energia, mas sim carboidratos (NOCEK; RUSSELL, 1988).

As bactérias que degradam amido, pectina e açúcares simples são capazes de continuar a degradação do substrato mesmo que o N seja limitante, sendo conhecido como “energy spilling”, ou gasto inútil de energia, já que não há fonte proteica para multiplicação destes microrganismos. As bactérias celulolíticas não são capazes de degradar substrato quando o N é limitante, e tampouco multiplicar-se. Assim, fornecer níveis constantes e adequados de nitrogênio no rúmen é fundamental para manter sua atividade fermentativa (TEDESCHI; FOX; RUSSELL, 2000).

Os microrganismos proteolíticos, capazes de fermentar proteínas, representam entre 12 e 38% da população microbiana, sendo responsáveis pela degradação de aproximadamente 50% da proteína da dieta, de acordo à composição e perfil dos alimentos que a compõe.

Segundo Tedeschi et al. (2000) peptídeos e aminoácidos precisam ser deaminados para produção bacteriana de aminoácidos de cadeia ramificada, fatores de crescimento essenciais para microrganismos celulolíticos. Estes microrganismos capazes de utilizar amônia como fonte de nitrogênio para síntese microbiana apresentam requerimento indireto de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada.

A proteólise no rúmen é extracelular, realizada por proteases liberadas pelos microrganismos gerando aminoácidos e peptídeos que são absorvidos por transporte ativo e hidrolizados pela microbiota ruminal. Parte não absorvida destes compostos gerados são desaminados a amônia e ácidos metabólicos. Estes últimos são fermentados a ácidos graxos de cadeia curta ramificadas (AGVCR) ou isoácidos, como isobutirato, valerato e isovalerato, derivados de aminoácidos como leucina, isoleucina e valina, e utilizados como nutrientes para bactérias celulolíticas. Estes isoácidos (isovalérico, valérico e isobutírico) representam menos de

5% do total de AGCC produzidos no rúmen, e são importantes na síntese proteica dos microrganismos a partir do NNP, e menos expressivos para o ruminante em si (LEEK, 1996).

De acordo com Broderick (1995), a degradação proteica consiste na conversão da proteína dietética em amônia, com as bactérias atuando como os principais microrganismos envolvidos, seguidas de protozoários ciliados e pequena contribuição de fungos anaeróbicos.

A amônia presente no rúmen é derivada não somente da deaminação dos aminoácidos da dieta, como também da conversão dos compostos nitrogenados não proteicos (NNP) que podem ser endógenos ou da dieta (nitritos, nitratos, ureia). A urease é a enzima responsável pela rápida degradação de ureia a amônia, um importante substrato para a síntese microbiana desde que haja suficiente de α -cetoglutarato e AGCC (incluindo isoácidos) para utilização como fonte de cadeia carbônica para o grupamento amina a partir da transaminação do glutamato (SHIRLEY; 1986).

Assim, os microrganismos utilizam carboidratos fibrosos como principal fonte de alimentos e os AGCC formados são utilizados como fonte de cadeia carbônica para a utilização do nitrogênio na forma de amônia, para síntese de proteína microbiana. A fermentação celulolítica apresenta menor taxa de produção de AGCC que a fermentação amilolítica. Além disso, devido à menor taxa de crescimento microbiano, a taxa de síntese proteica também é menor (SHIRLEY; 1986).

Os AGCR são nutrientes essenciais para os microrganismos que degradam fibra e para alguns que degradam carboidratos não fibrosos (CNF). Segundo Tedeschi et al. (2000), após degradarem aminoácidos e absorverem AGCR, os microrganismos sintetizam aminoácidos essenciais ou AGCL (ácidos graxos de cadeia longa) e aldeídos. Dietas com excesso de proteína podem levar a um aumento da amônia ruminal e a maior degradação de aminoácidos como leucina, isoleucina e valina, com consequente maior presença no fluido ruminal de AGVCR (ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada).

Do Val Neto (2009) em sua revisão relata vários estudos onde a suplementação com AGVCR aumenta a síntese microbiana, a digestibilidade da matéria seca, a retenção de nitrogênio da dieta, a produção de acetato e a produção de leite. Russel; Sniffen (1984) observaram aumento de 11,2% na síntese de proteína microbiana para adição de isovalerato e

isobutirato, quando o substrato avaliado foi baseado em feno de gramíneas. Hemsley; Moir (1963) observaram aumento de 70% na síntese microbiana de carneiros para a adição de 0,56% de uma mistura de isovalerato, isobutirato e valerato, em dieta a base de feno de aveia. Kay; Phillipson (1964) observaram aumento de 10 a 15% no fluxo de nitrogênio para o duodeno ao fornecer aos carneiros uma dieta a base de feno, uréia e isoácidos.

A ureia é a forma mais comum de fornecimento de nitrogênio não proteico na dieta de ruminantes. O fornecimento desta fonte proteica, além de prover amônia para síntese de proteína microbiana proporciona redução de custo da dieta, redução no tempo entre refeições, resultando em maior eficiência energética da dieta (HUBER, 1994), e redução da excreção de compostos nitrogenados para o meio ambiente (TAMMINGA, 1996).

Uma vez no rúmen, a uréia é solubilizada e degradada pela urease microbiana a nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e dióxido de carbono (CO_2). Segundo Russel et al. (1992), o fornecimento sincronizado de carboidratos e fontes protéicas de degradação similares reduz as perdas por amônia, e aumenta a fermentação microbiana e a degradação do alimento. Quando a energia degradada a partir dos carboidratos é excedida à oferta de nitrogênio no rúmen, ocorre queda na atividade microbiana e eficiência digestiva, com fermentação incompleta e redução na síntese proteica (NOCEK; RUSSEL, 1988).

Satter; Roffles (1975) sugerem estreita dependência entre o uso de uréia e o conteúdo de energia da dieta. O descompasso entre a degradação de uréia e fontes de carboidratos podem refletir em aumento dos níveis de N-NH_3 ruminal. Assim, as recomendações para utilização da uréia são baseadas principalmente na concentração de energia digestível da dieta. Para o uso associado à uréia convencional, Rodrigues (2003) descreve o amido como principal fonte de energia devido à sua taxa de liberação constante, embora o melaço também seja muito utilizado, e apresente fermentação rápida. Neste caso, a celulose seria pouco indicada, por sua lenta degradação ruminal em descompasso à rápida degradação da uréia convencional no rúmen (RODRIGUES, 1985).

A ureia de liberação controlada, encapsulada com polímero de lipídeos, promove liberação do nitrogênio em até 16 horas, solubilizada lenta e constantemente (AKAY et al, 2004). Os autores avaliaram a utilização *in situ* da ureia encapsulada em comparação ao farelo de soja

e a ureia comum. Observaram degradação *in situ* próxima ao encontrado para farelo de soja, em contraposição à ureia comum (Figura 1). A ureia de liberação controlada apresentou degradação intermediária nas primeiras 16 horas, seguida de liberação mais lenta, entre 16 e 30 horas, similarmente ao observado para farelo de soja.

Figura 1. Desaparecimento *in situ* de fontes de nitrogênio não proteico e farelo de soja (AKAY et al, 2004).

Lascano et al (2011) observou maior digestibilidade aparente da fração FDA e similar do FDN, quando substituiu o farelo de soja por uréia de liberação controlada (ULC) em dietas isocalóricas e isoproteicas de relação volumoso:concentrado 1:1, utilizando cana-de-açúcar em novilhas holandesas.

Simclair; Blake; Griffin; Jones, (2012) não encontraram aumento na produção de leite ou na digestibilidade dos nutrientes da dieta ao substituir parcialmente o farelo de soja por uréia convencional ou ULC na dieta de vacas em lactação. No entanto, os animais que consumiram ULC apresentaram maior eficiência na conversão de N da dieta por N no leite, indicando maior eficiência de utilização.

Ferreira et al. (2005) não observaram diferenças na concentração ruminal de $N-NH_3$ em vacas até 1,5 h após o consumo de feno de braquiária e suplemento mineral, quando adicionados de 7 g de ureia de liberação controlada ou ureia comum. As concentrações

aumentaram para ambos tratamentos, após 1,5 h de consumo. No entanto, as concentrações séricas foram mais elevadas para o tratamento que recebeu ureia convencional entre 0,5 e 3,5 h após o consumo, indicando que o N-NH₃ disponibilizado no rúmen a partir da dieta com ULC foi melhor utilizada pela sua microbiota que a dieta com mesma inclusão de uréia convencional.

A suplementação com uréia convencional pode favorecer a ingestão de matéria seca e o uso da energia quando a dieta apresenta alto teor de volumosos de baixa qualidade. Estes efeitos estão relacionados à taxa e extensão da degradação de FDN (LAZZARINI et al., 2009). No entanto, efeitos deletérios sobre a ingestão de matéria seca foram encontrados por Wilson et al. (2007), quando os teores de uréia convencional suplementados foram superiores a 20 g/kg MS.

Avaliando os efeitos do uso de uréia convencional e uréia de liberação controlada (ULC) em novilhos, sobre parâmetros ruminais (N-NH₃, pH) e digestivos (ingestão de matéria seca e degradabilidade da MS e de FDN), Ribeiro et al. (2011) observaram maior ingestão de matéria seca para dietas contendo ULC. Neste experimento, a suplementação de ULC em dieta a base de feno de *Brachiaria humidicola* com 2,49% de PB, foi de 27,8 e 30g/kg MS. Os níveis de N-NH₃ foram menores e constantes para a dieta com ULC exclusiva que uréia convencional. A digestibilidade e degradabilidade dos nutrientes do feno avaliado não apresentaram diferenças significativas entre fontes de uréia convencional ou ULC, porém o uso de ULC melhorou o ambiente ruminal (pH e N-NH₃).

A degradabilidade da fibra é altamente dependente do pH ruminal. A degradação ótima da parede celular ocorre entre 6,6 e 7,0. Abaixo de 6,2 a degradação é extremamente reduzida, e mínima quando o pH ruminal atinge 6,0 (DIXON; STOCKDALE, 1999). O pH ruminal também pode gerar perdas na utilização do nitrogênio amoniacal, que aumentam quando ocorre acidez ruminal ocasionada pela redução da degradação da fibra (HOOVER, 1986).

Estudos realizados por Slyter; Bryant; Wolin, (1966), Naga; Hermeyer, (1975), El-Shazly et al., (1969) e Vathauer; Hinds; Garricus, (1970), indicam uma correlação negativa entre a síntese de AGCC e o crescimento microbiano, considerando que os microrganismos celulolíticos utilizam nitrogênio não proteico como fonte de nitrogênio e cadeias carbônicas provindas de AGCC e AGCR para síntese de proteína microbiana.

Griswold; Hoover; Miller; Thayne, (1996) ao comparar diferentes fontes de nitrogênio (uréia, aminoácidos(aa) e peptídeos (pp)) sobre dietas isocalóricas e isoproteicas em bovinos, observaram menor síntese de AGCC em 24 horas de fermentação para dietas com 100% uréia que a suplementação com 100% aa ou 100% pp. A relação percentual de butirato não foi afetado pela forma de suplementação de N. A síntese de isoácidos foi maior para dietas sem ureia que aquelas com ureia. O percentual de isobutírico e isovalerato foi superior para dietas com 100% pp ou 100% aa. O percentual de valerato foi superior para dietas com 100% aa que os demais tratamentos. Foi observado ainda que os altos teores de AGCR favoreceram a síntese de aminoácidos, como fonte de cadeia carbônica. Dietas com 100% uréia produziram menores teores de isoácidos, e apresentaram menor síntese de proteína microbiana, com maiores níveis de N-NH_3 no fluido ruminal.

Segundo Minson (1990), forragens com teores abaixo de 100 g de PB. kg MS^{-1} fornecem insuficientes teores de aminoácidos e amônia para síntese de proteína microbiana. Segundo o mesmo autor, a dieta deve conter o mínimo de 170 g de PDR por kg MO degradável. A suplementação exclusiva por ureia não é suficiente em prover a demanda proteica, sendo ainda necessários enxofre, AGCC ou aminoácidos sulfurados como metionina. Segundo NRC (1984), um animal de 300 kg, para um ganho de 1,25 kg diários, demanda 180 g de PB. kg MS^{-1} .

2.4 Fermentação *in vitro*

Durante a fermentação ruminal, são produzidos e liberados gases como metano (CH_4), gás carbônico (CO_2), e quantidades variáveis de nitrogênio (N_2) e traços de H_2S , H_2 e O_2 (VALADARES FILHO; PINA, 2006). A proporção de cada produto da fermentação ruminal, depende da espécie bacteriana, que possui especificidade para cada tipo de substrato da dieta (KOZLOSKI, 2002).

Várias técnicas foram desenvolvidas para relacionar a fermentação ruminal e a degradação dos alimentos estudados. Técnicas de fermentação *in vitro* como aquelas desenvolvidas por Tilley; Terry (1963); e Menke et al. (1979), permitiram o entendimento da degradabilidade de alimentos, sem no entanto, elucidar a dinâmica da fermentação ruminal. As

técnicas de degradação *in situ* desenvolvidas por Mehrez et al. (1977) e Ørskov; McDonald, (1979), permitiram avaliar a cinética de degradação, enquanto aquelas desenvolvidas ou adaptadas por Blummel; Ørskov, (1993), Pell; Schofield, (1993), Theodorou et al. (1994), Cone et al. (1996) e Mauricio et al. (1999) permitiram avaliar a cinética da produção de gases durante a fermentação.

Assim, a técnica de produção de gases *in vitro* indica a atividade fermentativa dos microrganismos de origem ruminal sobre os alimentos durante incubação. A fermentação do substrato moído com líquido ruminal e meio de cultura em condições anaeróbias e de temperatura controlada a 39°C é monitorada a partir dos gases produzidos. O alimento incubado é degradado e a fração degradada ao ser fermentada produz gases e ácidos da fermentação ou incorpora-se à biomassa microbiana (RYMER et al., 2005).

A simulação do ambiente ruminal permite mensurar a formação de subprodutos como gases (CO₂ e CH₄) e o desaparecimento do substrato no decorrer do tempo, quantificando-se os resíduos após a incubação ou ainda obter informações sobre a concentração de AGCC, N-NH₃ e pH no meio de cultura fermentado durante o tempo de incubação.

Segundo Williams (2000), a técnica pode ser aplicada para a avaliação da qualidade de gramíneas, fenos e silagens, e detalhar diferenças entre substratos devido ao seus estádios de maturidade e condições de crescimento. Pode-se, ainda, estabelecer comparações entre espécies e cultivares, além de avaliar diferenças entre composição química, tratamentos físicos de alimentos, assim como o efeito da adição de suplementos.

2.4.1 Produção acumulada de gases como indicador de fermentação ruminal

Na técnica semi-automática de produção de gases (MAURÍCIO et al., 1999), um transdutor é acoplado a uma agulha e permite a mensuração da pressão dentro do frasco de fermentação durante o tempo de incubação. Obtém-se assim dados sobre a produção total de gases e a produção de gases por hora (taxa de fermentação). Na técnica de medição de pressão

manual descrita por Theodorou et al. (1994) é utilizada uma válvula de fechamento de três vias conectadas à uma seringa (para a medida do volume de gás) e um sensor de pressão ligado a uma exposição numérica e um frasco fechado de incubação.

A partir das mensurações de produção de gases no tempo de fermentação, são utilizados alguns modelos matemáticos para descrevê-lo. A descrição matemática dos perfis de produção de gases ajustam os dados observados e permitem a sua análise para comparação dos substratos ou características do ambiente de fermentação, fornecendo informações úteis quanto à sua composição e a fermentabilidade das frações solúveis e lentamente degradáveis (GROOT et al., 1996). Dados de produção de gases *in vitro* podem ser úteis quando são complementados com outros dados, como composição química do substrato e/ou sua digestão *in vitro*, para atuar em modelos matemáticos mais complexos que predizem fenômenos relacionados com o funcionamento do rúmen (KRISHNAMOORTHY et al., 2005).

O modelo matemático descrito por France et al. (1993) representa adequadamente a curva sigmoideal da cinética de produção de gases, dada por:

$$Af = A \cdot \left\{ 1 - e^{[-bx(t-t_0) - cx(\sqrt{1-\sqrt{t_0}})]} \right\}, \text{ onde} \quad (3)$$

Af = produção acumulada de gases produzidos até o tempo t (mL)

A = volume assintótico de gases produzidos, ou potencial máximo de produção de gases, (mL)

$t_0 = L$ = tempo de colonização (lag time),

b (h^{-1}) e c ($h^{-0,5}$) = taxas fracionais constantes do modelo

A taxa de fermentação (μ) a partir do mesmo modelo para $t > t_0$, é dada por:

$$\mu = b + \frac{c}{(2 \cdot \sqrt{t})}, \text{ onde} \quad (4)$$

μ = taxa de produção de gases ($mL \cdot h^{-1}$)

b e c = parametros estimados pela equação (3)

t = tempo de incubação (h)

Por ser variável no tempo, a taxa de fermentação incorpora ao modelo o perfil fermentativo distinto entre os alimentos devido às variações na composição química, durante o tempo de fermentação.

Bueno (2001) observou correlação entre parâmetros matemáticos e biológicos obtidos durante a fermentação *in vitro* e resultados *in vivo* para consumo voluntário e digestibilidade de matéria seca, para braquiária, Tifton e alfafa.

Segundo Getachew et al. (2004), a quantidade de gases produzidos de um alimento em incubação reflete a produção de AGCC, os quais são a principal fonte de energia dos ruminantes. A cinética da degradação ruminal e o ritmo fracional da produção de gases *in vitro* estão relacionados com o perfil dos carboidratos e da proteína dos alimentos, bem como o teor de extrato etéreo.

Velásquez (2009) avaliou, sob a técnica de fermentação *in vitro*, o perfil cumulativo de gases, a produção de AGCC e a degradação da fração fibrosa de três diferentes espécies de gramíneas tropicais, em três idades de rebrotação. O tempo de colonização foi em torno de 0,38 h para todos os cortes para as forragens colhidas durante o verão. A produção total de gases foi em média de 192,7 mL em 48 h incubação, e 257,1 mL em 96 h de incubação para o capim-marandu nas três idades de rebrotação. A produção de gases em 96 h de incubação foi menor para os capins aos 28 dias, independente da espécie. Os maiores tempos de colonização foram relacionados aos maiores teores de FDN e lignina das espécies avaliadas. O maior valor da relação entre a produção de gases em 48 e 96 h foi obtido para o capim-marandu, independentemente do período de águas ou seca, todavia, sem efeito significativo da espécie e da idade de corte.

2.4.2 Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen como indicador de síntese microbiana

A técnica de produção de gases *in vitro* pode ser viável na avaliação da degradação da proteína bruta pela determinação da concentração de nitrogênio amoniacal a medida que ocorre a perda de alimento, eliminando os efeitos da síntese proteica *de novo* durante a fermentação. No entanto, deve-se considerar que a degradação e a síntese da proteína microbiana são processos que acontecem simultaneamente (CHAMBERLAIN; THOMAS, 1979).

Em estudo realizado por Raab et al. (1983) com substratos, como fontes de nitrogênio, incubados com níveis crescentes de amido ou outras fontes de cadeia carbônica, observou-se regressão linear entre a concentração de N-NH_3 (y, mg) e a produção de gás (x, mL) assumindo-se que o intercepto (y) representou a quantidade de amônia liberada na ausência de carboidratos disponíveis, quando nenhuma síntese de proteína microbiana ocorreria. Houve também efeito positivo da degradação do amido e a produção acumulada de gases, indicando que a utilização de ambos (N-NH_3 e carboidratos solúveis) é relacionada à cinética de fermentação. Neste estudo, Raab et al. (1983) assumem que parte do nitrogênio amoniacal liberado no rúmen, a partir da degradação do substrato, é utilizado para síntese microbiana; que a produção de CO_2 e CH_4 indicam energia disponível para síntese proteica e que os níveis de nitrogênio no inóculo interferem na degradação *in vitro* da proteína (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da relação entre degradação de proteína e síntese proteica no fluido ruminal *in vitro*. A = N-NH_3 após inoculação do alimento sozinho; B = N-NH_3 após incubação do alimento com amido, C = produção de gás a partir do alimento sozinho, D = produção de gás a partir do alimento + amido, EFG = N microbiano esperado como originado do N-NH_3 , aminoácidos e peptídeos, quando o alimento é incubado sozinho; H = N-NH_3 esperado em ausência de produção de gás. Fonte: Raab et al. (1983).

O nitrogênio amoniacal (N-NH_3) tem sido usado como referência para o entendimento das condições do ambiente ruminal e à atividade microbiana de degradação de carboidratos fibrosos (DETMANN; PAULINO; MANTOVANI, 2009). Esta estratégia é possivelmente associada

ao fato de que N-NH_3 é fonte preferencial de nitrogênio para o crescimento de microrganismos fibrolíticos (RUSSEL, 2002).

Segundo Satter; Slyter (1974) níveis ruminais mínimos de nitrogênio amoniacal entre 2 e 5 mg.dL^{-1} não restringiram a digestão da matéria orgânica da dieta. Leng (1990) concluiu que em concentrações de N-NH_3 entre 10 e 20 mgN.dL^{-1} poderiam maximizar a digestibilidade da MS e o consumo em condições tropicais. Chase; Hibbert (1987) encontraram valores de 2,2 mg.dL^{-1} para animais alimentados com forragens com 4,2% PB, e à medida que se suplementou com milho, houve redução na concentração de nitrogênio amoniacal, indicando sua utilização para síntese proteica. Mehrez; Orskov; McDonald (1977) encontraram máxima fermentação ruminal, quando a concentração ruminal de N-NH_3 foi 22 mg.dL^{-1} . A partir da variabilidade destes resultados, pode-se considerar que a concentração de N-NH_3 ideal está relacionada ao teor de carboidratos fermentescíveis no rúmen. Segundo Manela et al. (2003), a concentração de N-NH_3 no rúmen é dependente da taxa de degradação, da fonte protéica utilizada e do equilíbrio entre sua produção e utilização por parte dos microrganismos ruminais.

Os microrganismos são dependentes de ATP originário da degradação de carboidratos para a síntese de proteína microbiana. Quando peptídeos e aminoácidos passam a ser degradados, ocorre acúmulo de nitrogênio amoniacal no rúmen. A concentração de nitrogênio amoniacal, depende da degradabilidade da fonte proteica, da disponibilidade de carboidratos e do equilíbrio entre a produção e a utilização por microrganismos (SATTER; ROFFLER, 1979, NOCEK; RUSSEL, 1988).

Manella (2004), ao avaliar dietas isoproteicas com diferentes níveis de energia, encontrou concentrações mais baixas de N-NH_3 no rúmen em dietas com maior energia, devido a maior concentração de carboidratos disponíveis para os microrganismos ruminais para síntese proteica.

2.4.3 Fator de partição como indicador da eficiência microbiana

É necessário correlacionar a produção cumulativa de gases com o desaparecimento de substrato incubado para uma correta interpretação dos dados, pois a produção de gases indica

somente como o substrato é utilizado para produzir gases, enquanto o desaparecimento do substrato indica sua utilização na fermentação (FREITAS, 2001). O fator de partição (FP) integra essas duas medidas e indica a eficiência da atividade fermentativa dos microrganismos, em digerir o nutrientes presentes no substrato testado. É calculada a partir dos volumes de gases acumulado nos tempos, e a degradação do substrato. Pode-se, ainda, avaliar a eficiência da fermentação pela relação da produção acumulada de gases a outros subprodutos, como AGCC (WILBERT et al., 2011).

O fator de partição é uma variável que indica a eficiência da fermentação microbiana, ou seja, o quanto foi degradado do substrato inicial para cada mL de gás produzido. Desta forma, quanto maiores os valores observados, maior a eficiência microbiana em utilizar o substrato.

2.4.4 AGCC como indicador da eficiência fermentativa

Os AGCC são produzidos no rúmen como produto final da fermentação microbiana. Durante o processo fermentativo, a energia é conservada na forma de ATP e, posteriormente, utilizada pela população microbiana.

A energia para o crescimento de microrganismos ruminais é derivada da fermentação de carboidratos, em especial amido e parede celular, que são quebrados em hexoses e pentoses, produzindo como subprodutos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, propionato e butirato, e em menores quantidades valerato, caproato, isobutirato, isovalerato, e traços de outros ácidos; CO_2 e CH_4 , além de suprir a demanda de cadeia carbônica para a síntese de biomassa microbiana. Os AGCC são então absorvidos pela mucosa do rúmen, promovendo energia para o tecido da mucosa e para o hospedeiro. Os gases gerados são erutados, sendo uma fonte de energia perdida na atmosfera. Estes gases da fermentação (CO_2 e CH_4) são medidos durante a técnica de fermentação in vitro, acumuladas no headspace dos frascos de fermentação (WILLIAMS, 2000).

As taxas de produção de AGCC, assim como a relação entre eles variam no tempo de fermentação e de acordo ao tipo de alimento.

A reação estequiométrica que representa a fermentação da parede celular à hexoses, foi descrita por Hungate et al. (1966), e dada por:

A síntese de propionato é a única reação que demanda H_2 . O H_2 remanescente pode ser usado por microrganismos metanogênicos para síntese de CH_4 . Além disso, a síntese de propionato não envolve a geração de CO_2 . Por isso, compara-se em estudos de forragens, dados referentes a relação entre acético e propiônico formados.

As espécies de bactérias celulolíticas produzem principalmente acetato, propionato, butirato, succinato, formato, CO_2 e H_2 durante a fermentação ruminal. Estes subprodutos podem ser também utilizados como substrato para outros microrganismos ruminais.

Alguns microrganismos proteolíticos ou fermentadores de carboidratos não estruturais sintetizam, a partir de aminoácidos e peptídeos da dieta, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGVCR) como valerato e isovalerato. A importância destes microrganismos é que a proteína dietética é degradada liberando amônia e AGCC, e se a taxa de desaminação excede a taxa de utilização de amônia para síntese microbiana, pode ocorrer perda na eficiência na utilização do alimento, devido à perda de nitrogênio dietético na forma de amônia (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006).

Em geral, a síntese de ácido acético é predominante, junto ao ácido butírico, em dietas ricas em forragens, onde bactérias fibrolíticas proliferam. Dietas com maiores teores de fibra e/ou menores teores de carboidratos não estruturais resultam em maiores teores de CH_4 produzido por unidade de forragem ingerida (MCALLISTER et al., 1994). Quando as plantas forrageiras são mais novas e possuem melhor valor nutricional, com teores mais elevados de PB em detrimento das frações fibrosas, ocorre redução na síntese de CH_4 (VAN SOEST, 1994).

Belleossof (2005) encontrou maior síntese de CH_4 associada a elevados teores de fração fibrosa presente na pastagem de capim-tanzânia, devido ao longo período de crescimento ao

qual aquela foi submetida no primeiro ciclo de pastejo. Contudo, também se observou altos teores de CH₄ durante a fermentação, para amostras de pastagens com teores reduzidos de fração fibrosa em outros ciclos de pastejo, e baixos teores de CH₄ em pastagens com elevados teores de fibra, que podem estar associadas às diferenças observadas na degradabilidade da fibra. Sendo assim, é possível que a observação de maior quantidade de FDN efetivamente degradada tenha promovido maior produção de CH₄.

Portanto, a simples afirmação de que para plantas forrageiras, elevados teores da fração fibrosa estão associados com elevações nos teores de CH₄ produzido por unidade de forragem consumida, não pode ser vista como uma verdade absoluta. Haja visto que, a produção de CH₄ no ambiente ruminal é um processo muito complexo, e demonstrou sofrer influências diretas tanto da quantidade de fibra presente na dieta, quanto de sua degradabilidade.

Em geral, quando o animal ingere uma dieta enriquecida com amido ou outros carboidratos de alta solubilidade, ocorre incremento na síntese de ácido propiônico, a partir de bactérias amilolíticas. A curva de produção de AGCC também é relacionada ao tipo de alimento.

2.5 Referências bibliográficas

AKAY, V.; TIKOFSKY, J.; HOLTZ, C.; DAWSON, K. Optigen 1200: controlled release of non-protein nitrogen in the rumen In: **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. ALLTECH 21^o ANNUAL SYMPOSIUM**, 20; Proceedings Nottingham: Nottingham University Press, p. 179-185, 2004.

AKIN, D.E.; BURDICK, D. Percentage of tissues types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.15, 661-668 p., 1975.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA – ANUALPEC. **A evolução da pecuária de corte brasileira**. Informa Economics FNP South America, 20^a Edição, p.5-35. 2013.

ARROQUY, J.I.; COCHRAN R.C.; NAGARAJA, T.G. Effect of types of non-fiber carbohydrates on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.93-106, 2005.

BARBOSA, N.G.S.; et al. Consumo e Fermentação Ruminal de Proteínas em Função de Suplementação Alimentar Energética e Protéica em Novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p.1558-1565, 2001.

BELEOSSOF, B. S. **Potencial de produção de gases totais e metano *in vitro* de pastagens de *Panicum maximum* jacq. cv. Tanzânia submetida a diferentes manejos de pastejo.** Tese (doutorado) Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, 145 p. 2013.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes.** Jaboticabal:FUNEP, 583 p. 2006.

BLUMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. **Animal Feed and Technology**, v.40, p. 109-119, 1993.

BORGES, A.L.C.C.; RABELO, L.S.; GONÇALVES, L.C. Avaliação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em oito idades de corte em Igarapé – MG. Teores de matéria seca, produção de matéria seca e relação folha/haste. In: **REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 39. 2002, Recife. Anais...Recife: SBZ, 2002.

BOTREL, M. A.; NOVAES, L. P. N.; ALVIM, M. J. **Características forrageiras de algumas gramíneas tropicais.** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1998, 35 p. (documentos, 66).

BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C.; ALQUINI, Y. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares decapim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 223-229, 1999.

BRITO, C.J.F.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C. Chemical profile of cell wall and its implication of *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humidicola* digestibility, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, 1835-1844 p., 2003.

BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine reactive peptides in the sheep rumen. **Journal of Animal Science**, v.66, n.9, p.2233-2238, 1988.

BUENO, I.C.S.; **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas.** Tese (Doutorado) Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p.97, 2001.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123–124, p. 95–105, 2005.

CAMPOS, F.P. et al. Degradabilidade do capim-elefante em diferentes estágios de maturidade avaliada pelo método *in vitro* /gás. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.217-225, 2002.

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

CASTRO, G.H.F. et al. Cinética de degradação e fermentação ruminal da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu colhida em diferentes idades ao corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1538-1544, 2007.

CHAI, W.; UDEN, P. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre, **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, p. 281-288, 1998.

CHASE, JR.C.C.; HIBBERD, C.A. Utilization of low-quality native grass hay by beef cows fed increased quantities of corn grain. **Journal of Animal Science**, v.65, p. 557-566, 1987.

CHAMBERLAIN, D.G.; THOMAS, P.C. Prospective laboratory methods for estimating the susceptibility of feed proteins to microbial breakdown in the rumen. **Proceeding of Nutrition Society**, v.38, p.138A, 1979.

CLARK, J.H., KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2304-2323, 1992.

COELHO, S.G., SATURNINO, H.M., OLIVEIRA, H.N. Porcentagem molar de AGCC do conteúdo ruminal até os 90 dias de idade, de bezerros desmamados aos 30 dias e alimentados com ou sem volumoso até 60 dias. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 37, 2000, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: SBZ, p.473, 2000.

COSTA, V.A.C; et al. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.38, n.9, p.1803-1811, 2009.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VISCHER, G.J.W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p. 113-128, 1996.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; DE VISSER, H. et al. Different techniques to study rumen fermentation characteristics of maturing grass and grass silage. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.957-966, 1999.

DABO, S.M. et al. Yield and digestibility of old world bluestem grasses as affected by cultivar, plant part, and maturity. **Journal of Range Management**, v.40, 10-15 p., 1987.

DA SILVA, S. C. Manejo de plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Cynodon* e *Setaria*. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. (Ed). **Volumosos para ruminantes**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 29-57p., 1995.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; Suplementação de novilhos mestiços durante a época das águas: parâmetros ingestivos e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1380-1391, 2005.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: Anais... **VI Simpósio de Produção de Gado de Corte, II Simpósio Internacional de Produção de Gado de corte**. Viçosa DZO-UFV: Suprema Gráfica e Editora Ltda, p. 21-52, 2008.

DETMANN, E. et al. Parameterization of ruminal fiber degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Production Science**, v.126, p.136-146, 2009.

DIXON, R.M.; STOCKDALE, C.R. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. **Australian Journal of Agricultural Research**. V.50, p.757-773, 1999.

DO VAL NETO, E.R. **Ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada na nutrição de bovinos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 30 p. 2009.

EL-SHAZLY, K. et al. The use of the *in vitro* fermentation technique to estimate the digestible energy content of some Egyptian forages: III. The effect of periodical renewal of medium on volatile fatty acid production and cellulose digestion *in vitro* as criteria of energy content. **Journal of Agricultural Science**, v. 73, p. 431, 1969.

EVANGELISTA, A. R.; ROCHA, G. P. **Forragicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 246. 1997.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, p. 250-251, 1965.

FERRARI JÚNIOR, E.; ANDRADE, J.B.; PEDREIRA, J.V.S. et al. Produção e qualidade dos fenos de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob três frequências de corte. I. Produção de matéria seca. **Boletim Indústria Animal**, v.51, p.49-54, 1994.

FERREIRA, R.G. et al. Liberação de nitrogênio amoniacal com uso de ureia encapsulada com polímero (Optigen). Anais: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Goiânia-GO, 42 p. 2005.

FREITAS, T.S. **Avaliação de misturas de volumosos de baixa qualidade com concentrados pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.132, 2001.

FRANCE, J.M. et al. A model to interpret gas accumulations profile with *in vitro* degradations of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p. 90-111, 1993.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J. Relationship between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, n. 1-4, p. 57-71, 2004.

GETACHEW, G.; DEPETERS, E.J.; ROBINSIN, P.H.; FADEL, J.G. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p. 547-559, 2005.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington DC: USDA, **Agricultural Handbook**, 379.1970.

GRISWOLD, K. E., W. H. HOOVER, T. K. MILLER, AND W. V. THAYNE. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 483–491. 1996.

GROOT, J.C.J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.64, p.77-89, 1996.

GROOT, J. C. et al. The use of cumulative gas and volatile fatty acid production to predict *in vitro* fermentation kinetics of Italian ryegrass leaf cell walls and contents at various time intervals. **British Journal of Nutrition**, v. 79, p. 519–525. 1998.

HEMSLEY, J.A.; MOIR, R.J. The influence of higher volatile fatty acids on the intake of urea-supplemented low quality cereal hay by sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.14, p.509, 1963.

HENRIQUES, L.T. **Frações de carboidratos e compostos nitrogenados e parâmetros da cinética de degradação ruminal dos carboidratos de quatro gramíneas tropicais em diferentes idades de corte e doses de adubação nitrogenada**. Campus Goytacazes:Universidade Estadual do Norte Fluminense, 66p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – **Universidade Estadual do norte Fluminense**, 2004.

- HERRERO, M. et al. Measurements of physical strength and their relationship to the chemical composition of four species of *Brachiaria*. **Animal Feed Science and Technology**, v.92, n. 3-4, p. 149–158. 2001.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.69, p. 2755-2766, 1986.
- HUBER, J.T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. **Livestock Production Science**, v.39, p. 141-155 , 1995.
- HUNGATE, R. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966.
- HUNTINGTON, G.B et al. Effects of slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.130, p. 225-241 , 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE**. Estatística de produção pecuária. Dez-2013. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf> Acesso em: jan 2014.
- KASUYA, N. et al. wall degradation of tropical and temperate forage grasses measured by nylon bag and *in vitro* digestion techniques. **Animal Science Journal**, v.79, p. 200-209, 2008.
- KAY, R.N.B.; PHILLIPSON, A.T. The influence of urea and others dietary supplement on the nitrogen content of the digesta passing to the duodenum of hay-fed sheep. **Proceedings of the Nutrition Society**. V.23, XLVI, 1964.
- KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 139, 2002.
- KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P.H. The *in vitro* gas production technique: Limitations and opportunities. **Animal Feed Science and Technology** , v. 123–124, p. 1-7, 2005.
- LASCANO, G.L. Optimizing nutrient utilization of a precision feeding System for dairy heifers using low and high forage diets. Dissertation DPh, Pennsylvania State University, 244 p., 2011.
- LAZARINI, I. et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.10, p. 2021-2030, 2009.
- LEEK, B.F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: DUKES, H.H. **Fisiologia dos animais domésticos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 11^a edição, p. 353-380, 1996.

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

MALAFIA, P. A. M. et al. Determinação e cinética ruminal das frações proteicas de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p. 1243-1251, 1997.

MANELLA, M.Q. **Perfil de aminoácidos e estudo de cinética de degradação ruminal de alimentos em bovinos Nelore recebendo diferentes proporções de concentrado**. Tese (Doutorado) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p. 104, 2004.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n.4, p. 321-330, 1999.

MARI, J.L.; **Intervalo entre cortes em capim-marandu: produção, valor nutritivo e perdas associadas à fermentação da silagem**. Dissertação (Mestrado) - Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p.137, 2003.

MCALLISTER, T.A.; RODE, L.M.; MAJOR, D.J.; CHUNG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 3004-3012, 1994.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.88, 645-650 p., 1977.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; MCDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v.38, p. 433-443, 1977B.

MENKE, K.H. et al. The estimation of the degradability and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they incubated with liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v.93, p.217-222, 1979.

MINSON, D.J.; **Forage in ruminant nutrition**. San Diego: Academic Press, 483 p., 1990.

MINSON, D.J.; WILSON, J.R. Comparative digestibility of tropical and temperate forage a contrast between grasses and legumes. **Journal of the Australian Institute of Agriculture Science**. V46, n.4, p. 247-259, 1980.

NAGA, M.A.; HARMEYER, J.H. Gas and volatile fatty acid production at different rates Of rumen microbial protein synthesis *in vitro* . **Journal of Animal Science**, vol. 40, n. 2, p. 374-379, 1975.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 2001.

NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.8, p.2070-2107, 1988.

NOGUEIRA, U.T.; MAURICIO, RM.; GONÇALVES, L.C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.633-641, 2006.

NUNES, S.G.; BOOCK, A.; PENTEADO, M.I.O. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. 2ed. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1984. 31p. (Documento 21).

OLIVEIRA, L. O. F.; SALIBA, E. O. S.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; FIALHO, M. P. F.; MIRANDA, P. A. B. Parâmetros ruminais e síntese de proteína metabolizável em bovinos de corte sob suplementação com proteinados contendo diversos níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2506-2515, 2009.

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

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro* . **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 1063-1073, 1993.

QUEIROZ, D.S.; GOMIDE, J. A.; MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras: 2. Anatomia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p. 61-68, 2000.

QUEIROZ, M.F.S. **Estimativa do fluxo de nutrientes pelo trato digestivo de bovinos de corte alimentados com *Brachiaria brizantha* (hochst a. rich) stapf. cv. Marandu em duas idades de rebrota**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaobticabal, p.57, 2007.

RAAB, L.; CAFANTARIS, B.; JILG, T.; MENKE, K.H. Rumen protein degradation and biosynthesis .A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro* . **British Journal of Nutrition**. v.50, p. 569-582, 1983.

RIBEIRO, S.S. et al. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, *in situ* degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, p. 53-61, 2011.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B. A.; GIVENS, D. I. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, n. 1, p. 9-30, 2005.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3551-3561. 1992.

RUSSELL, J.B.; SNIFFEN, C.J. Effecto of carbon-4and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.67, p. 987-994, 1984.

RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, p. 119, 2002.

Sa et al. Cinética da fermentação in vitro do capim-Marandu em diferentes idades de corte. **Acta Scientiarum Animal Science**. Maringá-PR, v.33, n.3, p. 225-231, 2011.

SAS INSTITUTE. The SAS system for windows. Release 8.01, Cary, 2000.

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

SATTER, L.D.; ROFFLER, R.E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle **Journal of Animal Science**, v.62, p. 237, 1979.

SHIRLEY, R.L. **Nitrogen and energy nutrition of ruminants**. Florida: Academic Press, p. 356, 1986.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos**. UFV:Viçosa, 3ª edição, p. 235, 2009.

SILVEIRA, J.P.F. et al. Aspectos da degradação sincronizada de nutrientes e seus efeitos na produção de ruminantes. **Unimar Ciências**,v.17, n.1-2, 39-74 p., 2008.

SINCLAIR, L.A.; BLAKE, C.W.; GRIFFIN, P.; JONES, G. H. The partial replacement of soyabean meal and rapeseed meal with feed grade urea or a slow-release urea and its effect on the performance, metabolism and digestibility in dairy cows. *Animal*. v.6, 920-927 p. , 2012.

SLYTER, L. L., BRYANT, M.P.; WOLIN, M.J. Effect of pH on population and fermentation in a continuously cultured rumen ecosystem. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 573, 1966.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, 1992.

SOUZA, M.A. **Consumo, digestibilidade e dinâmica ruminal em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e suplementados com compostos nitrogenados e/ou carboidratos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 44p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

STEWART, W.E.; STEWART, D.G.; SCHULTZ, L.H. Rates of volatile fatty acids production in the bovine rumen. **Journal of Animal Science**, v.17, p. 723-736, 1958.

TAMMINGA, S.; A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, 3112 p., 1996.

TEDESCHI, L. O. FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. Accounting for ruminal deficiencies of nitrogen and branched-chain amino acids in the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. In: **Cornell Nutrition Conference for Feed**. 2000.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n.2, p. 104-111, 1963

VAILHÉ, M.A.B. et al. Effect of phenolic structures on the degradability of cell walls isolated from newly extended apical internode of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, n.3, p. 618-623, 2000.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação Ruminal. In: **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 583p.2006.

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

VELÁSQUEZ, P.A.T. et al. Cinética da fermentação e taxas de degradação de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte estimadas pela técnica de produção de gases *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1695-1705, 2009.

VATTHAUER, R.J.; HINDS, F.C.; GARRIGUS, U.S. Continuous *in vitro* culture system for ruminant research. 2. Biological characterization. **Journal of Animal Science**, v.30, p. 624, 1970.

WILLIAMS B.A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: **Forage Evaluation in ruminant Nutrition**, GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. CAB International, UK, p. 189-213, 2000.

WILSON, J.R. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. **In: Simpósio Internacional sobre Produção Animal em Pastejo**, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV. p. 173-208, 1997.

WILBERT, C.A. et al. Suplementação energética e proteica de um volumoso de baixa qualidade pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro* . **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p.1603-1612, 2011.

ZORZI, K. et al. *In vitro* degradation of neutral detergent fiber of high-quality tropical forage according to supplementation with different nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.5, p.964-971, 2009.

Capítulo 3. Ureia de liberação controlada na cinética de fermentação, síntese de AGCC e desaparecimento do substrato de capim-marandu de diferentes idades sob fermentação *in vitro*

3.1. Resumo

A técnica *in vitro* de produção de gases foi utilizada para avaliar o efeito de níveis crescentes de ureia de liberação controlada sobre lâminas foliares de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em duas idades de rebrotação. Os substratos utilizados foram amostras de capim-marandu com 28 e 65 dias de rebrotação (S_{28} e S_{65}), e as doses testadas foram D_0 , D_{05} , D_{10} e D_{20} , correspondentes a 0, 5, 10 e 20 mg de ureia de liberação controlada (ULC) por g de MS de substrato incubado. Foram avaliados os parâmetros do modelo matemático da cinética de produção de gases em 96 horas de fermentação, o desaparecimento de FDN e MO em 24, 48 e 96 horas de fermentação, assim como pH e a concentração de $N-NH_3$ e AGCC no fluido ruminal. O delineamento foi em blocos casualizados, agrupados por inóculos, em esquema fatorial 2×4 . As variáveis com efeito de interação foram analisadas para as curvas de regressão. Efeitos isolados dos fatores foram analisados por comparação entre médias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não foi observado efeito de doses sobre a produção total ou fracionada de AGCC em 24 e 48 horas de fermentação. Houve efeito de substrato para a síntese de AGVCR – valerato, isovalerato e outros, sendo maiores para o substrato S_{28} , em 24 e 48 horas, indicando maior fermentação proteica. Em 24 horas, frascos contendo substrato S_{28} mantiveram níveis mais baixos de $N-NH_3$ no fluido ruminal que aqueles contendo substrato S_{65} para doses 0, 5 e 10. Em 48 horas, as concentrações de $N-NH_3$ indicam que a fermentação do substrato S_{65} foi mais eficiente na utilização de $N-NH_3$, com concentrações significativamente inferiores de $N-NH_3$ no fluido. O pH encontrado ao final da incubação indica adequação do processo fermentativo favorecendo microrganismos celulolíticos no fluido ruminal. Em relação à cinética fermentativa, S_{28} apresentou menor tempo de colonização, menor potencial de produção de gases e maiores taxas de fermentação (μ) em todos os tempos estudados. A degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e a degradabilidade *in vitro* da FDN corrigida em cinzas (DIVFDN) apresentaram efeito cúbico de doses para o substrato S_{28} durante as 24 horas de incubação. Embora o substrato S_{65} tenha apresentado taxa fermentativa mais lenta, e apresentado menor

degradação de MO e FDN nos períodos de 24, 48 e 96 horas, foi mais eficiente quando avaliado quanto ao fator de partição. Em 24 e 48 horas de incubação apresentou maior eficiência na degradação de MO e FDN. Em 96 horas manteve maior eficiência para degradação de FDN, porém sem diferenças significativas para degradação de MO. Em conclusão, o fornecimento de ureia de liberação controlada (ULC) em lâminas foliares de capim-marandu foi mais eficiente na redução de N-NH_3 em substratos com 65 dias de idade de rebrotação entre 24 e 48 horas de fermentação, que pode indicar maior conversão em proteína microbiana.

Palavras chave: ácidos graxos de cadeia curta, braquiário, nitrogênio amoniacal, maturidade, produção de gases.

3.2. Abstract

The technique of *in vitro* gas production was used to evaluate the effect of increasing levels of slow-release urea on leaf blades *Brachiaria brizantha* cv. Marandu in two regrowth ages. The substrates used were samples Marandu-grass after 28 and 65 days of regrowth (S_{28} and S_{65}), and doses tested were D_0 , D_{05} , D_{10} and D_{20} , corresponding to 0, 5, 10 and 20 mg of urea slow-release (USR) per g DM incubated substrate. The parameters of the mathematical model of the kinetics of gas production at 96 hours of fermentation, the disappearance of NDF and OM 24, 48 and 96 hours of fermentation, as well as pH and the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ and SCFA in ruminal fluid were evaluated. The design was randomized blocks, grouped by inocula in a factorial 2 x 4. Effects of isolated factors were analyzed by comparing averages by Tukey test ($p < 0.05$). No dose effect was observed on total production of SCFA and fractionated at 24 and 48 hours of fermentation. An effect of substrate for the synthesis of VFA - valerate, isovalerate and others being higher for substrate S_{28} , 24 and 48 hours, indicating higher protein fermentation. In 24 hours, flasks containing substrate S_{28} maintained lower levels of $\text{NH}_3\text{-N}$ in rumen fluid than those containing substrate S_{65} for doses 0, 5 and 10. Within 48 hours, the concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ indicate that fermentation substrate S_{65} was in more efficient use of $\text{NH}_3\text{-N}$, with significantly lower concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ in the fluid. The pH found at the end of the incubation indicates suitability of the fermentation process favoring cellulolytic

microorganisms in rumen fluid. Regarding the fermentation kinetics, S_{28} showed lower colonization time, less potential for gas production and higher fermentation rates (μ) at all time points. DVMO DVFDN and had a cubic effect doses for the substrate S_{28} during 24 hours of incubation. Although the substrate S_{65} has shown slower fermentation rate, and showed less degradation of OM and NDF in periods of 24, 48 and 96 hours, was more efficient when assessed for Factor Partition. At 24 and 48 hours of incubation was more efficient in the degradation of OM and NDF. At 96 hours remained greater efficiency for degradation of NDF, however, no significant differences for the degradation of OM. In conclusion, the supply of urea Slow-Release in leaf blades Marandu-grass was more effective in reducing NH_3 substrates 65 days old regrowth between 24 and 48 hours of fermentation, which may indicate higher conversion to microbial protein.

Keywords: short chain fatty acids, braquiara, ammonia nitrogen, maturity, gas production.

3.3. Introdução

Os animais consumindo pasto tropical com altos teores de proteína durante a época chuvosa não apresentam ganhos de peso similares àqueles consumindo pastos de clima temperado. A deficiência metabólica é decorrente à composição fracional da proteína que compõe o alimento (DETMANN; PAULINO; VALADARES FILHO, 2005). A alta concentração de proteína solúvel que é encontrada nas frações A (compostos nitrogenados não proteicos) e B1 (aminoácidos e peptídeos), permitem perdas de nitrogênio na forma de amônia, devido à sua alta degradabilidade ou descompasso entre a velocidade de degradação de nitrogênio e carboidratos fibrosos presentes.

A idade de rebrotação também influi na concentração de proteínas mais solúveis nos tecidos vegetais. Henriques (2004) encontrou menores níveis de compostos nitrogenados não proteicos com o aumento da idade de rebrotação em gramíneas tropicais, indicando a diferença na composição bromatológica e diferentes potenciais de degradação de nutrientes entre plantas jovens e maduras.

A utilização da FDN no trato gastrointestinal do ruminante é influenciada pelos demais componentes dietéticos e a variação na intensidade de sua utilização e eficiência como fonte energética da dieta depende de como atuam os complexos enzimáticos dos microrganismos em sua degradação (ARROQUY; COHCRAN; NAGARAJA, 2005 e SOUZA, 2007). Clark; Klusmeyer; Cameron (1992) e NRC (2001) indicam que a disponibilidade ruminal de energia e proteína são os fatores mais limitantes para o crescimento microbiano e, para potencializar a fermentação e a síntese de proteína microbiana, é necessário a sincronização da energia fermentável disponível e da proteína degradável no rúmen.

Microrganismos celulolíticos utilizam nitrogênio na forma de amônia para síntese proteica. A proteína verdadeira fornecida é degradada à amônia, enquanto os microrganismos amilolíticos necessitam de aminoácidos e peptídeos para síntese microbiana.

O nitrogênio presente na ureia é convertido via amônia em proteína microbiana no rúmen, suprimindo assim a demanda proteica do animal hospedeiro. O uso de ureia, no entanto, deve ser feito com precauções, já que a pronta hidrólise em amônia leva a maior absorção pela parede ruminal e maiores concentrações séricas, com efeito de depleção no consumo de alimentos, desempenho produtivo ou mesmo morte dos animais por intoxicação.

O uso de ureia de liberação controlada tem se mostrado alternativa viável para a suplementação de ureia na alimentação de ruminantes, por sua segurança nos níveis de amônia liberados durante o tempo de permanência no rúmen, além de promover maior sincronização entre os nutrientes disponíveis para a fermentação ruminal.

Para avaliação da degradabilidade das forragens e seu potencial fermentativo, as técnicas de produção de gases *in vitro* têm sido amplamente utilizadas, devido à sua facilidade de adoção, repetitividade e custos reduzidos, com capacidade de prover dados de cinética ruminal e taxas de digestão para a avaliação da qualidade nutricional de ingredientes (GETACHEW et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de sincronização de fornecimento de nitrogênio associado à degradabilidade de parede celular de gramíneas tropicais para síntese microbiana, a partir do uso de ureia de liberação controlada. Foi avaliado efeito na disponibilidade gradual de N-NH₃ no rúmen, sua eficiência de utilização na síntese de AGCC,

cinética de fermentação e degradabilidade da MO e de FDN, sob a técnica de fermentação *in vitro*.

3.4. Material e métodos

3.4.1. Local

O experimento foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), no Campus de Pirassununga - São Paulo - Brasil, com localização geográfica de 21°59' de latitude sul, 47°26' de longitude oeste (W.Gr), e altitude média de 635 m. De acordo ao sistema de internacional de Köppen, o clima é classificado com Cwa - mesotérmico temperado de inverno seco, com temperatura média anual de 20,8°C e precipitação pluviométrica média anual de 1298 mm.

3.4.2. Substrato

As amostras de forragem foram coletadas de canteiros cultivados no Campo Agrostológico da FZEA – USP, localizado no Campus de Pirassununga-SP, no período de dezembro de 2013 a fevereiro de 2014, em área cultivada de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em dois canteiros de 9 m² (3 x 3 m) cada. Foram analisadas amostras de solo, e a partir dos resultados obtidos, os canteiros foram uniformizados à altura de 15 cm do solo, e adubados com nitrogênio na forma de ureia agrícola para fornecer o equivalente a 60 kg N/ha.

Cada canteiro foi dividido em duas partes iguais, de forma que duas colheitas foram realizadas no tempo e em cada uma delas metade do canteiro foi cortado. A primeira colheita de amostras de forragem foi realizada às 9 h com 28 dias de rebrotação e o capim tinha altura aproximada de 25-30 cm, sendo denominado substrato S₂₈. O segundo corte foi realizado, também, às 9 h com 65 dias de rebrotação da metade do canteiro que não havia sido colhido, e o capim tinha altura aproximada de 90 cm, denominado substrato S₆₅.

Após a colheita, as amostras foram pesadas e pré-secadas em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C por 72h. Em seguida, este material foi separado nas frações lâmina foliar,

bainha-colmo e material senescente. Cada fração foi pesada após a secagem, e a relação foi de 74: 18: 8 e 37: 42: 21, para os substratos S_{28} e S_{65} , respectivamente. O substrato S_{65} apresentava-se com inflorescência, cujo material foi incluso na fração bainha-colmo. As amostras eram compostas de material vegetal dos dois canteiros. As frações foram moídas, separadamente, em moinho tipo Willye modelo TE-650 marca Tecnal em peneira de 1 mm e armazenadas. Apenas a porção lâmina foliar foi utilizada para as avaliações.

3.4.3. Ureia de liberação controlada (ULC)

Adicionalmente ao substrato, foram aplicadas doses de ureia de liberação controlada fornecido pela Alltech. Este produto é composto por grânulos de ureia e resíduo de fermentação fúngica, e encapsulados por uma camada de cera, que proporciona a liberação lenta de seu conteúdo. O produto apresenta garantias mínimas de 2.562,5 g de NNP equivalente proteico por kg, e mínimo de 410 g de NNP por kg.

Para manter maior homogeneidade no comportamento de solubilidade no fluido ruminal, o produto foi separado em peneiras de 2,8; 2,38; 1,4 mm e fundo, sendo utilizado neste experimento somente a fração granulométrica retida em malha de 1,4 mm. Nesta fração, a massa de um grânulo foi mais próxima à menor dose testada (Figura 3)

Figura 3. Perfil granulométrico da ULC (%)

Foram testadas neste experimento as doses referentes a 0, 5, 10 e 20 mg ULC/g MS de substrato. O aporte proteico a partir da suplementação com ULC está descrito abaixo. Os teores proteicos na MS variaram entre 9,9% a 15,5% da MS, e considerados similares entre ambos substratos (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Relação de PB (%MS) suplementada a partir da ULC

	S ₂₈	S ₆₅
Dose 0	10,4	9,9
Dose 5	11,7	11,2
Dose 10	13,0	12,3
Dose 20	15,5	15,0

Tabela 4. Composição bromatológica de lâmina foliar de capim-marandu aos 28 e 65 dias (S₂₈ e S₆₅) após rebrotação e de ureia de liberação controlada (ULC)

	MS (% MN)	PB (%MS)	EE (%MS)	CNF (%MS)	FDNcp (%MS)	MM (%MS)	FDN (%MS)	PIDN (%PB)	FDA (%MS)
S ₂₈	18,0	10,4	1,9	28,9	49,4	9,3	54,9	45,0	25,54
S ₆₅	24,9	9,9	2,2	24,5	58,2	7,5	64,5	54,3	31,77
ULC	9,6	270,6	3,3			0,1			

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Solos da FZEA-USP. Foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB) como descrito por Silva e Queiroz (2009).

Para os substratos, as determinações de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio em detergente ácido (NIDA) foram adaptadas de Goering; Van Soest (1970), excluindo a inclusão de amilase e sulfito de sódio, visto que se tratou de amostras de forragens, de baixos teores de amido e foi determinado no resíduo FDN o teor de proteína remanescente (NIDN).

3.4.4. Fermentação *in vitro*

No dia da inoculação foi coletado manualmente frações de líquido e sólido ruminal de 2 animais fistulados da raça Nelore, com 16 e 18 meses de idade pesando aproximadamente 300 e 350 kg, mantidos em pastejo, com suplementação mineral e água *ad libitum*. O animal 1 era

mantido em pastagem de capim-mombaça e o animal 2 era mantido em pastagem de capim-marandu. Ambos suplementados com sal mineral contendo 40 g de fósforo.

As frações recolhidas de conteúdo ruminal de cada animal foram mantidas em garrafas térmicas previamente aquecidas à temperatura de 39°C. Prontamente, ao final da coleta, foram levadas ao laboratório onde partes iguais das frações sólida e líquida foram misturadas em liquidificador por 10 segundos sob injeção contínua de CO₂. Este material foi filtrado em camada dupla de panos de algodão, acondicionados em frascos de vidro âmbar, ainda, sob injeção de CO₂, e mantidos fechados em estufa a 39°C, sendo então adicionados aos frascos de fermentação. Um inóculo composto por alíquotas iguais dos animais 1 e 2 foi utilizado como terceira repetição.

Valores de pH de cada inóculo foram determinados ao início da incubação, sendo reservada uma amostra (inóculo 01, 02 e 03) para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

No dia anterior à inoculação, foi preparado sob fluxo contínuo de CO₂ o meio de cultura, e mantido em estufa a 39°C, segundo Theodorou et al. (1994) modificada por Maurício et al. (1999). Foram pesadas amostras pré-secadas de 1,0 g dos substratos S₂₈ e S₆₅ e moídas a 1 mm para a incubação. Cada repetição foi incubada em triplicata, em frascos de vidro de volume 160 mL, previamente lavados, enxaguados com água destilada e secos em estufa a 50°C. Em cada garrafa foi adicionado ao substrato a dose testada de ULC (mg). Os frascos foram mantidos fechados, e 3 h antes da inoculação, mantidos em temperatura de 39°C.

Uma hora antes da inoculação foi adicionado em cada garrafa 90 mL de solução meio de cultura e todas eram mantidas em estufa a 39°C. A inoculação foi realizada com alíquotas de 10 mL de inóculo (mistura das frações sólida e líquida de conteúdo ruminal) sob injeção contínua de CO₂. Os frascos foram vedados com tampas de borracha e imediatamente acondicionados em estufa de ventilação forçada a 39°C, dando início ao tempo 0 de incubação. Outros frascos contendo somente inóculo (50% líquido ruminal + 50% sólido) e solução meio de cultura, foram inoculados como “branco” para posterior correção para todas as variáveis avaliadas, a partir da fermentação (Tabela 5).

Tabela 5. Solução final do meio de cultura utilizado para a fermentação *in vitro*.

Ingredientes:	mL.L⁻¹
Água destilada	520,3
Sol. Microminerais	0,1
Sol. Tampão	208,1
Sol. Macrominerais	208,1
Sol. Rezasurim	1,0
Meio B	62,4
Solução de Microminerais	g.L⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	132
MnCl ₂ .4H ₂ O (g)	100
CoCl ₂ .6H ₂ O (g)	10
FeCl ₃ .6H ₂ O(g)	80
Solução Tampão	g.L⁻¹
NH ₄ HCO ₃ (g)	4
NaHCO ₃ (g)	35
Meio B	100mL⁻¹
Cysteine HCl (g)	625
Água destilada (mL)	95
NaOH 1M (mL)	4
Na ₂ SO ₃ (g)	3 ₂₈ ,13
Solução de Rezasurim	100mL⁻¹
Rezasurim (g)	0,01

3.4.5. Variáveis analisadas

3.4.5.1. Nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

Alíquotas de 6 mL do fluido foram colhidas após aberturas dos frascos incubados, nos tempos 6, 12, 24, 48 e 96 h em cada duplicata de tratamento. A estas amostras foram adicionadas 3 gotas de H₂SO₄ (96% de pureza) a fim de manter solubilizada a amônia presente, e foram mantidas congeladas.

O descongelamento foi feito no momento das análises em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 3000 rpm. Destas amostras centrifugadas foram coletadas duas subamostras de 2 mL, para análise.

O método adaptado de Fenner (1965) dispensa a digestão prévia a quente com ácido sulfúrico, sendo realizada a destilação de 2 mL do fluido em procedimento similar ao Micro-Kjeldahl, porém na presença de solução de hidróxido de potássio 2N (KOH). O material destilado foi adicionado a 10 mL de ácido bórico a 2% com os indicadores vermelho de metila e azul de metileno. O volume destilado foi titulado com ácido clorídrico 0,02N (HCl).

O mesmo método foi aplicado para a determinação de N-NH_3 dos inóculos no momento da incubação.

3.4.5.2. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Nos tempos 24 e 48 h de fermentação foi coletada, para cada repetição de tratamento, uma alíquota de fluido composta em duplicata, no volume de 1,8 mL, à qual foi adicionado 0,2 mL de ácido fórmico (P.A.), e mantida congelada para posterior determinação de AGCC.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. As configurações utilizadas para análise foram: gás de arraste: hélio na vazão de 8,01 mL/minuto; gás comburente: ar sintético na pressão de 40 kPa; gás combustível: hidrogênio na pressão de 60 kPa; temperaturas de operação: injetor a 250°C, coluna a 145°C (isotérmica), detector de ionização de chama (FID) a 250°C. Coluna: Capilar – Stabilwax/30m de comprimento/0,53mm de diâmetro interno. Calibração: Injeções de 1 micro-litro da solução de padrão misto e uma curva estabelecida no software (GCsolution Shimadzu).

A partir das leituras observadas para ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico, foi calculada a produção total de AGCC (AGCC TOT) (mM), a relação entre os ácidos acético:propiônico:butírico:outros, a relação entre acético:propiônico, e o fator de partição (mM AGCC TOT: mL gás produzido), nos tempos 24 e 48 h de fermentação.

3.4.5.3. pH do fluido ruminal

O pH de amostras dos inóculos ao início (t_0) e ao final da fermentação (t_{96}) foi determinado por um potenciômetro digital, calibrado com soluções tampão para pH 4,0 e 7,0.

3.4.5.4. Perfil cumulativo de gases e taxa de fermentação

As leituras de pressão foram realizadas através de um medidor de pressão (transdutor e datalogger PressDATA 800) acoplado a uma válvula de 3 vias, sendo uma saída ligada ao transdutor, outra saída ligada a uma agulha de 20 mm x 0,7 mm e a terceira saída ligada a uma seringa graduada em ml, permitindo o registro do volume de gases acumulados no espaço livre de cada frasco.

As leituras da produção de gases foram feitas nos tempos 04, 08, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas a partir do tempo 0 de incubação.

Baseado nas leituras de pressão e volume (psi e mL) realizadas, foi traçada a curva quadrática de regressão, de correlação $r^2 = 0,973$, utilizada como equação de conversão entre a leitura de pressão (psi) obtida dos frascos de fermentação, para volume de gases produzido (mL).

$$Y = 0,1559x^2 + 4,0127x \text{ , onde} \quad (5)$$

Y = volume de gás (mL)

x = leitura da pressão (psi)

Figura 4. Regressão quadrática entre pressão (psi) e volume de gás (ml) para fermentação *in vitro* em 96 horas de incubação.

A partir destas medidas, previamente descontadas dos resultados obtidos para os frascos brancos de fermentação, foi calculada a relação entre volume de gases acumulado (mL) por matéria orgânica de substrato incubado (g). Foi adotado o modelo exponencial descrito por France et al (1993) para definir os padrões de fermentação microbiana a partir da média da produção acumulada de gases das réplicas de cada tratamento. O modelo foi ajustado aos dados de produção de gases para estimar o tempo de colonização (L) e a produção potencial de gases (A = assíntota de produção de gases) no procedimento não linear do programa SAS (2001).

A partir dos dados corrigidos, foram calculados parâmetros como a taxa fermentativa (μ) e o tempo necessário para que a curva atingisse 50% da produção de gases ($t_{1/2}$).

Coeficientes que indicam a eficiência fermentativa foram calculados a partir dos dados de fermentação e produção de gases:

R_1 : produção acumulada de gases (mL.gMO⁻¹) por 48 horas em relação ao mesmo indicador por 96 horas de incubação.

R_2 : Produção acumulada de gases (mL.gMOinc^{-1}) por 96 horas de incubação em relação à assíntota A (potencial de produção máxima de gases)

Assumindo uma taxa de passagem de $0,2\%.\text{h}^{-1}$, e a permanência do alimento por 48 horas no rúmen, o coeficiente calculado R_1 indica a eficiência fermentativa em 48 horas de permanência do alimento no rúmen. O coeficiente calculado R_2 estima o potencial da atividade fermentativa nos tratamentos testados.

O fator de partição referente à síntese de AGCC (mM) ou AGVCR (mM) e a relação destes com a produção de gases indica o aproveitamento da matéria orgânica incubada que foi fermentada produzindo AGCC e AGVCR. Este coeficiente foi calculado a partir do valor de AGCC e AGVCR sintetizados nos tempos de 24 e 48 horas de fermentação e o volume acumulado de gases (mL) por grama de matéria orgânica incubada nos períodos.

3.4.5.5. Degradabilidade do substrato após a fermentação e eficiência fermentativa (FP)

Nos tempos 24, 48 e 96 horas após incubação, foi determinado em triplicata para cada repetição, de cada tratamento, o FDN (fibra em detergente neutro), como descrito por Chai; Udén (1998). Após abertura das garrafas, foi adicionado 50 mL de solução detergente neutro (DN). Após adição da solução DN três vezes mais concentrada e dispensada de sulfito de sódio e amilase, as garrafas foram mantidas fechadas com papel alumínio, em estufa a 90°C , por 16 horas. O resíduo obtido foi filtrado em cadinhos de vidro com porosidade 1, em bomba a vácuo, com lavagem tripla de água quente e destilada, num volume de 500 mL, até remoção máxima da solução DN. O resíduo foi seco em estufa a 105°C por 12 h, e pesado, para a determinação do FDN do residual. Em seguida, foi incinerado em mufla a 500°C por 4 horas, e novamente pesado, para a determinação de cinzas do FDN residual.

A partir dos valores determinados, foi calculada a degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DIVMO) e a degradabilidade da parede celular corrigido para cinzas (DIVFDN) dos substratos fermentados.

Estes dados também foram aplicados para o cálculo do fator de partição (FP) nos tempos 24, 48 e 96 horas de incubação, definido pela DIVMO (mg.g^{-1}) em relação a produção acumulada de gases (mL) nos tempos propostos (t_{24} , t_{48} e t_{96}).

3.4.5.6. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados e o experimento em fatorial 2 x 4, sendo os tratamentos agrupados em 3 inóculos distintos (blocos), considerados também como repetições do experimento.

- Fator A (substratos de diferentes idades de rebrotação) = 2 níveis - S_{28} e S_{65}
- Fator B (doses Ureia de liberação controlada) = 4 níveis - D_0 , D_5 , D_{10} , D_{20}

Algumas variáveis tiveram avaliações repetidas no tempo, como AGCC (24 e 48h), N-NH_3 (6, 12, 24, 48 e 96h) e taxa de fermentação.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, de acordo com o programa estatístico SAS (2001) a 5% de significância.

3.4.6. Resultados e discussão

3.4.6.1. pH ruminal

Ao início da incubação, em t_0 , o pH observado para os inóculos foi em média 6,57, refletindo as condições de alimentação dos animais doadores, mantidos exclusivamente sob pastejo em pasto de capim-mombaça e capim-marandu. Estes valores são semelhantes aos indicados por Hoover et al. (1986) e Ørskov (1998), que mencionam o pH mínimo de 6,2 manter a fermentação ruminal, atividade dos microrganismos celulolíticos e a digestão da fibra.

Após 96 horas de fermentação, os frascos controle (branco – sem adição de substratos e doses), apresentaram pH médio de 7,57.

Houve diferença ($p < 0,01$) entre os substratos. O substrato S_{28} , composto por lâminas foliares de capim-marandu aos 28 dias de rebrotação, apresentou valores maiores de pH para todas as doses de ULC avaliadas. Os substrato S_{65} , referente aos 65 dias de rebrotação, apresentou pH inferior. Os valores observados estão de acordo aos encontrados por Goes et al. (2003), variando entre 6,73 e 7,05 desde 0 a 12 h após consumo forragem com suplementação mineral, respectivamente. Para os animais consumindo suplemento com alto teor de nitrogênio não proteico, o pH ficou entre 7,4 e 7,21, para o mesmo período avaliado, e foram diferentes estatisticamente entre os todos os tempos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de pH observados em fluido ruminal após 96 horas de fermentação *in vitro*

	D ₀	D ₅	D ₁₀	D ₂₀	Média
S_{28}	7,08	7,10	7,11	7,12	7,10 ^A
S_{65}	7,06	7,03	7,04	7,09	7,06 ^B
Média	7,07	7,07	7,08	7,11	7,08

S_{28} = Substrato folhas de capim-marandu com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim-marandu 65 dias. D₀ = Dose 0 mg.g MS substrato⁻¹, D₅ = Dose 5 mg. MS substrato⁻¹, D₁₀ = 10 mg. MS substrato⁻¹, D₂₀ = 20 mg. MS substrato⁻¹. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,01$).

3.4.6.2. Nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH₃)

Os valores de N-NH₃ encontrados variaram entre os tempos avaliados e os tratamentos estudados, e atenderam os níveis mínimos necessários de 2 a 5 mg N.dL⁻¹ para a digestibilidade da matéria orgânica segundo Satter; Slyter (1974). Em alguns casos, os valores estiveram entre 10 e 20 mg N.dL⁻¹, como sugerido por Leng (1990) para dietas baseadas em alimentos de clima tropical.

A concentração de amônia pode influir sobre a degradação da fibra quando não atinge os teores mínimos necessários para a fermentação das bactérias celulolíticas, no entanto vários autores discordam sobre os teores ótimos para a máxima degradação da fibra. Van Soest (1994) sugere que cada dieta apresenta um nível ótimo de concentração de N-NH₃, já que a capacidade de uso de N-NH₃ e síntese de proteína microbiana depende da taxa de fermentação, e maior fermentação indica maior eficiência, acompanhado por maior utilização da amônia disponível.

Assim, se o N-NH_3 e energia não estiverem sincronizados, a concentração de N-NH_3 ruminal não será constante, apresentando picos entre sua disponibilidade e utilização ao longo do tempo.

Foi observado efeito significativo para interação entre substratos e doses em todos os tempos avaliados ($p < 0,01$), indicando que em cada tempo houve um padrão distinto de resposta para cada substrato com a inclusão das doses de ULC. Não houve, portanto, um comportamento constante na concentração de N-NH_3 ruminal ao longo do tempo avaliado. Foi então realizado o desdobramento das interações, e a avaliação do efeito de substratos e doses para os tempos 24, 48 e 96 de incubação para melhor compreensão do comportamento destas variáveis.

Ao final de 24 horas de fermentação, houve efeito significativo ($p < 0,01$) na concentração ruminal de N-NH_3 para as doses de ULC e para a interação entre as doses e o substrato, indicando que em cada idade de rebrotação, houve comportamento diferente da concentração de amônia para as doses crescentes de ULC. Amostras de blank apresentaram valor médio de $1,97 \text{ mg N-NH}_3.\text{dL}^{-1}$.

Apesar da concentração de N-NH_3 no fluido ruminal ter sido estatisticamente superior para o substrato S_{28} durante as primeiras 24 horas de fermentação, para as doses D_0 , D_5 e D_{10} foram inferiores e somente a partir da dose D_{20} apresentou pico de concentração ($12,6 \text{ mg.dL}^{-1}$) elevando a média do substrato (Tabela 7).

O substrato de folhas jovens (S_{28}) foi mais eficiente em manter a concentração de N-NH_3 reduzida durante as primeiras 24 horas de fermentação para as doses D_0 , D_5 , D_{10} . Este fato pode estar relacionado ao maior teor de carboidratos solúveis neste estágio de maturidade, fração a qual seria aporte energético e de cadeia carbônica junto à FDN degradada para a síntese de microrganismos. Inclusive o substrato S_{28} que não continha ULC (D_0) pode ter sido favorecido quanto à utilização de N-NH_3 ruminal de origem vegetal, visto que manteve-se mais baixa a concentração que o substrato S_{65} .

Para a dose D_{20} , o substrato S_{28} apresentou teor de N-NH_3 significativamente superior ao substrato S_{65} , evidenciando que o aporte de carboidratos solúveis foram suficientes para manter reduzido o N-NH_3 até a dose D_{10} , a partir da qual teria havido excedente de nitrogênio e consequente aumento na concentração de N-NH_3 . Da mesma forma, o menor teor de N-NH_3

para o substrato S_{65} , com a mesma dose de 20 mg de ULC indica que durante o período, a ação fibrolítica sobre a degradação da parede celular para este substrato foi eficiente e sincronizada na utilização do $N-NH_3$ disponível no rúmen .

Ferreira et al. (2005) observaram aumento de $N-NH_3$ após 1,5 h de suplementação tanto com ULC como com ureia convencional. No entanto, as concentrações séricas foram mais elevadas para o tratamento que recebeu ureia convencional entre 0,5 e 3,5 h após o consumo, demonstrando que o $N-NH_3$ removido do rúmen foi melhor utilizado para síntese de proteína microbiana quando suplementado com ULC, evidenciando que a liberação lenta de amônia deste ingrediente, favorece a síntese microbiana.

Tabela 7. Concentração média de $N-NH_3$ ($mg.dL^{-1}$) no líquido ruminal em 24 horas de fermentação *in vitro*

	D ₀	D ₅	D ₁₀	D ₂₀	Média
S_{28}	2,70 ^d	8,19 ^b	5,56 ^c	12,62 ^{aA}	7,27 ^A
S_{65}	4,67 ^b	9,31 ^a	6,02 ^b	6,58 ^{bB}	6,65 ^B
Média	3,69	8,75	5,79	9,60	6,96

S_{28} = Substrato folhas de capim-marandu com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim-marandu 65 dias. D₀ = Dose 0 mg.g MS substrato⁻¹, D₅ = Dose 5 mg. MS substrato⁻¹, D₁₀ = 10 mg. MS substrato⁻¹, D₂₀ = 20 mg. MS substrato⁻¹. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si, e médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,01$).

Ambos substratos apresentaram comportamento aproximado para a dose de 5 mg. Este fato pode estar associado às características da fonte de ULC testada neste experimento. Mesmo em uma fração granulométrica selecionada, haviam partículas de diâmetros diferentes, assim como diferenças na espessura da camada de cobertura que protege o produto da rápida solubilização no ambiente ruminal. Para adequar o produto à dose mínima foi utilizado somente um grânulo, que tivesse peso mais aproximado a 5 mg. Para estas condições foram selecionadas partículas de menor espessura de camada. Assim, este produto poderia ter apresentado maior solubilidade em 24 h que as demais doses compostas por um número maior de partículas, que teriam efeito mais representativo do comportamento de solubilidade da ULC testada.

Em todos os tratamentos, os teores de $N-NH_3$ encontrados foram similares aos encontrados em literatura. Bueno (2001), estudando espécies de planta forrageira, encontrou

para *Brachiaria decumbens*, com teor inicial de 4,5% de PB na MS, teores médios de N-NH₃ em torno de 2 mg.dL⁻¹ em 24 h, e para Tifton, com teor inicial de PB de 7,5%, os teores médios variaram entre 5 e 15 mg.dL⁻¹. A leguminosa estudada, alfafa, com teor de PB inicial de 19% na MS, apresentou concentração na faixa de 5 a 30 mg.dL⁻¹ em 24 h de fermentação. Assim como para leguminosas, a suplementação com ULC aumentou os níveis de N-NH₃ do líquido ruminal, durante as 24 h de fermentação.

Observa-se que durante as primeiras 24 horas de fermentação, a suplementação com 5 e 10 mg. kg MS⁻¹ são adequadas para ambos substratos, mantendo os níveis de N-NH₃ ruminal superiores a dose 0, que apresentou valores margeando o mínimo de 2 a 5 mg.dL⁻¹ para manter adequada a fermentação ruminal (SATTER; SLYTER,1974). A suplementação com 20 mg. kg MS⁻¹ foi eficientemente utilizada pelos microrganismos em S₆₅, visto que nesta dose, o N-NH₃ foi mantido significativamente inferior.

Tabela 8. Equações de regressão ajustadas em função de substratos e doses testadas, e as concentrações médias de N-NH₃ (mg.dL⁻¹) no líquido ruminal após 48 horas de fermentação *in vitro*.

Substrato	Regressão				r ²
S ₂₈	6,2092 + 0,2898D				0,6795
S ₆₅	0,1442 + 0,2898D				0,8915
	D ₀	D ₅	D ₁₀	D ₂₀	Média
S ₂₈	6,25	6,49	10,05	12,18	8,74 ^A
S ₆₅	0,34	2,16	2,51	5,71	2,68 ^B
Média	3,30 ^c	4,33 ^c	6,28 ^b	8,94 ^a	5,71

S₂₈ = Substrato folhas de capim-marandu com 28 dias, S₆₅ = Substrato folhas de capim-marandu 65 dias. D₀= Dose 0 mg.g MS substrato⁻¹, D₅ = Dose 5 mg. MS substrato⁻¹, D₁₀ = 10 mg. MS substrato⁻¹, D₂₀ = 20 mg. MS substrato⁻¹. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si, e médias seguidas de letras maiúsculas na mesma coluna diferem entre si (P<0,01).

Durante 48 horas de fermentação houve diferenças significativas entre os substratos e as doses, porém sem interação entre elas. Assim, os substratos S₂₈ e S₆₅ mantiveram-se em faixas distintas de concentração de N-NH₃, no entanto, comportaram-se similarmente ao efeito das doses de ULC. Amostras de blank apresentaram valor médio de 2,16 mg N-NH₃.dL⁻¹.

Considerando que a degradação da fração fibrosa é mais lenta que a fração de carboidratos solúveis, alimentos que contenham maior teor de parede celular forneceriam

maior aporte energético para a síntese proteica no período de 48 horas de fermentação, mantendo assim a concentração de N-NH_3 mais baixa no rúmen. A liberação de ULC tem sido estudada, e indica que parte do N é solubilizado durante as primeiras 18 horas, e outra porção solubilizada mais lentamente, no período de 18 a 30 horas (AKAY et al., 2004). Assim, neste período, a sincronização entre FDN incubado e doses de ULC foram de maior eficiência para síntese proteica.

Após 96 horas de fermentação houve diferenças significativas dos efeitos de substratos e doses utilizados, sem efeito de interação entre os mesmos ($P < 0,01$). Amostras de blank apresentaram valor médio de $2,40 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{dL}^{-1}$.

Neste período avaliado, a concentração de N-NH_3 foi mantida alta, que pode ser decorrente ao início da morte de protozoários que ocorre em ensaios *in vitro* 72 horas de fermentação.

Embora os teores de N-NH_3 para os frascos fermentados com S_{65} tenham permanecido inferiores ao substrato S_{28} , o comportamento foi similar para todas as doses, indicando a perda de microrganismos em todos os tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9. Equações de regressão ajustadas em função de substratos e doses testadas, e as concentrações médias de N-NH_3 ($\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) no líquido ruminal após 96 horas de fermentação *in vitro*

Substrato	Regressão				r^2
S_{28}	$9,7364 + 0,3675D$				0,8743
S_{65}	$4,0896 + 0,3675D$				0,7992
	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média
S_{28}	11,18	10,77	14,56	15,94	13,11 ^A
S_{65}	2,71	7,07	6,63	12,81	7,30 ^B
Média	6,94 ^C	8,92 ^{bc}	10,59 ^b	14,34 ^a	10,21

S_{28} = Substrato folhas de capim-marandu com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim-marandu 65 dias. D_0 = Dose 0 $\text{mg} \cdot \text{g MS substrato}^{-1}$, D_5 = Dose 5 $\text{mg} \cdot \text{g MS substrato}^{-1}$, D_{10} = 10 $\text{mg} \cdot \text{g MS substrato}^{-1}$, D_{20} = 20 $\text{mg} \cdot \text{g MS substrato}^{-1}$. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, e médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,01$).

3.4.6.3. Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Os resultados de AGCC obtidos para 24 horas de fermentação estão descritos na Tabela 10. Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) para efeito de substrato ou doses de ULC sobre os percentuais de AGCC e na relação acético: propiônico em ensaio rápido de fermentação de 24 horas. A produção total de AGCC foi em média 35,16 mM, inferior ao encontrado para o capim-marandú por Velásquez (2009) de 44,96 mM, para o mesmo período, não sendo afetada pelos tratamentos aplicados, assim como a eficiência microbiana na produção de AGCC em relação a matéria orgânica verdadeiramente degradada ou à produção acumulada de gases em 24 horas.

No entanto, o substrato S_{28} apresentou maior concentração de outros AGCC, representado pela soma de isobutírico, valérico e isovalérico, assim como para as concentrações individuais encontradas para isovalerato.

Segundo Stewart; Stewart; Schultz, (1958) a suplementação com ureia não estimulou a formação de AGCC. Houve, no entanto, maior síntese de valerato nas dietas de feno+ureia, quando comparado à dietas somente com feno, ou feno+grãos+ureia, devido à deaminação de aminoácidos por excesso de proteínas no rúmen. Segundo Barbosa et al. (2001), a suplementação de gramíneas de baixa qualidade com farelo de soja aumentou a produção total de AGCC, e aumentou a relação (AGVCR – ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada), como isobutírico e isovalerico, que pode indicar alta taxa de desaminação de aminoácidos relacionados aos níveis de amônia no rúmen. Coelho (2002) também encontrou aumento para o ácido butírico, em bezerros suplementados com leite em pós-reconstituição. As características iniciais da forragem incubada, como o menor teor de proteína ligada ao FDN (PIDN) encontrada nas planta forrageira com menor idade de rebrotação, influenciaram nestas variáveis.

Tabela 10. Teores de AGCC encontrados no fluido ruminal após 24 horas de incubação pela técnica de fermentação *in vitro*, e a relação de eficiência referente a degradabilidade da MO

		<i>D</i> ₀	<i>D</i> ₅	<i>D</i> ₁₀	<i>D</i> ₂₀	média		<i>D</i> ₀	<i>D</i> ₅	<i>D</i> ₁₀	<i>D</i> ₂₀	média
ACET (%)	<i>S</i> ₂₈	56,01	58,06	51,97	61,72	56,94	ISOBUT (%)	1,56	0,95	0,83	0,85	1,05
	<i>S</i> ₆₅	58,07	61,45	59,67	57,36	59,14		1,14	0,38	0,30	1,36	0,8
	Média	57,04	59,76	55,82	59,54	58,04		1,35	0,67	0,57	1,11	0,92
PROP (%)	<i>S</i> ₂₈	27,80	26,69	26,50	25,19	26,54	VAL (%)	2,04	2,04	2,99	1,58	2,16 ^a
	<i>S</i> ₆₅	28,05	25,26	26,79	28,41	27,13		1,42	1,51	1,46	1,47	1,47 ^b
	Média	27,92	25,98	26,64	26,80	26,84		1,71	1,78	2,23	1,53	1,81
BUT (%)	<i>S</i> ₂₈	12,10	11,73	17,06	10,17	12,76	ISOVAL (%)	0,50	0,53	0,76	0,49	0,57 ^a
	<i>S</i> ₆₅	11,27	11,15	11,80	11,38	11,40		0,06	0,28	0,00	0,83	0,09 ^b
	Média	11,69	11,44	14,43	10,77	12,08		0,28	0,41	0,38	0,26	0,33
OUTROS (%)	<i>S</i> ₂₈	4,10	3,52	4,58	2,92	3,78 ^a	ACET : PROP	0,56	0,52	0,52	0,56	0,59
	<i>S</i> ₆₅	2,62	2,18	1,76	2,87	2,36 ^b		0,64	0,71	0,87	0,64	0,71
	Média	3,36	2,85	3,17	2,90	3,07		0,61	0,66	0,74	0,60	0,65
AGCC líq total* (mM)	<i>S</i> ₂₈	20,26	20,61	19,07	29,19	22,29	FP AGCC (mM.mL gás ⁻¹)	0,19	0,20	0,19	0,30	0,22
	<i>S</i> ₆₅	19,04	23,14	19,49	17,64	19,83		0,22	0,28	0,25	0,22	0,24
	Média	19,65	21,87	19,28	23,42	21,05		0,20	0,24	0,22	0,26	0,23

ACET(%), PROP (%), BUT (%), ISOBUT (%), VAL (%), ISOVAL (%) - percentual de acetato em relação a produção total de AGCC; OUTROS (%) - percentual dos valores de ISOBUT+VAL+ISOVAL em relação à produção total de AGCC; ACET:PROP - relação entre a síntese de acetato e propionato; FP AGCC.mL gás - fator de partição da síntese de produção de AGCC total e mL de gás acumulado por mg de matéria orgânica incubada. Diferenças significativas para médias com letras distintas nas colunas, *P*<0,05. *Diferença entre observado para o tratamento e frasco controle – branco.

No período de 48 horas mantiveram-se as diferenças significativas para isovalerato (*P*<0,01) e % outros (*P*<0,01), e para % valerato (*P*<0,05) para o substrato *S*₂₈. A produção bruta total de AGCC foi de 61,65 mMol.mL⁻¹, similar ao encontrado por Velásquez (2009) e Manella et al. (2004). Similarmente ao ocorrido em 24 horas de fermentação, o substrato com 28 dias de rebrotação, com maior teor de frações solúveis de proteína, apresentaram maior síntese de AGVCR, decorrente de maior fermentação proteica.

Oliveira et al. (2009), avaliando os parâmetros ruminais e síntese de proteína metabolizável em bovinos de corte recebendo suplementação com proteinados com diferentes níveis de proteína bruta (30, 40 e 50%), encontraram que a concentração média de acetato:propionato não diferiu entre os tratamentos com diferentes níveis de proteína e o controle. No entanto eles encontraram concentração de acetato maior para os animais

recebendo dietas com diferentes níveis de proteína em relação aos animais recebendo a dieta controle .

Embora sem efeitos significativos, as dietas com suplementação de ULC apresentaram neste experimento concentrações superiores de acetato em ambos substratos avaliados.

Tabela 11. Teores de AGCC encontrados no fluido ruminal após 48 horas de incubação pela técnica de fermentação *in vitro* , e a relação de eficiência referente a degradabilidade da MO e de FDN

		<i>D</i> ₀	<i>D</i> ₅	<i>D</i> ₁₀	<i>D</i> ₂₀	Média		<i>D</i> ₀	<i>D</i> ₅	<i>D</i> ₁₀	<i>D</i> ₂₀	Média
ACET (%)	<i>S</i> ₂₈	57,98	60,70	63,31	66,22	62,07	ISOBUT (%)	0,51	0,45	0,71	0,33	0,50
	<i>S</i> ₆₅	62,28	63,01	63,93	63,44	63,16		0,23	0,13	0,16	0,35	0,22
	Média	60,13	61,89	63,52	64,83	62,62		0,37	0,29	0,44	0,37	0,36
PROP (%)	<i>S</i> ₂₈	28,37	35,64	35,48	27,46	31,73	VAL (%)	1,79	1,20	1,03	1,07	1,27 ^a
	<i>S</i> ₆₅	29,70	28,36	28,03	28,31	28,6		0,96	0,85	0,83	0,85	0,86 ^b
	Média	29,04	32,01	31,75	27,88	20,17		1,35	1,03	0,93	0,96	1,065
BUT (%)	<i>S</i> ₂₈	10,52	6,71	6,37	6,62	7,55	ISOVAL (%)	0,83	0,52	0,50	0,49	0,59 ^a
	<i>S</i> ₆₅	7,32	7,61	7,03	7,01	7,24		0,14	0,18	0,15	0,18	0,17 ^b
	Média	8,93	7,16	6,70	6,81	7,4		0,49	0,35	0,33	0,34	0,38
OUTROS (%)	<i>S</i> ₂₈	3,12	2,17	2,24	1,89	2,36 ^a	ACET : PROP	2,07	1,91	2,07	2,41	2,11
	<i>S</i> ₆₅	1,29	1,16	1,15	1,38	1,24 ^b		2,10	2,23	2,29	2,26	2,22
	Média	2,21	1,67	1,69	1,64	1,80		2,08	2,07	2,18	2,33	2,17
AGCC líq total (mMol)	<i>S</i> ₂₈	48,24	37,78	42,34	40,69	42,27	FP AGCC (mMol.mL gás ⁻¹)	0,24	0,19	0,21	0,20	0,21
	<i>S</i> ₆₅	36,57	41,50	44,06	41,62	40,94		0,18	0,21	0,22	0,21	0,20
	Média	42,40	39,64	43,20	41,16	41,60		0,21	0,20	0,21	0,20	0,21

ACET(%), PROP (%), BUT (%), ISOBUT (%), VAL (%), ISOVAL (%) - porcentual de acetato em relação a produção total de AGCC; OUTROS (%) - porcentual dos valores de ISOBUT+VAL+ISOVAL, em relação à produção total de AGCC. ACET:PROP - relação entre a síntese de acetato e propionato; FP AGCC.mL gás - fator de partição da síntese de produção de AGCC total e mL de gás acumulado por mg de matéria orgânica incubada (MO inc).Diferenças significativas para médias com letras distintas nas colunas, *P*<0,05. *Diferença entre observado para o tratamento e frasco controle – branco.

3.4.6.4. Parâmetros de produção de gases

Segundo os dados observados, não houve efeito estatístico de doses de ULC sobre as variáveis relacionadas à cinética fermentativa de produção de gases. No entanto, os substratos

aos 28 e 65 dias de rebrotação apresentaram comportamento fermentativo significativamente diferentes (Tabela 12, Figuras 8 e 9).

Os parâmetros gerados pelo modelo matemático indicam que o substrato S_{28} apresentou menor tempo de colonização ($L=5,13$ horas) e atingiu 50% da capacidade fermentativa em menor tempo ($t_{1/2} = 26,27$ horas) que o substrato S_{65} ($L=5,58$ horas e $t_{1/2} = 29,58$ horas) (Tabela 12). Este fato pode ter sido decorrente do menor teor de FDN contido no substrato S_{28} , assim como o maior conteúdo celular e suas frações mais rapidamente digestíveis, que favoreceram a maior taxa de fermentação durante o período de fermentação estudado, visto que a fermentação de fibras é mais lenta que de outros componentes da forragem.

Tabela 12. Parâmetros do modelo de France et al. (1993) após 96 horas de fermentação *in vitro* de capim-marandú em duas idades de rebrotação, incubados com diferentes doses de ureia de liberação controlada.

	$A(\text{mL.gMOinc}^{-1})$					$L(\text{h})$				
	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média
S_{28}	197,6	196,0	195,9	194,1	195,9 ^B	5,081	5,224	5,229	4,992	5,13 ^B
S_{65}	203,8	201,5	201,2	197,8	201,1 ^A	5,515	5,709	5,486	5,612	5,58 ^A
Média	200,7	198,8	198,5	196,0	198,5	5,298	5,467	5,358	5,302	5,35
	B					C				
	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média
S_{28}	0,086	0,085	0,085	0,083	0,085 ^A	-0,389	-0,390	-0,390	-0,368	-0,38 ^B
S_{65}	0,074	0,075	0,073	0,072	0,073 ^B	-0,347	-0,359	-0,340	-0,342	-0,35 ^A
Média	0,080	0,080	0,079	0,077	0,079	-0,368	-0,375	-0,365	-0,355	-0,37
	$t_{1/2} (\text{h})$					R_1				
	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média	D_0	D_5	D_{10}	D_{20}	Média
S_{28}	25,92	26,36	26,42	26,38	26,27 ^B	0,821	0,812	0,820	0,821	0,819 ^A
S_{65}	29,31	29,47	29,64	29,92	29,58 ^A	0,78	0,77	0,78	0,77	0,777 ^B
Média	27,61	27,92	28,03	28,15	27,928	0,801	0,793	0,801	0,797	0,798

A = produção potencial de gases; b e c = constantes do modelo; L = tempo de colonização, R_1 = relação entre as produções de gases após 48 e 96 horas; $t_{1/2}$ = tempo necessário para que a curva atinja 50% da produção de gases. S_{28} = Substrato folhas de capim marandú com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim marandú 65 dias. D_0 = Dose 0 mg.g MS^{-1} , D_5 = Dose 5 mg.g MS^{-1} , D_{10} = 10 mg.g MS^{-1} , D_{20} = 20 mg.g MS^{-1} . ($P < 0,01$) Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas.

As taxas médias de fermentação (μ) encontradas apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,01$) em todos os tempos estudados, indicando que a fermentação ocorre de forma distinta ao decorrer do tempo de fermentação (Figura 9).

Houve efeitos significativos entre substratos ($P < 0,01$) e sua interação tempo e substrato, indicando que as taxas médias de fermentação foram alteradas no tempo pelo substrato, sem no entanto, apresentar comportamento estatisticamente diferentes para as doses de ULC (Figura 10).

Devido às características iniciais de maior teor de fibras (FDN e FDA) o substrato S_{65} apresentou uma taxa de fermentação inferior em todos os tempos estudados. Associado aos maiores valores encontrados para assíntota A (maior potencial de fermentação) e menor coeficiente R_1 , o comportamento fermentativo encontrado neste substrato confirma a fermentação mais lenta desta fração da fibra (FDN).

De acordo ao encontrado por Sa et al. (2011) em estudo de cinética fermentativa de capim marandú em diferentes idades de rebrota, substratos com maior idade apresentaram produção acumulada de gases inferior, com contínua elevação a partir de 80 horas de fermentação, decorrente em parte do maior conteúdo de fibras, menores teores de CNF, e maiores teores de carboidratos da fração B_2 que apresenta lenta taxa de degradação.

Estudando a cinética de fermentação *in vitro* por 96 horas em substratos lavados (redução das frações solúveis) em relação ao material original, Nogueira et al. (2006) encontraram para capim colômbio, maior taxa de fermentação e desaparecimento da MS no material original, quando comparados ao substrato lavado. Esta fração também apresentou menor potencial de produção de gases. Condições similares ao observado neste estudo, quando comparados os substratos S_{28} e S_{65} .

Similarmente ao encontrado neste estudo, Cone et al. (1999) encontraram efeito do grau de maturação sobre o aumento nos teores de MS, FDN, FDA e lignina e redução da PB para forragem do gênero *Lolium*, e, conseqüentemente, na degradabilidade da matéria orgânica. No início da fermentação, entre 5 e 10 horas, a taxa de fermentação foi mais elevada para capim mais novo, e menos acentuada, porém também superior entre 5 e 15 horas de fermentação.

Os valores b e c dos parâmetros foram diferentes estatisticamente para os substratos. Estes parâmetros foram correlacionados ao consumo voluntário de matéria seca, e digestibilidade *in vivo* da matéria seca e da matéria orgânica (BUENO, 2001).

Figura 5. Curva ajustada da produção acumulada de gases ($\text{mL.MO}^{-1}_{\text{incubada}}$) dos substratos S_{28} e S_{65} , com diferentes doses de ULC, durante 96 horas de fermentação sob a técnica de produção de gases.

Velásquez (2009) encontrou para gramíneas tropicais, tempo de colonização em torno de 0,38 h para todos os cortes para as forragens colhidas durante o verão. Estes valores foram muito inferiores ao encontrados no presente estudo. Bueno (2001) encontrou para fermentação de braquiária e Tifton, valores de 7,99 e 6,84, respectivamente, mais compatíveis aos encontrados neste estudo. Nogueira et al. (2006) encontrou menor valor de L para colônias na matéria original que para material lavado, indicando que o teor de fibras e de frações solúveis interferem sobre o tempo de colonização.

Segundo Velásquez (2009), a produção acumulada de gases em 96 horas de incubação foi em média 257,1 mL para o capim-marandu nas três idades de rebrotação, superiores aos valores encontrados neste estudo. Este fato pode ser decorrente de que neste experimento, a fermentação exclusiva de lâminas foliares apresenta menor teor de fibras e lignina que plantas inteiras. Já em 96 h de fermentação, o autor encontrou menor produção acumulada de gases para os capins tropicais aos 28 dias, em todas as espécies estudadas, comportamento similar ao

observado neste estudo. Os maiores tempos de colonização encontrados foram relacionados aos maiores teores de FDN e lignina das espécies avaliadas. Segundo Bueno, (2001), a relação entre a produção de gases acumulada em 48 e 96 horas de fermentação apresenta alta correlação à digestibilidade *in vivo* e consumo voluntário da matéria seca .

Figura 6. Taxas de fermentação (μ) do modelo de France et al (1993), de 96 horas de incubação sob a técnica de produção de gases, para os substratos S_{28} e S_{65} com diferentes doses de ULC.

Figura 7. Taxa média ajustada de fermentação (μ) do modelo de France et al (1993), em 96 horas de incubação sob a técnica de produção de gases, para os substratos S_{28} e S_{65} com diferentes doses de ULC.

3.4.6.5. Desaparecimento *in vitro* da MO e de FDNc, e Fator de Partição

Durante as 24 horas iniciais de fermentação, houve efeito significativo para o substrato S_{28} em resposta às doses de ULC testadas, sobre o desaparecimento *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e da FDNc (DIVFDN).

Como observado na figura 11, as doses de ULC suprimiram o desaparecimento de MO, indicando que maiores níveis de proteína não favoreceram a degradação de MO durante estas 24 horas de fermentação. Os altos teores proteicos dos substratos testados (PB em torno de 11%), foram suficientes para manter o desaparecimento do substrato S_{28} em torno de 70% do material incubado.

A DIVMO do substrato S_{65} foi mantido inferior, sendo que a adição de doses de ULC não afetaram significativamente esta variável, mantendo-se inferior na faixa de 60%. Numericamente, a dose 5 apresentou pequena melhora no desaparecimento que a dose 0.

Figura 8. Efeito da interação entre doses de ULC e substratos sobre a DIVMO em 24 horas de fermentação sob a técnica de produção de gases (• S_{65} ; ▪ S_{28})

Figura 9. Efeito da interação entre doses de ULC e substratos, sobre a DIVFDN em 24 horas de fermentação sob a técnica de produção de gases (• S₆₅; ▪ S₂₈)

O comportamento foi similar quando comparado o desaparecimento de FDN no período de 24 horas. Ainda sem efeito estatístico, a dose 10 mg apresentou menor efeito de depleção sobre a degradação desta fração para o substrato S₂₈. A DIVFDN manteve-se na faixa de 50%, enquanto S₆₅ na faixa de 45%. Este fator pode estar relacionado à menor complexação da parede celular em plantas forrageiras mais jovens.

Estes dados indicam que maiores frações solúveis do substrato S₂₈ apresentaram maior DIVMO e DIVFND que o substrato S₆₅, e que os teores proteicos iniciais do material incubado foram suficientes para a sincronização de nutrientes durante as 24 horas de fermentação para DIVMO e DIVFDN.

Para DIVMO em 48 e 96 horas de fermentação, houve efeito significativo apenas para substrato, sendo S₂₈ com maior degradabilidade que S₆₅. Para a DIVFDN, houve diferenças estatísticas somente em 48 horas de fermentação, sendo S₂₈ mais degradado que S₆₅ (Tabela 13).

Para DIVFDN em 96 horas de fermentação não houve diferenças significativas entre substratos, o que indica que havia potencial de degradação desta fração após 48 horas, para o substrato S_{65} , que alinhou a degradação final ao S_{28} . Este comportamento demonstra que as frações mais complexas de parede celular apresentam degradação mais lenta, e que necessitam maior tempo de fermentação para atingir condições similares de degradação que em frações menos lignificadas.

Neste estudo os valores de DIVFDN foram superiores aos encontrados por Kisuya et al., (2008), que encontrou valores médios de 52%, 65,7% e 68,2% para plantas inteiras de gramíneas de clima tropical para 24, 48 e 96 horas de incubação, fator que pode ter influenciado para maiores resultados, já que, segundo os mesmo autores, a degradação de parede celular de tecidos como parênquima ou mesófilo, por ser mais finos e com menor teor de xilose, é superior que em tecidos como esclerênquima ou vasculares, que apresentam alto conteúdo de xilose, e maior complexação entre carboidratos e lignina.

Brito et al. (1999) em estudo do efeito da maturidade em três cultivares de capim-elefante, concluíram que a área ocupada pelo tecido lignificado aumenta nas folhas assim como nos colmos com o crescimento das plantas, e que a degradação dos tecidos presentes nas diferentes estruturas diminui com a maturidade. Herrero et al. (2001), estudando folhas de capim-marandu em 28 e 42 dias de rebrotação, não observaram efeitos de idade na composição química. Os teores encontrados foram de 12,2 e 74% na MS para PB e FDN, respectivamente. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi correlacionada negativamente ao teores de FDN e lignina encontrados.

Vailhé et al. (2000) encontraram correlação negativa da extensão da degradação da parede celular após 48 h de incubação com a idade em festuca, passando de 835 g/kg MS nas secções mais jovens, para 396 g/kg MS nas secções mais maduras. A taxa e extensão da degradação da parede celular foram negativamente relacionadas aos níveis de xilose-arabinose e lignina. Foi evidenciado que o conteúdo e extensão das ligações de lignina a outros polímeros influem marcadamente na taxa e extensão da degradação.

Tabela 13. DIVFDN e DIVMO dos substratos S_{28} e S_{65} incubados com diferentes doses de ULC, sob a técnica de produção de gases

	D0	D5	D10	D20	Média
DIVMO 48 H (g . g MS^{-1})					
S_{28}	0,84	0,83	0,83	0,82	0,83 ^A
S_{65}	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79 ^B
Média	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81
DIVMO 96 H (g . g MS^{-1})					
S_{28}	0,86	0,87	0,86	0,87	0,87 ^A
S_{65}	0,84	0,84	0,85	0,84	0,84 ^B
Média	0,85	0,85	0,86	0,85	0,85
DIVFDN 48 H (g . g MS^{-1})					
S_{28}	0,73	0,72	0,72	0,71	0,72 ^A
S_{65}	0,69	0,69	0,69	0,70	0,69 ^B
Média	0,71	0,71	0,71	0,70	0,71

S_{28} = Substrato folhas de capim marandu com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim marandu 65 dias. D0= Dose 0 mg.g MS^{-1} , D5 = Dose 5 mg.g MS^{-1} , D10 = 10 mg.g MS^{-1} , D20 = 20 mg.g MS^{-1} ($P < 0,01$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas. Letras maiúsculas diferentes entre linhas, indicam diferenças estatísticas.

O fator de partição (FP MOD) foi estatisticamente superior para o substrato S_{65} em 24 e 48 horas de fermentação. Embora este substrato tenha apresentado valores absolutos inferiores de DIVMO que o substrato S_{28} , apresentou maior eficiência de degradação em relação à produção acumulada de gases. Estes resultados indicam que a fermentação de forragens mais velhas baseia-se na fermentação de carboidratos estruturais, mais lenta e específica para desaparecimento de fibra e consequentemente da matéria orgânica (Tabela 14).

Segundo Nogueira et al. (2006), o capim colônio apresentou melhor fator de partição para a material original que para o material lavado (livre de frações solúveis), indicando que a fermentação de fibras é mais eficiente na degradação do substrato inoculado, que a fermentação a partir das frações solúveis.

Segundo Campos et al. (2002), folhas de capim elefante apresentaram degradabilidade de MS e FDN de 78,3 e 60,3 %, aos 65 dias de idade, sendo fortemente reduzida entre 45 e 65 dias.

Houve influência de inóculos nas variáveis descritas abaixo, Indicando que são dependentes das condições iniciais do substrato em relação as demais variáveis estudadas. Foi

observado influência do inóculo sobre as variáveis: DIVFDN 48 h ($p < 0,0001$), DIVMO 48 h ($p < 0,0001$), Taxa de fermentação (μ) ($P < 0,01$), N-NH₃ 24 h ($p < 0,01$), FP MOD 24, 48 e 96 h ($p < 0,0001$).

Tabela 14. Fator de partição em relação a MOD em 24, 48 e 96 horas de fermentação dos substratos S_{28} e S_{65} com diferentes doses de ULC, sob a técnica de produção de gases ($p < 0,001$)

FP MO 24 H (mg MOD. ml ⁻¹)	D0	D5	D10	D20	med
S_{28}	5,66	5,77	5,81	5,88	5,78 ^B
S_{65}	6,10	6,36	6,82	6,56	6,46 ^A
média	5,88	6,06	6,31	6,22	5,93
FP MO 48 H (mg MOD. ml ⁻¹)					
S_{28}	5,20	5,16	5,08	5,05	5,12 ^B
S_{65}	5,48	5,45	5,46	5,82	5,55 ^A
Média	5,34	5,31	5,27	5,44	5,34
FP MO 96 H (mg MOD. ml ⁻¹)					
S_{28}	3,89	3,95	3,86	3,97	3,92
S_{65}	3,79	3,78	3,93	3,88	3,85
média	3,84	3,87	3,90	3,92	3,89

S_{28} = Substrato folhas de capim marandu com 28 dias, S_{65} = Substrato folhas de capim marandu 65 dias. D0= Dose 0 mg.g MS⁻¹, D5 = Dose 5 mg.g MS⁻¹, D10 = 10 mg.g MS⁻¹, D20 = 20 mg.g MS⁻¹ ($P < 0,01$). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas. Letras maiúsculas diferentes entre linhas, indicam diferenças estatísticas.

3.4.7. Conclusão e implicações

As doses de ULC afetaram a concentração de N-NH₃ em todos os tempos estudados. Durante as primeiras 24 horas de fermentação, a suplementação com 5 e 10 mg. kg MS⁻¹ são adequadas para ambos substratos, mantendo os níveis de N-NH₃ ruminal superiores a dose 0. A suplementação com 20 mg. kg MS⁻¹ foi eficientemente utilizada pelos microrganismos para o substrato de folhas de capim-marandu com 65 dias de rebrotação, que apresentou também maior eficiência na utilização do N-NH₃ disponível para síntese proteica, em 48 e 96 horas de fermentação. Todas as doses de ULC aumentaram a disponibilidade de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal em relação ao tratamento controle. Os níveis proteicos iniciais encontrados em

lâminas foliares é suficiente para promover a degradação de FDN e MO durante as primeiras 24 horas de fermentação, provavelmente decorrentes das frações solúveis presentes nos substratos aos 28 e 65 dias de rebrotação.

Não houve efeito de doses de ULC sobre a produção acumulada de gases e indicadores da cinética de fermentação ruminal. O substrato de folhas de capim marandu com 28 dias apresentou menor tempo de colonização, maior taxa de fermentação, e o substrato de 65 dias de rebrotação apresentou maior potencial de fermentação, evidenciando o efeito de frações de rápida degradação e menor complexação de parede celular favorecendo a fermentação ruminal.

As doses de ULC não afetaram o desaparecimento de MO e FDN. O substrato S₂₈ apresentou maior degradabilidade da MO e FDN nos tempos estudados, com exceção do tempo 96h, onde os substratos apresentaram degradabilidade similar de FDN, evidenciando que as frações fibrosas apresentam fermentação mais lenta, e necessitam tempo maior para atingir condições similares de degradação que em frações menos lignificadas.

Não houve efeito de doses de ULC sobre a síntese de AGCC em todos os tempos estudados. Os níveis mais elevados na síntese de AGVCR (valerato, isovalerato e somatória valerato, isovalerato e isobutirato) observados durante a fermentação *in vitro* por 24 e 48 horas, de lâminas foliares de capim-marandu aos 28 dias de idade de rebrotação, indicam que houve maior fermentação proteica, favorecendo a síntese de derivados de fermentação de aminoácidos e peptídeo, assim como menor utilização destes como cadeia carbônica para síntese de proteínas, visto que a síntese e utilização de AGCC ocorrem simultaneamente durante a fermentação ruminal. Estes AGVCR são essenciais para a síntese proteica de microrganismos celulolíticos.

3.4.8. Revisão bibliográfica

ARROQUY, J.I.; COCHRAN R.C.; NAGARAJA, T.G. Effect of types of non-fiber carbohydrates on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.93-106, 2005.

BARBOSA, N.G.S.; et al. Consumo e Fermentação Ruminal de Proteínas em Função de Suplementação Alimentar Energética e Protéica em Novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p.1558-1565, 2001.

BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, F.C.; ALQUINI, Y. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares decapim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 28, p. 223-229, 1999.

BUENO, I.C.S.; Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas. Tese (Doutorado) Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p.97, 2001.

CAMPOS, F.P. et al. Degradabilidade do capim-elefante em diferentes estágios de maturidade avaliada pelo método *in vitro* /gás. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.217-225, 2002.

CHAI, W.; UDEN, P. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, p. 281-288, 1998.

CLARK, J.H., KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2304-2323, 1992.

COELHO, S.G., SATURNINO, H.M., OLIVEIRA, H.N. Porcentagem molar de AGCC do conteúdo ruminal até os 90 dias de idade, de bezerros desmamados aos 30 dias e alimentados com ou sem volumoso até 60 dias. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 37, 2000, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: SBZ, p.473, 2000.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; DE VISSER, H. et al. Different techniques to study rumen fermentation characteristics of maturing grass and grass silage. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.957-966, 1999.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1380-1391, 2005.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, p. 250-251, 1965.

FRANCE, J.M. et al. A model to interpret gas accumulations profile with *in vitro* degradations of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p. 90-111, 1993.

GETACHEW, G.; DEPETERS, E.J.; ROBINSIN, P.H.; FADEL, J.G. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, 547-559 p., 2005.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington DC: USDA, **Agricultural Handbook**, 379.1970.

GOES, R.H.T.B. et al. Quality evaluation of the Tanner Grass (*Brachiaria arrecta*) pasture, by three different collection methods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 64-69, 2003.

GROOT, J.C.J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.64, p.77-89, 1996.

HENRIQUES, L.T. **Frações de carboidratos e compostos nitrogenados e parâmetros da cinética de degradação ruminal dos carboidratos de quatro gramíneas tropicais em diferentes idades de corte e doses de adubação nitrogenada**. Campus Goytacazes : Universidade Estadual do Norte Fluminense, 66p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do norte Fluminense, 2004.

HERRERO, M. et al. Measurements of physical strength and their relationship to the chemical composition of four species of *Brachiaria*. **Animal Feed Science and Technology**, v.92, n. 3-4, p. 149–158. 2001.

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

KASUYA, N. et al. wall degradation of tropical and temperate forage grasses measured by nylon bag and *in vitro* digestion techniques. **Animal Science Journal**, v.79, p. 200-209, 2008.

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

MALAFIA, P. A. M. et al. Determinação e cinética ruminal das frações proteicas de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p. 1243-1251, 1997.

MANELLA, M.Q. **Perfil de aminoácidos e estudo de cinética de degradação ruminal de alimentos em bovinos Nelore recebendo diferentes proporções de concentrado**. Tese (Doutorado) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, p. 104, 2004.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n.4, p. 321-330, 1999.

NAGA, M.A.; HARMEYER, J.H. Gas and volatile fatty acid production at different rates Of rumen microbial protein synthesis *in vitro* . **Journal of Animal Science**, vol. 40, n. 2, p. 374-379, 1975.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 2001.

NOGUEIRA, U.T.; MAURICIO, RM.; GONÇALVES, L.C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.633-641, 2006.

OLIVEIRA, V. S.; SANTANA NETO, J.A.; VALENCA, R.L.; Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo . **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**. n.20, 2009.

ØRSKOV, E.R.; **Nutrición proteica de los rumiantes**. Zaragoza, Acribia, p. 178, 1988.

QUEIROZ, M.F.S. **Estimativa do fluxo de nutrientes pelo trato digestivo de bovinos de corte alimentados com *Brachiaria brizantha* (hochst a. rich) stapf. cv. Marandu em duas idades de rebrota**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaobticabal, p.57, 2007.

RODRIGUES, A.A.; **Potencial e limitações da uréia e de misturas múltiplas para bovinos alimentados com forragens tropicais**. EMBRAPA 31p. 1985.

SAS INSTITUTE. The SAS system for windows. Release 8.01, Cary, 2000.

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

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos**. UFV:Viçosa, 3ª edição, p. 235, 2009.

SILVEIRA, J.P.F. et al. Aspectos da degradação sincronizada de nutrientes e seus efeitos na produção de ruminantes. **Unimar Ciências**,v.17, n.1-2, 39-74 p., 2008.

STEWART,W.E.; STEWART, D.G.; SCHULTZ, L.H. Rates of volatile fatty acids production in the bovine rumen. **Journal of Animal Science**, v.17, p. 723-736, 1958.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al.A simple gas production method using pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

VAILHÉ, M.A.B. et al. Effect of phenolic structures on the degradability of cell walls isolated from newly extended apical internode of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.48, n.3, p. 618-623, 2000.

VELÁSQUEZ, P.A.T. et al. Cinética da fermentação e taxas de degradação de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte estimadas pela técnica de produção de gases *in vitro* . **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1695-1705, 2009.

Capítulo 4. Considerações finais

Outros estudos com fracionamento de carboidratos e de proteína, e a associação de doses de carboidrato prontamente solúvel podem complementar as indicações de uso de ULC, partir deste trabalho realizado.