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

MARIANE CESCHIN ERNANDES

Efeitos da uréia em dietas com duas proporções volumoso:concentrado
no metabolismo ruminal e na produção de metano avaliados pela
técnica de fermentação ruminal *ex-situ* (micro-rúmen) em búfalos e
bovinos

MARIANE CESCHIN ERNANDES

Efeitos da uréia em dietas com duas proporções volumoso:concentrado no metabolismo ruminal e na produção de metano avaliados pela técnica de fermentação ruminal *ex-situ* (micro-rúmen) em búfalos e bovinos

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. Raul Franzolin Neto

*Com carinho dedico este trabalho aos meus pais, meus avós, minha irmã,
minha afilhada e ao meu namorado, palavras seriam insuficientes para
descrever a gratidão e o amor que sinto por vocês.*

Agradecimentos

À Deus, São Francisco de Assis e todos os anjos que estiveram ao meu lado, me proporcionando luz, calma, serenidade e saúde para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos meus pais, Sandra e Roberto, por me apoiarem em mais essa caminhada, sem vocês eu nada seria, obrigada por mesmo de longe estarem presentes em cada momento, em cada vitória e em cada derrota, me aplaudindo e me dando colo, o amor incondicional de vocês é a razão do meu viver! Obrigada por serem esse exemplo de vida e pela oportunidade de estar na vida de vocês! Amo vocês, meus pais!

À minha avó Mercia, por todo carinho, torcida, dedicação, mimo e cuidados. Vó meu exemplo de determinação e dedicação, obrigada por me inspirar e me ensinar ser cada dia melhor. Obrigada, te amo muito!

Aos meus avós, Oswaldo, Ana e Miguel (*in memoriam*), obrigada por serem meus anjos da guarda, a presença de vocês me dão esperança e força, sei que de onde vocês estejam estão me aplaudindo. Obrigada por terem sido avós maravilhosos, que hoje refletem no que eu sou. Saudades..... Amo vocês!

À minha irmã, Aline, por ser “a irmã”, aquela que eu me espelho e me inspiro! Obrigada por estar ao meu lado sempre, por me ouvir, me ajudar, dar conselhos! Te amo Li! Ao meu cunhado, Eduardo, por ser um irmão companheiro de todas as horas, obrigada por tudo, obrigada até mesmo por me ajudar com o experimento! Te amo Dú! E um obrigada especial a vocês dois por terem me dado à oportunidade de ser madrinha da Beatriz, obrigada Bia por cada momento que você me fez esquecer do mundo com o seu sorriso, a madrinha te ama!

Ao meu namorado, Romulo, por dividir a sua vida comigo e por estar ao meu lado em todos os momentos, obrigada meu amor! Sem você ao meu lado tudo seria mais complicado, você é essencial em minha vida, e assim foi durante esse trabalho. Obrigada pela dedicação, carinho e amor. Te amo!

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Franzolin Neto pelos ensinamentos, oportunidades e incentivos durante a realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues e toda sua equipe, Lerner, Perna, Mauricio, Eduardo, Carolina, Tayná, pelos ensinamentos, ajuda, dedicação de cada um para que esse trabalho fosse concluído! Exemplo de como trabalhar em equipe, muito obrigada!

Ao Gilmar, Ricardinho, João e Dioni, responsáveis pelo setor de Fistulados, pelo esforço, dedicação e carinho aos animais e toda ajuda durante o experimento.

Aos técnicos de Laboratório Ari e Gilson, por toda ajuda na realização das análises laboratoriais. À Simi por toda ajuda e confiança na longa jornada dentro do laboratório de Bromatologia, sem você seria muito pior, obrigada Simi!

À amiga e segunda mãe, Lucinéia, por todo carinho, ajuda, conversar, cuidados e principalmente por toda torcida durante toda a minha caminhada. Sem você ao meu lado essa caminhada seria muito mais difícil, nosso encontro não é por acaso, obrigada por ser um exemplo de mãe, profissional, e amiga. Te amo, Lu!

À minha amiga Deborah, obrigada por continuar ao meu lado sempre, estaremos sempre juntas, caminhando lado a lado! Te amo, Deh!

Ao amigo e Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto, por todos os conselhos, conversas, ajuda, hoje você é um exemplo pra mim, te admiro e te agradeço por tudo fez por mim. Obrigada!

Aos amigos, Bruno Lapo, Esther Ramalho, João Paulo Fernandes, Alessandra Módena, por todos os momentos juntos, pelas risadas, conversas, ajuda, obrigada por cada momento e por cada ensinamento.

Aos meus “cãopanheiros”, Yuri, Nayla (*in memorian*) e Luna, por serem meu exemplo de amor incondicional e principalmente minha inspiração. Sem o amor de vocês eu não seria completa. Obrigada!

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é
com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

Resumo

ERNANDES, M.C. **Efeitos da uréia em dietas com duas proporções volumoso:concentrado no metabolismo ruminal e na produção de metano avaliados pela técnica de fermentação ruminal *ex-situ* (micro-rúmen) em búfalos e bovinos.** [Effect of urea in diets with two ratio forage:concentrate in ruminal metabolism and methane production evaluated by technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen) in buffalos and cattle]. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

No presente trabalho estudou-se o metabolismo ruminal e a fermentação com produção de gases e de metano avaliadas pela técnica de *ex-situ* (micro-rúmen) em duas espécies de ruminantes domésticos, o bovino e o bubalino, visando contribuir com a importante área da nutrição de ruminantes na geração de dados para realização de uma alimentação mais eficiente e econômica desses animais. Para tanto, o trabalho está apresentado em forma de capítulos com uma Introdução sobre o tema, uma revisão da literatura e o Capítulo 3 redigido na forma de um artigo científico para futura publicação. Na revisão da literatura (Capítulo 2) são apresentadas discussões sobre os principais trabalhos publicados em literatura especializada em importantes aspectos, subdivididos nos seguintes tópicos: Diferenças fisiológicas no processo digestivo entre bovinos e bubalinos; a proteína na nutrição de ruminantes; a uréia como fonte proteica; fermentação ruminal e seus produtos e fatores que influenciam a fermentação ruminal. Ressalta-se, porém, que há escassez de trabalhos publicados comparando as duas espécies de ruminantes nessa área, especialmente com o uso de uréia em dietas. Como os ruminantes possuem a capacidade de transformar fonte de nitrogênio não proteico em proteína de alto valor biológico há necessidade de explorar essa vantagem da espécie para diminuir os custos de produção sem afetar a produção desses animais. Há vantagens e desvantagens do uso da uréia na alimentação animal, mas é necessário elucidar as diferenças que existem nas duas espécies quando utilizamos essa fonte de nitrogênio. Neste estudo foi possível caracterizar o perfil da fermentação ruminal das duas espécies estudadas. A produção de metano pelos ruminantes é apontada como fator contribuidor para o efeito estufa, e neste trabalho avaliamos esses parâmetros tanto de metabolismo como de fermentação existentes

nessas espécies e a influência da uréia nesses sistemas. A utilização de uréia em uma dieta com 50% de volumoso promoveu maior consumo de matéria seca e extrato etéreo e maior produção de ácido propiônico com menos relação acético:propiônico, não influenciando nos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes, na dinâmica ruminal e no pH em relação às dietas com 50% de volumoso sem uréia e com 80% de volumoso com uréia. Além disso, essa última dieta promoveu redução da produção de metano em relação à dieta contendo 50% de volumoso e 50% de concentrado com nitrogênio proteico com farelo de soja, modulando de forma a evidenciar sua importância na nutrição de ruminantes, com redução de custos de produção e dos efeitos deletérios causados pelo gás metano ao meio ambiente.

Palavras-chave: búfalos, bovinos, ácidos graxos de cadeia curta, metano, digestibilidade.

Abstract

ERNANDES, M.C. **Effect of urea in diets with two ratio forage:concentrate in ruminal metabolism and methane production evaluated by technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen) in buffaloes and cattle** [Efeitos da uréia em dietas com duas proporções volumoso:concentrado no metabolismo ruminal e produção de metano avaliados pela técnica de fermentação ruminal *ex-situ* (micro-rúmen) em búfalos e bovinos]. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

We have studied the ruminal metabolism fermentation with gas production and methane measured by ex-situ technique (micro-rumen) in two species of domestic ruminants, cattle and buffaloes to contribute to the important area of ruminant nutrition in order to become more efficient and economical feeding of these animals. To this end, the work is presented in the form of chapters with an introduction on the topic, a literature review and Chapter 3 written as a scientific paper for future publication. In the literature review (Chapter 2) discussions of important papers published in specialized literature is divided into the following topics: cattle vs buffaloes - physiological differences; protein in ruminant nutrition; urea as the protein source; ruminal fermentation and its products; factors that influence the rumen fermentation,. It is noteworthy, however, that there is scarcity of studies comparing the two ruminant species in this area, especially with the use of urea in diets. As ruminants have the ability to transform source of non-protein nitrogen in protein of high biological value there is need to explore this kind of advantage to reduce production costs without affecting the total production. There are advantages and disadvantages of the use of urea in animal feed, but it is necessary to elucidate the differences between the two animal species when using this source of nitrogen. In this study it was possible to characterize the profile of ruminal fermentation of both species. Methane production by ruminants is implicated as contributing factor to the greenhouse effect, and in this paper we have evaluated these parameters as fermentation metabolism in buffalo and cattle and the influence of urea on feeding systems. The use of urea in a diet with 50% forage promoted greater dry matter and fat intake and increased propionic acid production with less acetic:propionic ratio, but no influence was observed in the digestibility of nutrients, ruminal pH and rumen

dynamics when compared to diets with 50% forage without urea and 80% of forage with urea. Moreover, this latest diet promoted reduction of methane production in relation to the diet containing 50% forage and 50% concentrate without urea, modulating in order to highlight its importance in ruminant nutrition, reducing costs production and the damaging effects to the environment by emission of methane gas.

Keywords: buffalo, cattle, short-chain fatty acids, methane, digestibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista do galpão experimental com preparo da alimentação dos animais...	36
Figura 2. Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal	38
Figura 3. Interação dieta vs espécie para o consumo de matéria seca.....	45
Figura 4. Interação dieta vs espécie do consumo de extrato etéreo (EE)	46
Figura 5. Excreção do EE nas espécies bovina e bubalina.....	49
Figura 6. Concentração de nitrogênio amoniacal nos diferentes tempos de coleta de conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9, 12 horas após a alimentação matinal.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais.	35
Tabela 2. Valores médios do consumo (C) da matéria seca e dos nutrientes das diferentes espécies e dietas.	45
Tabela 3. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes das diferentes espécies e dietas.	47
Tabela 4. Valores médios da excreção da matéria seca e dos nutrientes nas fezes em bovinos e bubalinos e nas três dietas experimentais.	49
Tabela 5 Valores médios da dinâmica ruminal das diferentes espécies e dietas.	50
Tabela 6. Valores médios da mensuração contínua do pH ruminal das diferentes espécies e dietas.	51
Tabela 7. Valores médios da produção de AGCC nas diferentes dietas e espécies.	54
Tabela 8. Valores médios da produção de metano e PER nas diferentes dietas e espécies.	55
Tabela 9 Valores médios da produção de N-NH ₃ nas diferentes espécies e dietas experimentais.	58

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS NO PROCESSO DIGESTIVO ENTRE BOVINOS E BUBALINOS	16
2.2 A PROTEÍNA NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES	17
2.2.1 A uréia como fonte proteica	19
2.3 Fermentação ruminal e seus produtos	20
2.3.1 Ácidos graxos de cadeia curta	22
2.3.2 Metano	23
2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO RUMINAL	25
2.4.1 Dieta.....	25
2.4.2 pH	26
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
3.1 RESUMO.....	31
3.2 ABSTRACT	32
3.3 INTRODUÇÃO	33
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.4.1 Local e animais experimentais	34
3.4.2 Tratamentos	35
3.4.3 Mensuração contínua de pH	36
3.4.4 Digestibilidade com uso de marcador	38
3.4.5 Dinâmica ruminal	39
3.4.6 Concentração do nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	39
3.4.7 Fermentação in vitro (<i>Ex-Situ</i>) com determinação da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano	40
3.4.8 Cálculos da produção de AGCC, CH ₄ e perda de energia relativa	41
3.4.9 Análises estatísticas.....	43
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.5.1 Consumo da matéria seca e dos nutrientes	44
3.5.2 Coeficiente de digestibilidade da MS e dos nutrientes	47
3.5.3 Excreção dos nutrientes nas fezes	48

3.5.4 Dinâmica ruminal	49
3.5.5 pH	50
3.5.7 Nitrogênio Amiacal (N-NH ₃)	57
3.6 CONCLUSÕES	60
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Diferenças têm sido relatadas entre os bovinos e bubalinos principalmente nos hábitos comportamentais e interações com o meio ambiente, na fermentação ruminal e anatômicas e fisiológicas do sistema digestório. (PEREIRA et al., 2001).

Espécies de ruminantes embora tenham funções fisiológicas da digestão semelhantes, estudos detalhados do metabolismo dos nutrientes e suas exigências têm apresentado diferenças importantes, em diversos sistemas de produção. Muitos estudos sobre nutrição feitos com bovinos são extrapolados para os búfalos, podendo causar ineficiência nos sistemas produtivos de bubalinos (CHALMERS, 1974).

Ruminantes possuem capacidade de utilizar alimentos de baixa qualidade devido a existência de um ecossistema microbiano ruminal diverso e único, onde mantém microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários e fungos (KOZLOSKI, 2002). A fermentação anaeróbia do alimento principalmente de tipo fibroso é possível devido ao sinergismo existente entre a população microbiana, permitindo a degradação pela ação de complexos enzimáticos sintetizados pelos microrganismos que agem sobre a parede celular das plantas.

Nas rações animais o ingrediente de maior custo é a proteína e por esse motivo muitos estudos são realizados para que fontes alternativas sejam testadas e utilizadas em escala produtiva. Como os ruminantes possuem a capacidade de converter fontes de nitrogênio não proteico (NNP) em proteína de alto valor biológico, pesquisas nessa área são relevantes visando baratear o custo final da alimentação.

A utilização de fontes alternativas de proteína na produção de bovinos é importante, uma vez que fontes convencionais são concorrentes com a alimentação humana. A uréia é utilizada na alimentação de ruminantes, apesar de sofrer limitações devido à sua baixa aceitabilidade pelos animais, sua segregação quando misturada com outros ingredientes e sua alta toxicidade, que é agravada pela elevada solubilidade no rúmen (LANA, 2005). Por outro lado, existem vantagens do uso da uréia, tais como: tecnologia simples e acessível ao produtor rural, fonte de nitrogênio não-proteico de baixo custo, baixo custo de implantação no manejo

alimentar dos animais, redução das perdas de peso dos animais no período seco e também mantém e/ou estimula a produção de leite.

Perdas de energia e nitrogênio pelos ruminantes ocorrerem em diferentes níveis dependendo do sistema de alimentação utilizado. Além de prejuízos econômicos, há considerável prejuízo ao meio ambiente com aumento do aquecimento global pela emissão de gases como metano, dióxido de carbono e nitrogênio ao ambiente. O caminho mais promissor para redução de metano pelos ruminantes é o desenvolvimento de melhoria na produtividade e eficiência de produção pela melhor nutrição dos animais. Importante meio de redução de perdas de N é promover adequada eficiência de assimilação de N pelo animal através de uma alimentação mais balanceada, pela otimização de proteínas e aminoácidos para conciliar com o exato requerimento fisiológico do animal (STEINFELD & WASSENAAR, 2007).

Nas últimas décadas tem sido ampliada a discussão a respeito da produção de metano por ruminantes, já que este gás está ligado diretamente ao fenômeno do efeito estufa do globo terrestre (COTTON; PIELKE, 1995). Dessa forma, a manipulação da fermentação ruminal visando uma melhor eficiência alimentar (diminuição de perdas energéticas da dieta via metanogênese) tem sido bastante estudada.

Assim, o presente trabalho teve objetivo de estudar a influência da uréia em dietas com dois níveis de volumoso (50 e 80%) sobre parâmetros do metabolismo ruminal e em avaliações da fermentação in vitro através da técnica ex-situ (micro-rumen) em bovinos e bubalinos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS NO PROCESSO DIGESTIVO ENTRE BOVINOS E BUBALINOS

Diferenças anatômicas e fisiológicas têm sido observadas em experimentos comparando bubalinos e bovinos. Tewatia & Bhatia (1998) relataram maior aproveitamento das fibras por existir uma maior atividade celulolítica no rúmen, assim como maior reciclagem da uréia em bubalinos, já Sivkova et al. (1997)

relataram maior produção salivar e consequentemente, pH mais elevado e assim um poder tampão mais eficiente em bubalinos que bovinos, assim como maior eficiência de utilização do nitrogênio amoniacal e absorção da uréia resultando em um balanço positivo de nitrogênio (TRUFCHÉV et al., 1997).

Borelli et al. (1975) observaram que o intestino delgado dos búfalos são menores e o intestino grosso possui um maior comprimento em relação aos bovinos. Nos bubalinos existe um volume maior do complexo rúmen, retículo, omaso e abomaso, onde o rúmen ocupa 88% do volume total. O rúmen apresenta capacidade de armazenamento de alimento até 10% a mais que os bovinos. A menor taxa de passagem do alimento é determinada pela inferior frequência ruminal, levando a maior tempo de retenção e ação da população microbiana sobre a fibra alimentar (BASTIANETTO & BARBOSA, 2009).

Vega et al. (2010) encontraram relevantes diferenças no comportamento digestivo entre bovinos Brahman e búfalos. Os búfalos apresentaram maior diâmetro dos músculos da mastigação indicando maior força de mastigação, menor e mais lenta habilidade da mastigação, maior ingestão de volumoso e comportamento com mais longo tempo de descanso que os bovinos, favorecendo animais em dietas ricas em volumosos.

2.2 A PROTEÍNA NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

O desempenho e a produção de leite e carne nos bovinos e bubalinos dependem basicamente do metabolismo proteico (nitrogênio). O metabolismo das proteínas no rúmen ocorre como dois eventos distintos: a degradação de proteína como fonte de nitrogênio para os microrganismos e a síntese de proteína microbiana, a partir de peptídeos, aminoácidos ou amônia livres no conteúdo ruminal, utilizada para crescimento e multiplicação.

A exigência de proteína dos ruminantes é atendida pelos aminoácidos absorvidos no intestino delgado, denominada exigência de proteína metabolizável. A proteína que chega ao intestino delgado consiste de fração microbiana, da fração dietética não-degradada no rúmen e da proteína endógena (VALADARES FILHO, 1997).

Para que a eficiência de síntese de proteína pelos microrganismos ruminais seja máxima, a degradabilidade da proteína dietética deve atender exatamente às necessidades microbianas, desde que não haja limitação da fonte de energia entre outros fatores. E para que a eficiência de utilização de proteínas nos tecidos seja máxima, a soma da proteína microbiana e da proteína dietética não degradada no rúmen deve atender às exigências dos tecidos, em termos quantitativos e qualitativos (WALDO e GLEM, 1981).

Os microrganismos do rúmen têm a capacidade de transformar o nitrogênio da dieta em proteína de boa qualidade.. O nitrogênio tanto pode vir de proteínas verdadeiras (Ex.: farelo de soja, farelo de algodão, forragens, outros) quanto de alguns compostos inorgânicos (compostos nitrogenados não-proteicos), como uréia, biureto e ácido úrico (LANA, 2005).

Grande parte da proteína que chega para a digestão abomasal e intestinal é proveniente da proteína bacteriana, que é formada a partir da fermentação ruminal, sendo de total importância maximizar a qualidade e quantidade desta fermentação (FERNANDES, 2004).

A proteína bruta dos alimentos oferecidos aos ruminantes é composta por fração degradável no rúmen (PDR) e fração não degradável no rúmen (PNDR). As PDR sofrem ação das peptidases, proteases e deaminases, que são secretadas pelos microrganismos, para que ocorra a degradação. Através da degradação da PDR ocorre a formação de peptídeos, aminoácidos e amônia que serão utilizados para a síntese da proteína microbiana e multiplicação celular. Pode existir ainda excesso desses compostos nitrogenados da degradação ruminal, quando os microrganismos não conseguem utilizar todos os produtos para a síntese microbiana. A amônia em excesso atravessa a parede ruminal e pode ser perdida através da urina em forma de uréia, já os peptídeos e aminoácidos não aproveitados podem ser absorvidos quando passados para o duodeno dos ruminantes (SANTOS e MENDONÇA, 2011).

Na nutrição de ruminantes para que se alcance a máxima digestão da matéria seca, a eficiência microbiana e a produção de proteína microbiana, a dieta deve ter entre 10 e 13% de proteína degradável no rúmen (PDR) e 56% dos carboidratos totais como carboidratos não estruturais (CNE) (HOOVER e STOKES, 1991).

A principal fonte de aminoácidos absorvidos pelo animal no rúmen é através da síntese de proteína microbiana, e para que ocorra essa síntese adequadamente deve haver um sincronismo entre a taxa de degradação dos carboidratos e de proteína (PDR) no rúmen, a adequada quantidade de N amoniacal, o pH e a taxa de passagem estão ligadas afetando diretamente a eficiência e produção de proteína microbiana, com essa necessidade a estratégia de suplementação proteica deveria se preocupar primeiramente com a otimização da síntese de proteína microbiana (FU et al., 2001).

2.2.1 A uréia como fonte proteica

Animais ruminantes podem utilizar duas fontes de nitrogênio: nitrogênio proveniente das proteínas e nitrogênio de fontes não proteicas (NNP) (SANTOS e MENDONÇA, 2011).

A principal fonte de NNP utilizada na nutrição de ruminantes é a uréia, por dois motivos principais: do ponto de vista nutricional ela adequa a ração em PDR, e do ponto de vista econômico possui baixo custo quando comparada, por exemplo, com a soja, que é a principal fonte de nitrogênio proteico (SANTOS e MENDONÇA, 2011).

A uréia é um composto orgânico sólido, solúvel em água e álcool. Quimicamente, é classificada como amida sendo, portanto, um composto nitrogenado não proteico (NNP). O N do NNP encontra-se nos ácidos dextrorribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), na amônia, nos aminoácidos e nos pequenos peptídeos. Esse composto ao alcançar o rúmen com a dieta é rapidamente desdobrado em amônia e CO₂ pela enzima urease, produzida pelas bactérias. A amônia presente no rúmen, resultante da uréia ou de outra fonte proteica, é utilizada pelos microrganismos para a síntese da proteína microbiana (LANA, 2005).

Os microrganismos possuem a capacidade de converter uma fonte de nitrogênio não proteico, como a uréia, em proteína de alto valor biológico. A capacidade das bactérias para utilizar o nitrogênio não-proteico (NNP) vai depender, primariamente, da quantidade e do nível de degradação da energia fornecida ao animal (carboidratos) e da capacidade de crescimento da população de

microrganismos, mas existe um limite para o crescimento microbiano, o qual, teoricamente, depende da ingestão de energia (LOPES, 1998).

Em uma dieta com energia fermentável limitada, com excesso de proteína bruta ou proteína altamente degradada, poderá ocorrer amônio (NH_4^+) excedente, não podendo ser todo convertido em proteína microbiana e dessa forma não é absorvida pela parede ruminal. A amônia não ionizada em excesso é absorvida pela parede ruminal e chegando ao fígado é convertida em uréia. Após essa conversão a uréia na corrente sanguínea poderá ter dois caminhos distintos: ser excretada na urina por filtração renal, ou voltar ao rúmen e ser novamente transformada em amônia, podendo ser utilizada pelos microrganismos como fonte de nitrogênio (BACH et al. 2005).

As concentrações de amônia no sangue podem ser elevadas conforme a capacidade de conversão do fígado diminui, ocasionando uma alcalose sistêmica. Nesse caso, a amônia é rapidamente absorvida pelo cérebro, sendo que os transtornos no sistema nervoso central são sintomas de intoxicação (EMERICK, 1993).

Fontes de N de alta degradabilidade como a uréia e o óleo de canola, favorecem maior degradabilidade da MS, da PB e do amido por estimular o crescimento microbiano e a fermentação ruminal (ZEOULA et al. 1999).

Pesquisas têm mostrado melhor resultados do uso da uréia como fonte de nitrogênio sobre o metabolismo ruminal em búfalos alimentados com dietas à base de palhadas e concentrado que com uso de farelo de soja (KANG et al., 2013).

2.3 Fermentação ruminal e seus produtos

As características anatômicas e simbióticas adquiridas pelos ruminantes durante sua evolução trouxeram vantagens para o seu processo fermentativo e digestivo. Esses animais possuem digestão fermentativa e enzimática, por terem seu trato digestivo com duas partes distintas: aglandular (rúmen, retículo e omaso) e glandular (abomaso). Na parte aglandular ocorre a fermentação microbiana através de bactérias, protozoários e fungos que irão hidrolisar as proteínas, lipídios e carboidratos. Com a existência do orifício retículo-omasal as partículas maiores

permanecem por mais tempo propiciando melhora na fermentação (SILVA; LEÃO, 1979).

A fermentação ruminal converte componentes dietéticos em ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato entre outros como resultado de uma atividade física e microbiológica (OWENS; GOETSCH, 1993). Além da conversão do alimento o ruminante é capaz de liberar a energia contida no material celulósico dos volumosos pela fermentação dos carboidratos. Porém, a fermentação dos carboidratos resulta em não somente ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), acético, propiônico, butírico e outros que serão utilizados como fonte de geração de energia para o ruminante, mas também em produtos menos desejáveis, como calor e os gases metano e dióxido de carbono. A produção destes gases representa perda de energia pelo animal, estimada em 2 a 12% da energia bruta do alimento ingerido (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

A fermentação do alimento e conversão em carne e leite pode ser pouco eficiente devido a fatores associados à digestibilidade das forrageiras (VARGA e KOLVER, 1997).

Segundo Valadares Filho e Pina (2011) o animal hospedeiro precisa realizar alguns processos para manter essa população microbiana ativa, como gerar suprimento de alimento mastigado ou ruminado, remover os produtos da fermentação e de resíduos indigestíveis, adicionar tamponantes através da saliva e manter o pH, a temperatura, anaerobiose e umidade. De maneira geral, o ambiente ruminal necessita de um pH entre 5,5 e 7,2, temperatura entre 38 e 41°C, faixa de osmolaridade entre 260 e 340 mOsm e potencial redox entre -250 e 450 mV.

A microbiota ruminal é categorizada em dois grupos distintos baseando-se na utilização das fontes de carbono, compostos nitrogenados (N) e eficiência de crescimento. Os grupos são divididos em: microrganismos que fermentam carboidratos não fibrosos (CNF), como o amido, a pectina e açúcares solúveis, utilizam como fonte de nitrogênio aminoácidos, peptídeos e amônia; eles possuem um crescimento elevado. O segundo grupo fermenta os carboidratos fibrosos (CF), especificamente celulose e hemicelulose, utilizam a amônia como fonte primária de nitrogênio e apresentam um crescimento mais lento (VALADARES FILHO e PINA, 2011).

2.3.1 Ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) possuem de 1 a 7 carbonos e formam compostos de cadeia ramificada e lineares, como o ácido fórmico, butírico, propiônico, acético, valérico, isovalérico, heptanóico, hexanóico, 2 – metil – butírico. A produção desses ácidos graxos na fermentação ruminal gera também a formação de outros compostos como o lactato, o metano e o dióxido de carbono (BERGMAN, 1990).

Berchielli et al. (2006), relataram que os ruminantes utilizam os AGCC como principal fonte de energia, principalmente o acético, propiônico e butírico, advindo da fermentação de carboidratos preferencialmente e, em alguns casos da proteína.

Segundo Bergman (1990), os ácidos acético, propiônico e butírico podem ter uma variação da sua relação molar de 75:15:10 a 40:40:20. Já Teixeira e Teixeira (2001) citaram variações individuais desses ácidos de: 60 a 70% de ácido acético, 18 a 22% de ácido propiônico e de 13 a 16% ácido butírico. Essas variações ocorrem devido a vários fatores, tais como: como a taxa de produção individual desses ácidos, a quantidade absorvida pelo rúmen, a quantidade que passa para o omaso e abomaso, a diluição desses produtos pela saliva e o quanto esses produtos serão utilizados como fonte de energia pelos microrganismos. Assim, ocorre ampla variação na concentração individual e total desses AGCC dentro do rúmen, levando grandes dificuldades no estudo quantitativo desses ácidos (VALADARES FILHO & PINA, 2011).

O acetato é considerado o AGCC mais importante por ser o mais produzido pelo ruminante, podendo representar até 75% de toda a produção dos ácidos graxos de cadeia curta. Em dietas com mais teor de concentrado, a produção de acetato é diminuída, possivelmente pela inibição do crescimento de bactérias celulolíticas e protozoários. Esses microrganismos têm seu crescimento prejudicado pela queda do pH através do aumento da fermentação ruminal dos carboidratos não estruturais presentes em maior quantidade nessas dietas (SUTTON, et al., 2003).

O propionato possui duas vias de produção, a primeira através do piruvato que é convertido em oxaloacetato e succinato; a segunda é feita pela conversão do piruvato em lactato, via acrilato. O ácido propiônico é importante por ser a principal

fonte gliconeogênica do ruminante, e manter os níveis plasmáticos de glicose, já que a absorção da mesma é muito pequena (REYNOLDS et al., 1994).

O butirato por sua vez é formado por acetato ou compostos que resultem em acetil-CoA, como o piruvato e o glutamato. A via principal de formação é a que utiliza duas moléculas de acetato, não trazendo benefícios para as bactérias, mas para a continuidade do processo fermentativo ela tem sua importância por resultar na regeneração dos cofatores oxidados (FAHEY e BERGER, 1993).

Os ácidos graxos de cadeia curta são metabolizados por vários tecidos dos animais, principalmente no trato gastrointestinal. Segundo Bergman (1990), 30% do acetato, 50% do propionato e 90% do butirato são metabolizáveis por essa parte do organismo, não atingindo assim a circulação portal. Para que ocorra a metabolização desses AGCC, necessariamente devem estar em sua forma ativa, ou seja, ligados à coenzima-A. Essas reações ocorrem através da enzima acil-CoA sintetase específica para cada AGCC (BRITTON e KREHBIEL, 1993).

A relação volumoso:concentrado das dietas é o principal fator que influencia na proporção dos ácidos graxos de cadeia curta. , Quando essa relação se encontra menor, a relação acetato:propionato diminui (SUTTON et al. 2003). Assim, dietas ricas em grãos produz maior formação de ácido propiônico, e em dietas com maior quantidade de volumoso teremos uma maior produção de ácido acético (OWENS e GOETSCH, 1988).

2.3.2 Metano

A produção de metano no rúmen serve como dreno de hidrogênio viabilizando o funcionamento do rúmen, já que a retirada de H_2 do meio possibilita o crescimento bacteriano e a degradação da matéria orgânica (BRYANT, 1979). A dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) é um composto orgânico utilizado pelas células dos seres vivos como transportadora de elétrons nas reações de oxirredução, gerando energia para a célula. Ela terá seu papel prejudicado quando existe um aumento de H_2 desfavorecendo a sua desidrogenação. Portanto, quanto maior for a retirada de H_2 do rúmen maior será a conversão de NADH em H_2 resultando assim em maior rendimento também de acetato e de ATP por mol de açúcar fermentado. Dessa forma, a inibição da metanogênese pode ser prejudicial a toda fermentação ruminal (FRANCO; DIOGO, 2004).

As Archaeas metanogênicas que são responsáveis pela produção de CH₄, formam um grupo distinto de microrganismos que possuem co-fatores e lipídeos únicos. Diversas espécies foram isoladas em diferentes habitats anaeróbicos. Apenas cinco espécies foram encontradas no rúmen, e dentre essas cinco apenas duas, *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina* sp., têm sido encontrada em populações maiores que $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (McALLISTER, et al., 1996). Essas espécies de Archeas são encontradas associadas aos protozoários ciliados no rúmen. Considerando que os protozoários possuem grande potencial de produção de hidrogênio existe uma relação simbiótica com as archaeas metanogênicas que tem afinidade pelo H₂ (USHIDA; JOUANY, 1996).

Um ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSELL, 2001) e este gás não pode ser metabolizado pelo animal nem pela microbiota ruminal. O ato da expulsão destes gases, a eructação, previne condições fatais, como o timpanismo, patologia em que o animal não consegue expulsar os gases que se acumulam no rúmen, em virtude da fermentação dos substratos (VAN KRUIJNINGEN, 1995). Desta forma, a maior parte deste gás é removida do rúmen por expiração ou eructação (MOSS, 1993), sendo então liberada no meio ambiente.

Segundo Demarchi et al. (2003) o processo de metanogênese pode consumir até 14% do total da energia digestível consumido por bovinos Nelore, gerando assim um desperdício de energia e prejuízo à produção animal, além do fator de impacto ambiental ocasionado pelo metano.

A fermentação ruminal produz CH₄ que contribui com 22% da emissão deste gás, equivalente 70 a 100 milhões t/ano no mundo. No Brasil a emissão é de 9,4 milhões de t/ano, com um rebanho aproximado de 200 milhões de cabeças de gado produzimos cerca de 2,5% de todo gás produzido no mundo e 69% com as emissões brasileiras (MCT, 2004).

Fatores nutricionais, metabólicos e ambientais podem influenciar a produção de metano. Quanto à dieta podemos citar a quantidade de carboidrato solúvel, presença de lipídios ou ionóforos e o nível de ingestão desses alimentos. Já como fator metabólico temos a taxa de passagem e por fim a temperatura, manejo e população de microrganismos ruminais como fatores ambientais (McALLISTER, et al., 1996; PRIMAVESI et al., 2004).

Segundo Hegarty (2001), podemos obter a diminuição da liberação de H_2 se modularmos o tipo de fermentação ruminal para que ocorra um balanço entre as reações de formação dos ácidos graxos de cadeia curta, gerando assim um maior consumo de prótons pelas reações, evitando assim a maior liberação de CH_4 pelos ruminantes.

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO RUMINAL

2.4.1 Dieta

O tipo de dieta que oferecemos aos animais influencia diretamente nos produtos finais da fermentação ruminal, por modular a atividade metabólica dos microrganismos. Dependentemente da natureza da dieta a população de microrganismos é ajustada em número e diversidade de espécies, portanto, uma mudança de dieta acarreta em um período de transição dessa população ruminal para um melhor aproveitamento da nova dieta sobre aquele ambiente ruminal (BERGMAN et al., 1990).

Van Soest (1994), afirmou que a população microbiana no rúmen se ajusta de acordo com a dieta oferecida. Dietas com alto teor de proteína favorece um ambiente rico em microrganismos proteolíticos; dietas ricas em amido, microrganismos amilolíticos e por fim dietas com alta presença de fibra, população celulolíticas.

Dietas que exigem maior tamponamento ruminal, como as com baixa fibra que possuem alta taxa de digestão e produção de AGCC favorecem população microbiana ruminal capaz de tolerar pH ruminal mais baixo. Os microrganismos celulolíticos e matanogênicos têm menor tolerância a esse tipo de ambiente ruminal (SLYTER, 1976).

A emissão de metano também é influenciada pela dieta fornecida as animais. Kurihara et al. (1999) desenvolveram experimento com bovinos da raça Brahman com uso de três tipo de dieta: feno de baixa qualidade, feno de alta qualidade e dieta rica em grãos. Quanto à ingestão de matéria seca, foi observada que as dietas com feno de alta qualidade e rica em grãos obtiveram maiores valores (7,07 e 7,31 kg/d, respectivamente), e a dieta com feno de baixa qualidade teve o menor valor (3,58 kg/d). Os maiores consumos produziram mais metano, porém os autores avaliaram a

produção de gramas metano por quilo de matéria orgânica digestível e observaram os valores de 75,4, 64,6 e 32,1 g CH₄/ kg MOD, para feno de baixa qualidade, feno de alta qualidade e dieta rica em grãos, respectivamente. Os autores concluíram que as dietas a base de volumoso apresentam perdas energéticas na forma de metano em torno de 10,9% e a dieta rica em grãos apenas 6,7%.

2.4.2 pH

O pH ruminal tem a capacidade de modular a população de microrganismos existente no rúmen, assim como o perfil de fermentação, motilidade e absorção (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). A sua variação exerce uma pressão seletiva aos microrganismos ali existentes. Por exemplo, quando o pH está abaixo de 6 existe uma inibição da degradação da celulose já que a população celulolíticas cresce bem em pH 6,7 (VANSOEST, 1994).

O pH abaixo de 6 acarreta a uma redução da produção de metano e de amônia, pois os microrganismos amilolíticos irão agir aumentando a produção de propionato. Essa produção sequestra os íons de H⁺ diminuindo a ação das metanogênicas. Da mesma forma, a amônia é utilizada para sintetizar a proteína microbiana (VAN KESSEL; RUSSEL, 1996; ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011). Essa pressão seletiva ocorre também em adaptação à dietas de alto concentrado. Com a variação de pH os microrganismos celulolíticos diminuem e os amilolíticos aumentam, fazendo com que a atividade da amilase aumente em relação a celulase, favorecendo assim a digestão do tipo de dieta oferecido (OWENS; GOETSCH, 1993).

Devido a importância em manter uma população ruminal eficiente o organismo dos ruminantes possui um sistema tampão natural de controle do pH no rúmen, a eficiente produção de saliva (CUNNIGHAN, 2001) em dietas ricas em volumosos.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. microbiologia do rúmem. In: Berchielli, T. T., Pires, A. V., et al. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011.p.115-160.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, V. 88, 2005, p E9-E21.

BASTIANETTO, E.; BARBOSA, J.D. Diferenças fisiológicas entre bubalinos e bovinos: interferência na produção. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8, 2009. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2009, p. 1-13.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. v.2, 583p.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, n.2, 1990, p.567-590.

BORELLI, V.; FERNANDES FILHO, A.; FERREIRA, N.; HIGASHI, H. Comprimento total do intestino em *Bubalus Bubalis*. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.** Univ. S. Paulo. v. 12. 1975, p. 33-40.

BRYANT, M. P. Microbial methane production-Theoretical Aspects. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, 1979, p. 193-201.

CHALMERS, M.I. Nutrition. In: COCKRILL, W.R. **The husbandry and health of the domestic buffalo**. Rome: FAO. 1974, p.167-194.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 712.

DEMARCHI, J.J.A.A.; LOURENÇO, A.J.; MANELLA, M.Q.; ALLEONI, G.F.; FRIGUETTO, R.S.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A. Preliminary results on methane emission by Nelore cattle in Brazil grazing *Brachiaria brizantha* cv. Marandu –. In: II INTERNATIONAL METHANE AND NITROUS OXIDE MITIGATION CONFERENCE, 2003, Beijing. **Proceedings...**Beijing, 2003, p. 80-84.

COTTON, W.R.; PIELKE, R.A. **Human impacts on weather and climate**. Cambridge: Cambridge University, 1995. 288p.

EMERICK, R. J. Nitrate and Urea Toxities. In: CHURCH, C.D. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Waveland Press, 1993, 564p. FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. (Ed.). **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. p. 305-337.

FERNANDES, J.J.R. Farelo de soja em substituição à ureia em dietas para bovinos de corte em crescimento e terminação. Piracicaba, 2004. 87p. Tese (Doutorado).

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

FRANCO, G.L.; DIOGO, J.M.S. Manejo de bovinos de corte para minimizar o impacto ambiental. Organizado por: OLIVEIRA, R.L., FRANCO, G.L., BARBOSA M.A.A.B., et al. A zootecnia e o agronegócio. Brasília: ABZ, AZOO- DF UPIS 2004, p.1-11

FU, C.J.; FELTON, E.E.D.; LEHMKUHLER, J.W.; KERLEY, M.S. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. **Journal of Animal Science**, v.79, 2001, p.1305-1312.

HEGARTY, R. S. Strategies for mitigating methane emissions from livestock- Australian options and opportunities. . In: Greenhouse Gases in Animal Agriculture 2001, **Proceedings...**Obihiro, Hokkaido, Japan. 2001, p. 31-34.

HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.4, n.2,1991, p.3630-3644.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, 73, 1995, p. 2483-2492.

KANG, S.; WANAPAT, M.; ROWLINSON, P. Effect of Protein Level and Urea Source in Concentrate on Feed Intake and Rumen Ecology in Swamp Buffalo Fed Rice Straw. **Buffalo Bulletin**, v. 32(2), 2013, p. 970–974.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.

KURIHARA, M.; MAGNER, T.; HUNTER, R. A.; McCRABB, G. J. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.81, n.3, 1999, p.227-234.

LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades)**. Viçosa: UFV, 2005. 344p.

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

LOPES. H.O.S., PEREIRA.E.A.. NUNES.1.1.et al. Suplementação de baixo custo para bovinos: mineral e alimentar. Brasília:EMBRAPA-SPI.1998. 107p.

McALLISTER, T.A.; OKINE, E.K.; MATHISON, G.W. and CHENG, K.J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**. 76, 1996, p. 231-243.

MCT - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Brazil's Initial Communication to the United Nations Framework Convention on Climate Change, Brasília, MCT. 2004, p. 271.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook^{1,2}. **Journal of dairy science**, v. 90, 2007, p. E17-E38.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal Fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant Animal: digestive physiology and nutrition**. 5.ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p.145-171.

PEREIRA, K. P. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. 2007, 32p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S., LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P.F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, 2004 p.277-283.

REYNOLDS, C.K.; HARMON, D.L.; CECAVA, M.J. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal drained viscera. **Journal of Dairy Science**, v.77, 1994, p.2787-2795.

SANTOS, F. A. P.; MENDONÇA, A. P. Metabolismo de Proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap. 9. p. 265-297.

SILVA, J.F.C., LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres. 1979, 380p.

SIVKOVA, K.; TRUFCHIEV, H.; VARLIAKOV, I. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves I. Effect on diet, containing alfafa haylage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p.312-316.

SLYTER, L.L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, 43, 1976, p. 910.

STEINFELD, H.; WASSENAAR, T. The Role of Livestock Production in Carbon and Nitrogen Cycles. **Annual Review of Environment and Resources**, 32(1). 2007. 271–294p.

SUTTON, J.; DHANOA, M. S.; MORANT, S.V.; FRANCE, J.; NAPPER, D. J.; SCHULLER, E. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **J. Dairy Sci.** 86, 2003, p. 3620–3633.

TEWATIA, B.S.; BHATIA, S.K. Comparative ruminal biochemical and digestion related physiological characteristics in buffaloes and cattle fed a fibrous diet. **Buffalo Journal**, v.14, 1998, p.161- 170.

TRUFCHIEV, H.; SIVKOVA, K.; ZANKOVA, M. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves. II. Effect on diet, containing maize silage. In: World buffalo congress, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p.312-316.

USHIDA, K.; JOUANY, J.P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology, Oxford**, v.23, 1996, p.129-132.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 1. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, 1997, p.1252-1258.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D.S.. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap. 6. p. 161-191.

VAN KRUININGEN, H. J. Gastrointestinal system. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Thomson's special veterinary pathology**. 2. ed. Philadelphia: Mosby, 1995. p. 1-80.

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

VAN KESSEL, J. A. S.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, n. 4, 1996, p. 205-210.

VARGA, A. G.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal Nutrition**, v.127, n.esp., p.819-823, 1997.

VEGA, R.S.A.; DEL BARRIO, A.N.; SANGEL, P.P., et al. Eating and rumination behaviour in Brahman grade cattle and crossbred water buffalo fed on high roughage diet. **Anim. Scien. J**, v.81, n.5, p.574-579, 2010.

WALDO, D.R., GLEN, B.P.. Foreign systems for meeting the protein requirements of ruminants. II. Meeting protein requirements of cattle. In: OWENS, F.N. (Ed). Proc. protein requirements for cattle: Symposium, 109, 1981, p. 269-309.

ZEOULA, L. M.; ALCALDE, C. R.; FREGADO, F. L.; RAYMUNDO, P. T.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C. Degradação ruminal de grãos de cereais e da raspa de mandioca amassados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira Zootecnia, 1999.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA URÉIA EM DIETAS COM DUAS PROPORÇÕES VOLUMOSO:CONCENTRADO NO METABOLISMO RUMINAL E NA PRODUÇÃO DE METANO AVALIADOS PELA TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO RUMINAL *EX-SITU* (MICRO-RÚMEN) EM BÚFALOS E BOVINOS

3.1 RESUMO

O maior custo na produção animal é a fonte proteica dietética, entretanto os ruminantes são capazes de transformar nitrogênio não-proteico dietético, como a uréia, em proteína de alto valor biológico. No entanto, tal efetividade parece estar relacionada a espécie animal, sendo escassos os estudos comparativos entre bovinos e bubalinos. Desta forma este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da uréia em dietas com duas relações volumoso:concentrado (50:50 e 80:20) sobre o metabolismo ruminal e fermentação *in vitro* através da técnica *ex-situ* (micro-rumen). Foram utilizadas três vacas e três búfalos canulados no rúmen, distribuídos em delineamento em quadrado latino 3x3 replicado, com três tratamentos experimentais: 50S (50% de volumoso sem uréia), 50U (50% de volumoso com uréia) e 80U (80% de volumoso com uréia) em três períodos de 21 dias cada. Foram avaliadas a digestibilidade aparente da MS e suas frações, a excreção da MS e suas frações nas fezes, pH e concentração e produção do AGCC e metano. Os bovinos apresentaram maior consumo de matéria seca (14,73 kg/dia) que bubalinos (11,35 kg/dia). A interação dieta vs espécie mostrou maior CMS em bovinos recebendo a dieta 50U (17,85 kg/dia) que em bubalinos recebendo essa mesma dieta (10,52 kg/dia). Não houve diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade da MS, PB, FDN, FDA, EE, MO, NDT. Houve diferença significativa na excreção de EE, com interação entre dieta e espécie animal. Bovinos apresentaram maior taxa de passagem de sólidos no rúmen que os bubalinos. Em função das dietas, os bubalinos mantiveram pH ruminal mais elevado e estável que os bovinos, com menor tempo em pH 6,0 e 5,8 ao longo do dia. A dieta 50U produziu maior concentração de ácido propiônico e os bovinos produziram menor valor médio de produção total de ácidos graxos de cadeia curta (255,37 g/kg/d) que bubalinos (267,30 g/kg/d). A relação acético:propiônico também apresentou diferença

significativa nas diferentes dietas, mantendo-se menor na dieta 50U. Não houve diferenças significativas nos parâmetros de produção de metano e perda relativa de energia avaliadas entre as espécies, exceto na produção de metano em mmol por frasco fermentado, onde os bubalinos apresentaram maior produção que os bovinos. A dieta com 50S repercutiu em elevada produção do gás em comparação à 80U, da mesma forma a concentração de N-NH_3 foi superior nos animais que receberam a dieta 50S. Dieta com 80% de feno de gramínea e 20% de concentrado com uréia gerou redução de metano, modulando o ambiente ruminal de forma a evidenciar sua importância na nutrição de ruminantes em relação as demais dietas, com redução de custos de produção e dos efeitos deletérios causados pelo gás metano ao meio ambiente.

Palavras-chave: búfalos, bovinos, ácidos graxos de cadeia curta, metano, digestibilidade.

3.2 ABSTRACT

The major cost in animal production is the dietary protein source, however ruminants are able to transform dietary non-protein nitrogen, such as urea, protein of high biological value. However, this effectiveness appears to be related to animal species, with few comparative studies among cattle and buffaloes. Thus this work aimed to study the effect of urea in diets with two ratio forage:concentrate (50:50 and 80:20) on ruminal metabolism and fermentation in vitro by ex-situ technique (micro-rumen). Three cows and three buffaloes rumen cannulated were used, allotted to a replicated 3x3 Latin square with three experimental treatments: 50S (50% forage without urea), 50U (50% forage with urea) and 80U (80% forage with urea) in three periods of 21 days each. The apparent digestibility of DM and its fractions, the excretion of DM and its fractions in feces, pH and concentration and production of SCFA and methane were evaluated. The cattle had greater DMI (14.73 kg / day) than buffaloes (11.35 kg / day). Diet vs. species interaction showed greater DMI in cattle receiving 50U (17.85 kg / day) in buffaloes that received the same diet (10.52 kg / day) diet There were no significant differences in the digestibility of DM, CP, NDF, ADF, EE, OM, NDT. There were significant differences in the excretion of EE, with

interaction between diet and animal species. Cattle had a higher rate of passage of solids in the rumen than buffaloes. Depending on the diets, the buffalo remained stable and higher than cattle, with less time at pH 6.0 and 5.8 throughout the day ruminal pH. The 50U diet produced a greater concentration of propionic acid and cattle produced lower mean total production of short chain fatty acids (255.37 g / kg / d) than buffaloes (267.30 g/kg/d). The acetic: propionic ratio also showed a significant difference in the different diets, remaining lower in 50U diet. There were no significant differences for methane production and relative energy loss evaluated between species, except in methane production in mmol per bottle fermented, where the buffaloes had higher production than cattle. A diet with high 50S reverberated gas production compared to 80U, as the concentration of NH₃-N was higher in animals fed the 50S diet. Diet with 80% grass hay and 20% concentrate with urea reduction of methane generated by modulating the rumen in order to highlight its importance in the nutrition of ruminants compared with other diets, with reduced production costs and the deleterious effects caused by methane gas to the environment.

Keywords: buffalo, cattle, short-chain fatty acids, methane, digestibility.

3.3 INTRODUÇÃO

A capacidade dos ruminantes em utilizar alimentos de baixa qualidade através do seu rico ecossistema ruminal possibilita a procura de fontes alimentares alternativas para principalmente baratear o custo de produção. A uréia é umas dessas alternativas, já que as fontes proteicas equivalem ao maior custo na alimentação animal.

A utilização de fontes alternativas de proteína, como a uréia, é possível pela capacidade dos ruminantes em transformar nitrogênio não proteico em proteína de alto valor biológico.

Dependendo do sistema alimentar utilizado na produção os ruminantes podem sofrer perdas energéticas e de nitrogênio ocasionando prejuízos ao produtor e ao meio ambiente. O que se tem mais discutido em relação a produção de

ruminantes e os danos ambientais é a produção de metano, o qual tem alta relação com o fenômeno do efeito estufa terrestre (STEINFELD e WASSENAR, 2007).

Para que essas perdas e prejuízos sejam solucionados pesquisadores procuram promover um adequado balanço entre a necessidade dos animais e o que é fornecido aos mesmos.

Como buscar o adequado sistema de produção e alimentação tem sido muito dos objetivos das pesquisas atuais, temos que pensar nas diferenças existentes entre as espécies de ruminantes.

Embora os ruminantes possuam funções fisiológicas e de metabolismo semelhantes, através de estudos detalhados de metabolismo dos nutrientes e suas exigências pode-se verificar que as espécies apresentam diferenças importantes, sendo maior a importância da existência de mais estudos que determinem essas diferenças, pois muitos dados obtidos através do estudo de bovinos, por exemplo, são extrapolados para bubalinos levando a ineficiência nos sistemas produtivos que utilizam búfalos (CHALMERS, 1974).

A partir dessa ineficiência produtiva voltamos aos prejuízos produtivos e ambientais que podem ser gerados, portanto a manipulação da fermentação ruminal visando uma diminuição das perdas energéticas da dieta via metanogênese em cada espécie é de extrema importância.

Assim, o presente trabalho teve objetivo de estudar a influência da uréia em dietas com dois níveis de volumoso (50 e 80%) sobre parâmetros do metabolismo ruminal e em avaliações da fermentação in vitro através da técnica ex-situ (micro-rúmen) em bovinos e bubalinos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Local e animais experimentais

O presente experimento foi desenvolvido mantendo cuidados especiais para manutenção dos animais experimentais conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, processo USP: 13.1.2777.74.0. O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

(VNP/FMVZ), Campus de Pirassununga, nas instalações do galpão experimental. Foram utilizados três búfalos machos e três vacas não gestantes e não lactantes, com cânulas ruminais. Os búfalos apresentaram peso médio durante todo o experimento de 855 kg e os bovinos de 863,33 kg. Os animais permaneceram em galpão coberto, em baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos. O delineamento escolhido foi o quadrado latino replicado 3x3, com períodos de 21 dias e 3 tratamentos distintos.

3.4.2 Tratamentos

Foi utilizado o delineamento em dois quadrados latino (3x3), um por espécie animal com três períodos de 21 dias cada. Os três tratamentos foram constituídos de duas dietas contendo relação volumoso:concentrado em 50:50% com e sem uréia e uma dieta com 80:20% com uréia, designados 50S, 50U e 80U (Tabela 1)

Tabela 1. Proporções dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais.

Ingredientes (% MS)	Dietas		
	50S	50U	80U
Feno	56,4	54,9	80,7
Milho	36,75	44,1	18,3
Farelo de Soja	6,84	-	-
Uréia	-	1	1
Composição bromatológica			
Matéria seca ² (%)	93,54	93,58	92,36
PB ² (% MS)	13,72	12,23	12,63
FDN ² (% MS)	42,64	41,04	59,27
FDA ² (% MS)	22,69	21,48	31,76
MM ² (% MS)	4,44	4,57	5,65
EE ² (%MS)	3,23	3,41	2,13
Lignina ² (%MS)	2,96	3,12	4,73

²Estimado segundo análises bromatológicas, determinadas no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga;

As dietas foram fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia, às 8 e 16 h, na forma de ração completa. Nas manhãs seguintes eram retiradas e pesadas as sobras, para manter controle da ingestão com sobras de 5 a 10%. Dessa forma, foram determinados o consumo individual de matéria seca. Análises bromatológicas dos ingredientes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do VNP/FMVZ para obtenção dos valores de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cálcio e fósforo, segundo AOAC (1985), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, segundo Van Soest (1994). Estas amostragens tiveram como objetivo a avaliação da composição bromatológica da dieta fornecida.

Figura 1. Vista do galpão experimental com preparo da alimentação dos animais

3.4.3 Mensuração contínua de pH

O pH ruminal foi determinado pelo método de mensuração contínua através de dispositivo eletrônico data logger (Moya et al., 2011). Este equipamento registra o pH, a temperatura e o potencial oxi-redox no rúmen dos animais por diversos dias. O sistema foi desenvolvido utilizando um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor, Escondido, CA), uma bateria alcalina de 9-V e um cabo para conexão ao computador. O material é abrigado em uma cápsula de PVC resistente à água. O eletrodo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA) é coberto por uma proteção de 38-mm de diâmetro com quatro furos de 25-mm, que foram

desenvolvidos para permitir a passagem de partículas e líquido enquanto protege o eletrodo de entrar em contato com o epitélio ruminal. Dois pesos de 900 g serão acoplados ao fundo do eletrodo para manter a “probe” no saco ventral do rúmen. A conexão da “probe” ao computador permite a programação da mesma para diferentes intervalos de mensuração, bem como o descarregamento dos dados mensurados diretamente em uma planilha do Excel (Microsoft Office, 2007).

A partir desse sistema de monitoração, o pH ruminal foi mensurado por 24 h durante o 16º dia de cada período experimental, em intervalos de 10 min. Foram calculadas as variáveis: pH médio, pH mínimo, pH máximo, tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2 (em minutos) e área de pH abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2, segundo a fórmula apresentada em Moya et al. (2011). Antes e após a colocação das “probes” nos animais, as mesmas foram calibradas em soluções de pH 7,0 e 4,0. A calibração dos dados permitiu o cálculo de uma equação de regressão antes e após o teste para ajuste dos dados mensurados.

Legenda: Figura a: (a1) cano de PVC com data logger; (b1) pesos acoplados para manter a probe na mesma posição no rúmen; (c1) tampa do data logger; (d1) sensor de pH; (e1) sistema eletrônico para armazenagem dos dados; (f1) cabo para conexão ao computador; (g1) bateria 9-V e a probe pronta para ser colocada no rúmen (b).

Figura 2. Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal

3.4.4 Digestibilidade com uso de marcador

As digestibilidades das dietas foram determinadas com introdução no rúmen de 15 g de óxido de cromo usado como marcador, duas vezes ao dia, durante 10 dias, iniciando-se no 11^o dia de cada período e amostragens de fezes durante os cinco dias seguintes (16^o ao 21^o dia). A concentração do cromo foi realizada em equipamento de absorção atômica após o devido preparo das amostras, utilizando-se do método colorimétrico da S-difenilcarbazilda (GRANER, 1972).

3.4.5 Dinâmica ruminal

A dinâmica ruminal e o conteúdo total do rúmen foram determinados conforme técnica de esvaziamento do rúmen (CHILIBROSTE et al., 2000). Para tanto, nos dias 11 e 12 de cada período experimental foram realizados o esvaziamento ruminal. No dia 11 o esvaziamento foi realizado antes de a alimentação matinal ser realizada e no dia 12 foi realizado o mesmo procedimento 3 horas após a alimentação matinal. O conteúdo líquido foi retirado com auxílio de bomba a vácuo e o conteúdo sólido manualmente. Em seguida, o material sólido e líquido foram pesados separadamente e uma alíquota de 10% da amostra sólida foi obtida para determinação do teor de matéria seca, sendo o restante recolocado no rúmen. O volume sólido total foi corrigido pelo teor de MS do conteúdo que juntamente com o volume do líquido e o consumo de matéria seca foram utilizados para calcular o turnover do sólido, a taxa de passagem e a passagem de sólidos, através das seguintes fórmulas:

$$\text{Turnover sólido (\%/dia)} = 100 \times \frac{\text{Consumo de matéria seca diário (kg)}}{\text{Volume sólido total (kg)}}$$

$$\text{Taxa de passagem (\%/hora)} = \frac{\text{Turnover sólido (\%/dia)}}{24 \text{ (horas)}}$$

$$\text{Passagem de sólidos (kg/h)} = \text{Volume de sólido} \times \frac{\text{Taxa de passagem (\%/hora)}}{100}$$

3.4.6 Concentração do nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

No 21º dia de experimento foi coletado de cada animal líquido ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Dois mililitros foram colocados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e armazenado em freezer até a

realização das análises por colorimetria, segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977), as análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia FMVZ/VNP.

3.4.7 Fermentação in vitro (*Ex-Situ*) com determinação da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano

A técnica de fermentação ex-situ basicamente consiste na incubação de amostra com inóculo ruminal em frascos de vidros simulando o rúmen dos animais tanto na presença dos microrganismos e anaerobiose quanto na temperatura e pH ideais (RODRIGUES et al., 2012). Foram utilizados frascos do tipo penicilina (100 ml) devidamente lavados e enxaguados com água destilada, secos em estufa a 45°C, identificados e pesados em balança analítica.

Para obtenção dos inóculos, no 21º dia de cada período experimental foi realizada a coleta de conteúdo ruminal em cada animal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após arraçoamento da manhã. Foram obtidos 300 mL de conteúdo sólido ruminal, coletados manualmente através da fístula, e 300 mL de líquido, coletado com auxílio de bomba a vácuo. Os conteúdos líquido e sólido foram homogeneizados em liquidificador por aproximadamente 20 segundos no mesmo local das coletas. Após cada coleta foram adicionados 50 mL do conteúdo nos frascos previamente preparados, sendo em seguida lacrados com rolha de borracha e lacre de alumínio, e identificados com selos de segurança e injetado dióxido de carbono (CO₂), mantendo ambiente adequado para fermentação microbiana anaeróbia.

Foram utilizados quatro frascos por animal, sendo dois denominados brancos (sofreram inativação microbiana imediatamente) e dois frascos testes (que sofreram a incubação pelo tempo de 30 min em banho-maria). Essa incubação ocorre logo após a administração do CO₂, em banho termostático, onde permaneciam à 39°C, por 30 min. Imediatamente em seguida, foram colocados em uma panela de pressão comum contendo água a 120°C. Após o fechamento da panela foi colocada em fogão e, quando a pressão era iniciada, cronometrava-se 15 min, a fim de bloquear a atividade microbiana na amostra. Decorrido esse tempo, esperava-se o esfriamento dos frascos, a fim de se evitar a despressurização dos mesmos. Em seguida foram

levados ao Laboratório de Cromatografia do VNP/FMVZ, para a mensuração da pressão e volume dos frascos, após atingirem temperatura de aproximadamente 25°C, foi utilizado um transdutor (Datalogger universal® - modelo logger AG5000) esses dados de volume foram utilizados para determinar a produção de gás metano das amostras, e subsequente quantificação da produção de metano foi realizada a determinação da concentração de CH₄ em todos os frascos, tanto nos brancos como nos testes, através de cromatografia gasosa descrita por Erwin et al. (1961).

A determinação do volume líquido dos AGCC foi feita através da diferença entre o peso dos frascos secos em estufas (65°C por 15 dias) e o peso do frasco com conteúdo antes da estufa. Já para a determinação da concentração dos AGCC foi utilizado uma alíquota de 2,0 mL de conteúdo ruminal de cada frasco, sendo esse centrifugado por 15 min, após centrifugação é retirado 1 mL do sobrenadante e colocado em tubo de ensaio com 0,2 mL de ácido fórmico P.A., após esse processo essas amostras são processadas por cromatografia gasosa segundo Erwin et al., (1961).

3.4.8 Cálculos da produção de AGCC, CH₄ e perda de energia relativa

O cálculo para determinação da produção de metano foi feito através da multiplicação entre o volume do gás no frasco e a concentração de metano quantificada por cromatografia gasosa, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Prod.CH}_4 = (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Vol. gás tot})_{T_{30}} - (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Vol. gás tot})_{T_0}$$

Onde:

Prod CH₄ = Produção de metano no momento da injeção em frasco de penicilina até sua inativação por pressão;

Con CH₄ = Concentração CH₄ (mMol);

Volume total = somatória do volume obtido da seringa e o volume do headspace do frasco de penicilina (mL);

T₃₀ = Tempo de 30 min de incubação;

T₀ = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco)

Para a determinação da produção de AGCC foi utilizada a equação abaixo:

$$\text{Prod. AGCC} = (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Liq. Total})_{T_{30}} - (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Liq. Total})_{T_0}$$

Onde:

Prod. AGCC = Produção de AGCC no momento compreendido entre a injeção do líquido ruminal no frasco de penicilina até a inativação por autoclavagem;

Conc. AGCC = Concentração de AGCC (mMol);

Vol. Liq. Total: volume líquido no frasco de penicilina obtido por diferença de pesagem antes e depois da estufa (mL);

T_{30} = Tempo de 30 min de incubação

T_0 = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco)

Posteriormente essas produções foram expressas com base no conteúdo sólido incubados nos frascos (gramas ou quilos), que foram determinados através da diferença dos pesos dos frascos após a estufa a 65°C por 15 dias e 105°C por 3 dias e o peso do frasco vazio.

Com o valor obtido através da quantificação dos produtos da fermentação é possível calcularmos a perda de energia relativa (PER). Esse cálculo é feito através da multiplicação de cada produto pelo seu calor de combustão, afim de expressar a produção em porcentagem da energia oriunda da fermentação produzida. Assim, a PER foi a razão entre a energia contida no metano produzido e a somatória da energia contida em todos os produtos da fermentação quantificados, expressos em porcentagem. Portanto:

$$\text{PER (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{Energia do CH}_4}{\text{Energia do CH}_4 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4} \right)$$

Onde:

CH_4 = metano;

C_2 = ácido acético;

C_3 = ácido propiônico;

C_4 = ácido butírico

3.4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo procedimento PROC MIXED do programa computacional Statistical Analysis System (Versão 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para as variáveis CMS e as diversas variáveis de pH ruminal foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. Caso fossem heterogêneas, utilizou-se o teste corrigido de Welch. Estes dados foram submetidos à análise de variância, que contemplou como causas de variação o efeito de dieta, de espécie e interação dieta e espécie, como fatores fixos, bem como efeito de período e efeito de animal dentro de espécie como efeitos aleatórios. Na análise de variância foram considerados significativos $p < 0,05$. O efeito de dieta foi comparado pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, e da espécie pelo teste T ao nível de 5% de significância. Havendo interação entre as dieta e espécie, estas foram desdobradas, considerando o efeito da dieta dentro das espécies, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os dados de AGCC, CH₄, N-NH₃ e PER foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando como tempo os diferentes momentos de coleta ao longo do dia. Para tanto, os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro Wilk e também testados quanto à esfericidade pelo teste de razão de verossimilhança. Foi escolhida a matriz de covariância mais adequada para cada variável de acordo com o valor de AIC, conforme citado por Xavier (2000), sendo testadas as seguintes matrizes: sem estrutura (UN), Simetria Composta (CS), Toeplitz, Hyunh-Feldt (HF), Componente de variância (VC), Auto regressiva de 1º ordem (AR(1)), Auto regressiva de 1º ordem heterogênea (ARH(1)) e Auto regressiva de 1º ordem médias móveis (ARMA(1)). No modelo estatístico foi considerado o efeito de dieta, espécie, interação espécie e dieta, tempo, interação tempo e dieta, tempo e espécie, tempo e dieta, e tempo e período como efeitos fixos e efeito de período e animal dentro de espécie como efeitos aleatórios. Na análise de variância foram considerados significativos $p < 0,05$, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ajustado (5% de significância).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Consumo da matéria seca e dos nutrientes

As médias do consumo de matéria seca e dos nutrientes estão apresentadas na Tabela 2. Houve efeito significativo ($p=0,0446$) de espécie e da interação dieta vs espécie no consumo de matéria seca (CMS) sendo maior em bovinos (14,73 kg/dia) do que em bubalinos (11,35 kg/dia). A interação dieta vs espécie mostrou maior CMS em bovinos recebendo a dieta 50U (17,85 kg/dia) do que em bubalinos recebendo essa mesma dieta (10,52 kg/dia) (Figura 3). A Interação dieta vs espécie também foi significativa ($p=0,0404$) para o consumo de matéria seca em relação ao peso vivo (% PV) e para o consumo de matéria seca em relação ao peso metabólico ($\text{kg}^{0,75}$) ($p=0,0408$). Essas duas variáveis tiveram o mesmo comportamento, sendo o CMS médio maior em bovinos consumindo a dieta 50U (2,06% PV e 111,65 g MS / $\text{kgPV}^{0,75}$) do que em bubalinos (1,22% PV e 65,94 g / $\text{kgPV}^{0,75}$). Dessa forma, em dieta com 50% de concentrado a adição de uréia promoveu redução no CMS em bubalinos enquanto aconteceu o contrário com bovinos, promovendo acentuada diferença entre ambas espécies animais.

Paul et al. (2003) observaram valores significativamente menores para consumo de matéria seca em búfalas em lactação (2,57 kgMS/100kg de peso corporal) comparadas com vacas também em lactação (3,09 kgMS/100kg de peso corporal). Entretanto, Rodrigues et al. (1996) não encontraram diferença significativa quando compararam o consumo de matéria seca entre quatro grupos genéticos de ruminantes em confinamento: nelore ($92,19 \pm 2,35 \text{ g/kg}^{0,75}$), holandês ($93,31 \pm 2,21 \text{ g/kg}^{0,75}$) e búfalo ($87,40 \pm 2,22 \text{ g/kg}^{0,75}$).

Tabela 2. Valores médios do consumo (C) da matéria seca e dos nutrientes das diferentes espécies e dietas.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades		
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	Dieta*Espécie
CMS (kg/dia)	14,73	11,35	13,26	14,19	11,68	13,04	0,74	n.s.	**	**
CPV (% PV)	1,72	1,33	1,56 ^b	1,64 ^a	1,37 ^b	1,52	0,09	n.s.	n.s.	**
CPM (g/kg PV ^{0,75})	92,81	71,69	84,04	88,80	73,92	82,25	4,70	n.s.	n.s.	**
CPB (kg/dia)	2,11	1,70	1,72	2,17	1,82	1,90	0,15	n.s.	n.s.	n.s.
CFDN (kg/dia)	7,10	5,49	5,99	6,08	6,81	6,29	0,33	n.s.	n.s.	n.s.
CFDA (kg/dia)	3,68	2,84	3,12	3,11	3,56	3,26	0,17	n.s.	n.s.	n.s.
CEE (kg/dia)	0,42	0,32	0,40 ^A	0,45 ^A	0,24 ^B	0,37	0,03	**	n.s.	**
CENN (kg/dia)	4,36	3,33	4,31 ^A	4,98 ^A	2,23 ^B	3,84	0,36	*	n.s.	n.s.
CMO (kg/dia)	13,82	10,65	12,59	13,30	10,82	12,23	0,70	n.s.	n.s.	**

CMS= Consumo de matéria seca; CPV= Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo; CPM= Consumo de matéria seca em relação ao peso metabólico; CPB= Consumo de proteína bruta; CEB= Consumo de energia bruta; CFDN= Consumo de fibra em detergente neutro; CFDA= Consumo de fibra em detergente ácido; CEE= Consumo de extrato etéreo; CENN= Consumo de extrativo não nitrogenado; CMO= Consumo de matéria orgânica; CP= Consumo de fósforo. * valores de $p < 0,01$, ** valores de $p < 0,05$, n.s. valores não significativos estatisticamente. ^{AB} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$);

ab – letras minúsculas representam a diferença entre as dietas; e AB – letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies.

Figura 3. Interação dieta vs espécie para o consumo de matéria seca

Da mesma forma, o consumo de extrato etéreo teve efeito significativo ($p=0,0013$) quando comparadas as dietas oferecidas e a interação entre dieta vs espécie ($p=0,0206$). As médias de consumo de extrato etéreo das dietas 50S e 50U

não apresentaram significância entre si com valores médio de 0,40 kg/dia e 0,45 kg/dia respectivamente, mas a dieta 80U foi diferente quando comparada com as outras duas tendo como valor médio 0,25kg/dia. A interação entre dieta e espécie mostrou que os bovinos apresentaram consumo de extrato etéreo na dieta 50U (0,57 kg/dia) maior que os bubalinos (0,34kg/dia). Nas outras duas dietas não houve diferença entre as espécies, porém os bovinos consumiram quantidades de extrato etéreo diferentes entre todas as dietas (50S = 0,41kg/dia; 50U = 0,57kg/dia; 80U = 0,28kg/dia) e os bubalinos consumiram valores similares nas dietas 50S e 50U (0,40kg/dia e 0,34kg/dia, respectivamente) com menor valor médio na dieta 80U (0,22kg/dia).

Véras et al. (2000), Bürger et al. (2000) e Pereira et al. (2007), verificaram aumento linear do consumo de EE com a maior inclusão de concentrado na dieta, o que corrobora com os dados deste presente estudo, já que o maior nível de concentrado na dieta produziu maior consumo de extrato etéreo, possivelmente por ter em sua composição maior quantidade deste nutriente.

ab – letras minúsculas representam a diferença entre as dietas; e AB – letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies.

Figura 4. Interação dieta vs espécie do consumo de extrato etéreo (EE)

Os dados obtidos mostraram valores significativamente maiores ($p=0,0005$) de consumo de extrativo não-nitrogenado (ENN) para as dietas 50:50SU e 50:50CU (4,31kg/dia e 4,98 kg/dia, respectivamente) em relação à dieta 80:20CU (2,23 kg/dia), corroborando com Ladeira et al. (1999) para novilhos Nelore que

observaram aumento linear no consumo de extrativo não-nitrogenado com aumento de concentrado na dieta.

3.5.2 Coeficiente de digestibilidade da MS e dos nutrientes

Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) nas digestibilidades da MS, PB, FDN, FDA, EE, MO e NDT entre as espécies animais, as dietas e a interação entre dieta vs espécie. Entretanto os coeficientes de digestibilidade do ENN foram diferentes entre as dietas ($p= 0,0193$), sendo maiores nas dietas 50:50SU e 50:50CU (78,21% e 74,30%, respectivamente) do que na dieta 80:20CU (56,82%) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes das diferentes espécies e dietas.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades		
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	Dieta*Espécie
CDMS (%)	66,77	65,53	71,45	68,37	58,63	66,15	2,66	n.s.	n.s.	n.s.
CDPB (%)	72,72	74,62	71,09	74,27	75,64	73,67	2,62	n.s.	n.s.	n.s.
CDFDN (%)	66,95	64,71	69,90	65,19	62,40	65,83	2,68	n.s.	n.s.	n.s.
CDFDA (%)	58,20	54,10	61,95	56,11	50,39	56,15	3,60	n.s.	n.s.	n.s.
CDEE (%)	77,78	79,02	82,27	81,12	71,82	78,40	2,14	n.s.	n.s.	n.s.
CDENN (%)	68,14	73,25	78,21 ^A	74,30 ^A	56,82 ^B	70,54	2,82	**	n.s.	n.s.
CDMO (%)	68,37	67,05	73,32	69,60	60,21	67,71	2,56	n.s.	n.s.	n.s.
NDT (%)	68,54	67,51	72,76	71,25	60,07	68,02	2,48	n.s.	n.s.	n.s.

CDMS= Consumo de matéria seca; CDPB= Consumo de proteína bruta; CDFDN= Consumo de fibra em detergente neutro; CDFDA= Consumo de fibra em detergente ácido; CDEE= Consumo de extrato etéreo; CDENN= Consumo de extrativo não nitrogenado; CDMO= Consumo de matéria orgânica; NDT = Nutrientes digestíveis total. * valores de $p<0,001$, ** valores de $p<0,005$, n.s. valores não significativos. ^{AB}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Putrino et al. (2007) observaram comportamento linear da digestibilidade do ENN com níveis crescentes de concentrado na dieta, corroborando com os dados deste trabalho que mostram maior digestibilidade com a dieta que apresentou maior nível de concentrado. Entretanto, Pereira et al. (2007) não verificaram efeitos do nível de concentrado na dieta sobre a digestibilidade do ENN em bovinos..

A inclusão de uréia em substituição a proteína verdadeira não resultou em diferenças significativas nas digestibilidades dos nutrientes em dietas com 50% de

concentrado, entretanto, observou-se menores valores médios absolutos em todos os nutrientes, exceto na proteína bruta. De forma semelhante, outros pesquisadores não observaram efeitos em dietas contendo diferentes níveis de uréia na digestibilidade aparente dos nutrientes em bovinos (Milton et al., 1997; Carmo et al. (2001); Rennó, 2003; Pereira et al., 2007) e em ovinos (Silva et al., 1994)

Oliveira Junior et al. (2004) quando avaliaram a substituição do farelo de soja por uréia e amiréia não encontraram diferenças entre os tratamentos para a digestibilidade da MS, MO, CNF, EE e PB, porém houve diferença no coeficiente de digestibilidade do extrativo não nitrogenado.

3.5.3 Excreção dos nutrientes nas fezes

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na excreção dos nutrientes avaliados entre dietas, espécies e interação dieta vs espécie, com exceção da excreção do EE ($p = 0,0324$) (Tabela 4). Embora não tenha sido detectadas diferenças significativas, os bubalinos apresentaram menores valores médios de nutrientes que os bovinos. Os bovinos tiveram comportamento similar na excreção de EE com as dietas 50S e 80U (0,08kg/dia e 0,07kg/dia, respectivamente) e diferente com a dieta 50U (0,13kg/dia) e houve uma maior excreção nos bovinos consumindo a dieta 50U (0,13kg/dia) do que os bubalinos (0,05kg/dia) (Figura 5). Não foi possível encontrar dados na literatura sobre a excreção de EE em bovinos e búfalos em condições experimentais semelhantes.

Tabela 4. Valores médios da excreção da matéria seca e dos nutrientes nas fezes em bovinos e bubalinos e nas três dietas experimentais.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades		
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	D*Esp
EXMS (kg/dia)	4,90	3,71	3,82	4,24	4,85	4,30	0,37	n.s.	n.s.	n.s.
EXPB(kg/dia)	0,60	0,40	0,56	0,51	0,44	0,50	0,06	n.s.	n.s.	n.s.
EXFDN(kg/dia)	2,37	1,86	1,81	1,95	2,59	2,11	0,20	n.s.	n.s.	n.s.
EXFDA kg/dia)	1,57	1,25	1,19	1,26	1,78	1,41	0,14	n.s.	n.s.	n.s.
EXEE (kg/dia)	0,09	0,06	0,07	0,09	0,07	0,08	0,01	n.s.	n.s.	**
EXENN kg/dia)	1,32	0,98	0,95	1,28	1,21	1,15	0,12	n.s.	n.s.	n.s.
EXMO (kg/dia)	4,38	3,31	3,39	3,84	4,31	3,84	0,32	n.s.	n.s.	n.s.
EXN (kg/dia)	0,10	0,07	0,09	0,08	0,07	0,08	0,01	n.s.	n.s.	n.s.

EXMS= Excreção de matéria seca; EXPB= Excreção de proteína bruta; EXFDN= Excreção de fibra em detergente neutro; EXFDA= Excreção de fibra em detergente ácido; EXEE= Excreção de extrato etéreo; EXENN= Excreção de extrativo não nitrogenado; EXMO= Excreção de matéria orgânica; EXN = Excreção de nitrogênio. * valores de $p<0,01$, ** valores de $p<0,05$, n.s. valores não significativos. ^{AB} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

ab – letras minúsculas representam a diferença entre as dietas; e AB – letras maiúsculas representam a diferença entre as espécies.

Figura 5. Excreção do EE nas espécies bovina e bubalina.

3.5.4 Dinâmica ruminal

Os valores médios apresentados na Tabela 5 referem-se à dinâmica ruminal, onde as dietas não diferiram entre si ($p>0,05$) para as variáveis VolLiqTot (volume líquido total), VolSolTot (volume sólido total), TurnSol (turnover sólido) e TaxPa (taxa

de passagem). Já para a variável PaSol (passagem de sólido), as espécies diferiram entre si ($p=0,0364$), onde os bovinos apresentaram uma maior passagem de sólido (0,58 kg/hora) quando comparados aos bubalinos (0,44 kg/hora).

Tabela 5 Valores médios da dinâmica ruminal das diferentes espécies e dietas.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades		
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	Dieta*Espécie
VolLiqTot (kg)	67,73	56,03	53,74	62,96	68,95	61,88	2,87	n.s.	n.s.	n.s.
VolSolTot (kg)	9,11	7,43	7,66	7,78	9,38	8,27	0,53	n.s.	n.s.	n.s.
TurnSol (%/dia)	166,51	168,79	179,44	185,27	138,23	167,65	13,43	n.s.	n.s.	n.s.
PaSol (kg/hora)	0,58	0,44	0,51	0,56	0,47	0,51	0,03	n.s.	**	n.s.
TaxPa (%/hora)	6,94	7,03	7,48	7,72	5,76	6,99	0,56	n.s.	n.s.	n.s.

VolLiqTot = Volume Líquido Total, VolSolTot = Volume de Sólidos Totais, TurSol = Turnover de sólidos, TaxPa = Taxa de Passagem de sólidos e PaSol = Passagem de Sólidos. * valores de $p<0,01$, ** valores de $p<0,05$, n.s. valores não significativos.

Em revisão de literatura Bastianetto e Barbosa (2009), citaram que a frequência de movimentos ruminais nos búfalos é menor que nos bovinos o que resulta em um maior tempo de retenção do alimento proporcionando uma maior ação da população de microrganismos existentes no rúmen. Isso permite explicar assim a diferença observada na variável PasSol, em que os búfalos apresentaram maior tempo de retenção que os bovinos.

Os dados obtidos da dinâmica no rúmen corroboram com os de Bartocci et al. (1997) que ao avaliarem a retenção do alimento entre búfalos e bovinos observaram que o bubalino apresenta um maior tempo de retenção (40,33 h) que bovinos (33,44 horas). Os autores concluíram que esse maior tempo de retenção do alimento em bubalinos, bem como o menor movimento ruminal e maior tempo de exposição do alimento à microbiota ruminal propiciam vantagem na utilização de alimentos com maior teor de fibras sobre os bovinos.

3.5.5 pH

Os valores obtidos através da mensuração continua de pH são apresentados na Tabela 6. Podemos verificar que houve significância na probabilidade Dieta vs Espécie para as variáveis tempo abaixo de pH 5,8 ($p=0,0499$) e pH 6,0 ($p=0,0208$)

em minutos. Esta técnica de mensuração contínua de pH apresenta uma série de possibilidades para o estudo do pH ruminal o que pode facilitar a compreensão das interrelações entre a fermentabilidade da dieta, o consumo e o pH ruminal (PENNER et al., 2006). Em função das dietas, os bubalinos mantiveram pH ruminal mais elevados e estáveis que os bovinos, com menor tempo nas variáveis avaliadas em pH 6,0 e 5,8.

Pesquisadores estudando o fluido ruminal de bovinos e bubalinos encontraram valores em média de 6,84 para bovinos e 6,80 para bubalinos, não existindo diferenças significativas entre as espécies e as diferentes coletas realizadas, onde concorda com este experimento em que o pH médio entre as espécies não diferiram (BARBOSA et al., 2003).

Tabela 6. Valores médios da mensuração contínua do pH ruminal das diferentes espécies e dietas.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades		
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	D*Esp
pH médio	6,37	6,58	6,43	6,40	6,61	6,48	0,06	n.s.	n.s.	n.s.
pH mínimo	5,70	5,99	5,60	5,76	6,07	5,85	0,08	n.s.	n.s.	n.s.
pH máximo	6,93	7,03	6,97	6,97	7,00	6,98	0,03	n.s.	n.s.	n.s.
T. abaixo de 5,2 (min)	8,89	0,00	0,00	13,33	0,00	4,44	3,08	n.s.	n.s.	n.s.
T. abaixo de 5,8 (min)	172,78	35,00	109,17	189,17	13,33	103,89	44,17	n.s.	n.s.	**
T. abaixo de 6,0 (min)	283,33	106,67	214,17	293,33	77,50	195,00	55,75	n.s.	n.s.	**
Área pH 5,2	0,70	0,00	1,03	0,01	0,00	0,35	0,34	n.s.	n.s.	n.s.
Área pH 5,8	0,77	0,01	0,25	0,94	0,01	0,41	0,23	n.s.	n.s.	n.s.
Área pH 6,0	1,55	0,81	1,63	1,76	0,15	1,18	0,49	n.s.	n.s.	n.s.

T. abaixo de 5,2, min = tempo abaixo do pH 5,2 em minutos, T. abaixo de 5,8, min = tempo abaixo do pH 5,8 em minutos, T. abaixo de 6,0, min = tempo abaixo do pH 6,0 em minutos. EPM = erro padrão da média. * valores de $p < 0,01$, ** valores de $p < 0,05$, n.s. valores não significativos. ^{AB}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.5.6 Produção de ácidos graxos de cadeia curta e metano

A utilização da nova técnica *ex-situ* (micro-rúmen) gera um grande número de informações para as produções de AGCC e de CH₄, além de uma nova variável, a perda de energia relativa (PER) de metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal, os AGCC. Devido à originalidade da técnica, há escassez de

informações sobre a produção destes parâmetros. Assim, os mesmos serão discutidos com base na concentração de AGCC e emissão de metano por kg de MS do conteúdo ruminal.

Os valores médios da produção de AGCC estão apresentados na Tabela 7. É possível verificar que a produção de ácido acético não foi influenciada ($p>0,05$) tanto pelas diferentes dietas quanto pelas diferentes espécies estudadas. Já a produção do ácido propiônico ocorreu significância nos tempos 0 minutos ($p=0,0196$) e 30 minutos ($p=0,0196$) em relação a dieta. A dieta 50U no tempo 0 diferiu das outras duas dietas com a produção de 22,6 mmol/L contra as dietas 50S (15,58 mmol/L) e 80U (15,12 mmol/L). Da mesma forma a dieta 50U obteve maior valor para a produção no tempo 30 minutos com produção de 25,54 mmol/L em relação às dietas 50S (16,86 mmol/L) e 80U (16,42 mmol/L). Essa produção de ácido propiônico teve valores significativos nas diferentes horas de coleta para as variáveis de produção no tempo 0 minutos ($p=0,0067$), no tempo 30 minutos ($p=0,0442$) e na produção mmol/frs ($p=0,0232$).

As dietas promoveram diferenças na produção de ácido butírico por mmol/frs ($p=0,0276$). As dietas 50S e 50U produziram 0,03 mmol/frs e diferiram da dieta 80U que produziu 0,02 mmol/frs (Tabela 7). Quando analisada a produção total dos AGCC por g/kg/d, as espécies diferiram entre si ($p<0,001$), onde os bovinos produziram menor valor médio (255,37 g/kg/d) que bubalinos (267,30 g/kg/d). A produção total de AGCC por mmol/L no tempo 30 minutos teve significância para a probabilidade das diferentes horas de coleta ($p=0,0368$).

Goularte et al. (2011) quando trabalharam com vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta não encontraram diferença para as concentrações de ácido acético, butírico e nas concentrações dos AGCC totais. Já Pedreira et al. (2004) quando utilizaram diferentes proporções volumoso:concentrado observaram que a concentração dos ácidos propiônico e butírico foi superior em dietas que apresentaram maior inclusão de grãos na dieta. Gabarra (2001) avaliou os parâmetros ruminais de novilhos nelores alimentados com fontes proteicas e energéticas de diferente degradabilidade ruminais. As diferentes fontes proteicas, farelo de soja e uréia, não afetaram a concentração molar de ácido acético e ácido butírico ($p>0,05$).

Houve maior relação acético/propiónico nas dietas 50S e 80U (4,90 e 5,01, respectivamente) ficando para a dieta 50U a menor relação acético/propiónico (3,78) ($p=0,0251$) (Tabela 7).

Berchielli et al. (1996) observaram em bovinos alimentados com diferentes proporções volumoso:concentrado que quando o nível de concentrado se elevava de 20 para 60% as concentrações de propionato variavam significativamente de 1,76 para 2,30 mmol/L e o butirato de 1,00 para 1,18 mmol/L, mas não verificaram diferenças em relação ao acetato e o total do AGCC.. A relação acetato:propionato foi maior em dieta com maior teor de volumoso, concordando com o presente estudo em que houve maior valor de relação acetato:propionato com a dieta com 80% de volumoso. Imaizumi et al. (2002) quando compararam o farelo de soja e a uréia dentro do mesmo teor de PB em dietas experimentais para bovinos não observaram diferenças significativas para as concentrações molares de AGCC, concluindo que a fonte de proteína não influencia a produção desses ácidos graxos de cadeia curta. Esses dados estão de acordo com este estudo que a uréia não influenciou na produção total dos AGCCs.

Da mesma forma, a substituição parcial da proteína do farelo de soja por uréia e amiréia, em dietas para vacas da raça holandesa no período seco, não promoveu efeito sobre a concentração ruminal do AGCC totais, os ácidos acético, butírico e propiónico e a relação acético:propiónico (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2004).

Tabela 7. Valores médios da produção de AGCC nas diferentes dietas e espécies

Variáveis	Espécie		Dieta			Probabilidades								
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U	Média	EPM	Dieta	Espécie	D*Esp	Hora	D*Hr	Esp*Hr	D*Esp*Hr
Acético														
0 min (mmol/L)	74,06	76,04	74,17	76,05	75,08	75,10	1,30	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
30 min (mmol/L)	78,29	81,56	79,40	81,47	79,05	79,97	1,51	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mmol/frs)	0,09	0,11	0,12	0,11	0,08	0,10	0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Diferença (mmol/L)	4,35	5,59	5,90	5,29	3,70	5,00	0,43	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mol/kg/d)	2,25	2,64	2,95	2,55	1,80	2,45	0,24	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (g/kg/d)	134,77	158,43	176,99	152,96	108,09	147,20	14,14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Propiônico														
0 min (mmol/L)	18,87	16,80	15,58 ^B	22,66 ^A	15,12 ^B	17,79	0,714	**	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
30 min (mmol/L)	20,99	18,22	16,86 ^B	25,54 ^A	16,42 ^B	19,57	0,852	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mmol/frs)	0,04	0,03	0,03	0,05	0,02	0,04	0,00	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Diferença (mmol/L)	1,78	1,62	1,49	2,48	1,14	1,70	0,16	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mol/kg/d)	0,94	0,79	0,77	1,24	0,57	0,86	0,09	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (g/kg/d)	69,72	58,23	57,39	91,82	42,56	63,68	6,49	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Butírico														
0 min (mmol/L)	10,42	9,64	10,18	11,45	8,40	10,01	0,346	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
30 min (mmol/L)	11,49	10,84	11,23	13,01	9,22	11,16	0,435	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mmol/frs)	0,02	0,02	0,03 ^A	0,03 ^A	0,02 ^B	0,04	0,004	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Diferença (mmol/L)	1,08	1,19	1,25	1,41	0,74	1,14	0,110	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mol/kg/d)	0,58	0,57	0,64	0,69	0,38	0,58	0,057	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (g/kg/d)	50,89	50,64	56,63	61,45	33,49	50,76	5,000	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Total														

0 min (mmol/L)	103,35	102,48	99,93	110,15	98,60	102,89	1,99	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
30 min (mmol/L)	110,76	110,62	107,48	120,02	104,69	110,69	2,371	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mmol/frs)	0,16	0,17	0,18	0,19	0,12	0,16	0,014	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Diferença (mmol/L)	7,20	8,40	8,64	9,19	5,58	7,83	0,610	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (mol/kg/d)	3,76	4,00	4,37	4,49	2,76	3,89	0,330	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Produção (g/kg/d)	255,37	267,30	291,02	306,23	184,14	261,64	2,420	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Rel A/P (Conc.)	4,33	4,78	4,90 ^A	3,78 ^B	5,01 ^A	4,56	0,109	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Rel A/P (Prod.)	3,41	3,76	4,04	3,12	3,60	3,59	0,296	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

EPM = Erro padrão da média, D*Esp = interação entre dieta e espécie; D*Hr = interação entre dieta e hora; Esp*Hr = interação entre espécie e hora; D*Esp*Hr = interação entre dieta, espécie e hora. Rel A/P (Conc.) = relação acético/ propiônico na concentração; Rel A/P (Prod.) = relação acético/propionico na produção ^{ABC}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * valores de $p < 0,01$, ** valores de $p < 0,05$, n.s. valores não significativos.

Tabela 8. Valores médios da produção de metano e PER nas diferentes dietas e espécies.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades						
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	D*Esp	Hora	D*Hr	Esp*Hr	D*Esp*Hr
Metano (mmol/frs)	0,105	0,1473	0,1479 ^A	0,1376 ^{AB}	0,0908 ^B	0,1265	0,008	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Metano (mmol/g/h)	0,055	0,0713	0,073	0,0656	0,0496	0,0633	0,005	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
Metano (mmol/kg/d)	1,317	1,714	1,763	1,574	1,191	1,521	0,113	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Metano (g/kg/d)	21,07	27,42	28,21	25,19	19,06	24,33	1,807	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
PER (%)	22,39	25,98	23,40	24,46	24,94	24,23	1,544	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

PER = Perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal ^{ABC}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* valores de $p < 0,01$, ** valores de $p < 0,05$, n.s. valores não significativos.

Chanthakhoun et al. (2009) verificaram maior quantidade de acetato e N-NH_3 em fluido ruminal em bovinos que bubalinos, mas estes apresentaram maior concentração de AGCC total, propionato e butirato.

Os resultados da análise de metano podem ser observados na Tabela 8. Quando analisamos a produção de metano por mmol/frasco obtivemos diferença significativa para dieta ($p=0,0314$) e espécie ($p=0,0343$). A dieta 50S (0,1479 mmol/fr) diferiu da dieta 80U que obteve valor 0,0908 mmol/frs e o inoculo dos bubalinos (0,1473 mmol/frs) gerou uma maior produção de metano nos frascos do que com o inoculo ruminal de bovinos (0,1050 mmol/frs). Assim, é interessante ressaltar que na dieta contendo 80% de volumoso com adição de uréia esperava-se uma maior produção de metano devido a menor quantidade de carboidratos prontamente solúvel disponível em relação à dieta com maior relação concentrado:volumoso. Porém, a dieta 80S também promoveu menor concentração total por dia de acetato embora não houve diferença significativa (Tabela 7). Por outro lado, a dieta que produziu maior concentração de ácido propiônico (50U) não foi capaz de reduzir a produção de metano quando comparada com a dieta 80U.

Primavesi et al. (2004) concluíram que a emissão de metano por bovinos se alimentando de forragem tropical é superior aos bovinos alimentados com forrageiras de clima temperado. Estes autores afirmam ainda que os animais taurinos produzem menos metano quando comparados aos animais zebuínos.

Pesquisadores relatam que as dietas que contem maior quantidade de carboidratos solúveis levam a um menor pH ruminal que as dietas que utilizam as forragens maduras, o que aliado às maiores taxas de fermentação, podem inibir as bactérias metanogênicas e os protozoários ciliados, aumentando a produção de propionato e diminuindo assim a produção de metano (VAN KESSEL e RUSSEL, 1996).

Pedreira et al. (2004) quando trabalharam com diferentes relações volumoso:concentrado verificaram que ao adicionar 30% de concentrado em uma dieta com 70% de volumoso a produção de metano foi maior, proporcionando um ambiente favorável a digestão da fibra, já que possui energia suficiente para os microrganismo utilizarem, mas ao adicionar 60% de concentrado em uma dieta com 40% de volumoso não houve diferença significativa entre os outros tratamentos, o que leva a crer que esta dieta proporciona um ambiente desfavorável ao crescimento das bactérias celulolíticas.

Quando o alimento permanece mais tempo no rúmen, sofre mais ação dos microrganismos. Assim, dietas com alta taxa de digestão reduzem as emissões de metano (AAFC, 2003), o que pode explicar o fato dos bubalinos produzirem mais metano, já que essa espécie tem uma menor taxa de passagem do alimento, levando a um maior tempo de retenção no rúmen e maior tempo de ação dos microrganismos.

3.5.7 Nitrogênio Amoniacal (N-NH₃)

Os valores médios da concentração de N-NH₃ estão apresentados na Tabela 9. Para todas as variáveis analisadas as dietas apresentaram diferença significativa, com os maiores valores sempre na dieta 50S, porém nas variáveis N-NH₃ – 0' e N-NH₃ – 30' foi diferente apenas da dieta 50U. Houve interação significativa ($p=0,0176$) Dieta vs Espécie para a variável N-NH₃ – 0'. Para as diferentes horas de coleta também existiu diferença nas variáveis N-NH₃ – 0' ($p=0,0182$) e N-NH₃ – 30' ($p<0,0001$) (Tabela 9). Houve também significância ($p=0,0447$) para a probabilidade D vs Hr na variável diferença e na Esp vs Hr a significância ($p<0,0001$) ficou por conta da variável N-NH₃ – 30'.

Pela Figura 6 podemos visualizar um pico de N-NH₃ próximo a 3 horas após a alimentação com as dietas 50U e 80U, indicando alta produção de amônia com a utilização da uréia como fonte de N pelos microrganismos no rúmen. Já na dieta sem uréia (50S) com o uso do farelo de soja como fonte de N, ocorreram valores médios mais constantes de concentração de N-NH₃, obtendo assim um valor total mais alto do que as outras dietas quando consideramos o N-NH₃. Isso provavelmente influenciou para que o valor médio da concentração de amônia ao longo das 24 horas permanecesse menor em dietas com 50% concentrado com o uso de uréia. Santos e Pedroso (2011) observaram pico de produção de amônia entre 3 a 5 horas após alimentação em animais alimentados com fontes de proteína verdadeira, o que corrobora com este estudo, já que os maiores valores obtidos com dieta 50S ocorreram entre 3 e 6 horas.

Tabela 9 Valores médios da produção de N-NH₃ nas diferentes espécies e dietas experimentais.

Variáveis	Espécie		Dieta			Média	EPM	Probabilidades						
	Bovino	Bubalino	50S	50U	80U			Dieta	Espécie	D*Esp	Hora	D*Hr	Esp*Hr	D*Esp*Hr
N-NH ₃ - 0' (mg/dL)	13,62	12,97	14,88 ^A	11,29 ^B	13,91 ^A	13,27	1,038	*	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
N-NH ₃ - 30' (mg/dL)	15,53	14,50	17,15 ^A	12,60 ^B	15,54 ^A	14,98	1,115	**	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.
Diferença (mg/dL/h)	3,819	3,05	4,52 ^A	2,62 ^B	3,26 ^B	3,41	0,274	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.

ABC Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * valores de $p < 0,01$, ** valores de $p < 0,05$, n.s. valores não significativos.

Figura 6. Concentração de nitrogênio amoniacal nos diferentes tempos de coleta de conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9, 12 horas após a alimentação matinal.

A concentração ruminal de N-NH_3 é uma relação entre a produção e a utilização deste composto pelos microrganismos, sendo esta última dependente da quantidade de energia disponível (BORGES, 1999). Segundo o NRC (1996), para se obter uma máxima digestão da matéria seca é necessária uma concentração mínima de 5mg/dL de N-NH_3 . Porém, Leng (1990) sugere a necessidade de valores superiores a 10 mg/dL. Dessa forma, os valores obtidos se enquadram nestes valores considerados bons para a máxima digestão da MS.

Gambarra (2001) e Knaus et al. (2001) não encontraram diferença ($p>0,05$) para a concentração de N-NH_3 entre duas fontes diferentes de proteína, soja e uréia, para bovinos. Entretanto, observamos diferenças entre as fontes uréia e a soja.

3.6 CONCLUSÕES

A utilização da uréia em uma dieta que contenha 50% de volumoso apresenta maior consumo de matéria seca e extrato etéreo e de produção de ácido propiônico com menor relação acético:propiônico, não influenciando nos coeficientes de digestibilidade de nutrientes, na dinâmica ruminal e no pH, demonstrando boa alternativa para a substituição da soja.

Dieta com 80% de volumoso e 20% de concentrado contendo uréia como fonte de nitrogênio não proteico promoveu redução da produção de metano em relação a dieta contendo 50% de volumoso e 50% de concentrado com nitrogênio proteico com farelo de soja, modulando de forma a evidenciar sua importância na nutrição de ruminantes, com redução de custos de produção e dos efeitos deletérios causados pelo gás metano ao meio ambiente. Entretanto, há necessidade de novas pesquisas científicas para esclarecimento do processo metabólico observado.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL AND AGRI-FOOD CANADA - AAFC. Estimates of emissions: methane. Disponível em: <http://www.agr.ca/research/Healthy_Air> On line. Acesso em: 07 mar. 2014.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analyses. 13. ed. Washington: AOAC, 1985. 1051 p.

BARBOSA, J.D.; ÁVILA, S.C.; DIAS, R.V.C.; PFEIFER, I.B.; OLIVEIRA, C.M.C. Estudo comparativo de algumas provas funcionais do fluido ruminal e de metabólitos sanguíneos de bovinos e bubalinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 23, n. 1, 2003, p. 33 – 37.

BARTOCCI, S.; AMICI, A.; VERNA, M. ET AL. Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle, and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. **Livestock Production Science**. v.52, 1997, p. 201-208.

BASTIANETTO, E.; BARBOSA, J.D. Diferenças fisiológicas entre bubalinos e bovinos: interferência na produção. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 8, 2009. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2009, p. 1-13.

BERCHIELLI, T.T., RODRIGUEZ, N.M., ANDRADE, P. Concentração, proporção molar e taxa de produção de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen de bovinos alimentados com diferentes níveis de concentrado na dieta. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.25, n.3, 1996, p.511-521.

BORGES, A. L. C. C. Controle da ingestão de alimentos. **Caderno Técnico Escola de Veterinária - UFMG**, . único, n. v21, 1999, p. 67-69.

BURGER, P.J.; PEREIRA, J.C.; COELHO da SILVA, J.F. et al. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, 2000, p.206-214.

CARMO, C.A.; BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P. Degradabilidade da matéria seca e fibra em detergente neutro da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) com diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, 2001, p.2126-2133.

CHALMERS, M.I. Nutrition. In: COCKRILL, W.R. **The husbandry and health of the domestic buffalo**. Rome: FAO. 1974, p.167-194.

CHANTHAKHOUN, V.; WANAPAT, M.; KONGMUN, P.; CHERDTHONG, A. Comparision of ruminal fermentation characteristics and microbial population in swamp buffalo and cattle. **Livestock Science**, v. 143, 2012, p. 172 – 176.

CHILIBROSTE, P.; TAMMINGA, S.; BOER, H.; GIBB, M.J.; DIKKEN, G. Duration of regrowth of ryegrass (*Lolium perenne*) effects on grazing behaviour, intake, rumen fill and fermentation of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, 2000, p. 984-995.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, 1961, p. 1768-1771.

FOLDAGER, J. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. 1997. Xx p. Tese (Doutorado) - East Lasing - Michigan State University. 1977.

GABARRA, P.R. Digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos nelore alimentados com fontes proteicas e energéticas com diferentes degradabilidade ruminais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001, 94p. Dissertação (Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2001.

GRANER, C.A.F. Determinação do crômio pelo método colorimétrico da S-difenilcarbazida. Botucatu, SP: FCMB, 1972. 112p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, 1972.

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

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

KNAUS, W.F.; BEERMANN, D.H.; GUIROY, P.J.; BOEHM, M.L.; FOX, D.G. Optimization of rate and efficiency of dietary nitrogen utilization through the use of animal by-products and (or) urea and their effects on nutrient digestion in Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v.78, 2001, p.1060-1066.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v. 15, n. 4, 1972, p. 801-810.

LADEIRA, M.M.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I.; SAMPAIO, R.L. Consumo e digestibilidade aparentes totais e parciais de dietas contendo diferentes níveis de concentrado, em novilhos nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 28, n.2, 1999, p. 395 – 403.

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

MILTON, C. T.; BRANDT, R. T.; TITGEMEYER, E. C. Urea in dry-rolled corn diets: finishing steer performance, nutrient digestion, and microbial protein production. **Journal of Animal Science**, v. 75, 1997, p. 1415 – 1424.

MOYA, D.; MAZZENGA, A.; HOLTSHAUSEN, L.; COZZI, G.; GONZÁLEZ, L. A.; CALSAMIGLIA, S.; GIBB, D. G.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately. **Journal Animal Science**, v. 89, 2011, p. 520–530.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7 ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996.

OLIVEIRA JUNIOR, R.C.; PIRES, A.V.; FERNANDES, J. J. R. et al. Substituição total do farelo de soja por uréia ou amiréia, em dietas com alto teor de concentrado, sobre a nitrogênio amoniacal ruminal, os parâmetros sanguíneos e o metabolismo do nitrogênio em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, 2004, p. 738-748.

PAUL, S. S.; MANDAL, A. B.; KANNAN, A.; MANDAL, G. P.; PATHAK, N. N. Comparative dry matter intake and nutrient utilisation efficiency in lactating cattle and buffaloes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83(4), 2003, p. 258–267.

PEDREIRA, M.S.; BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A.; FRIGHETTO, R. Produção de metano e concentração de ácidos graxos voláteis ruminal em bovinos alimentados com diferentes relações de volume:concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

PENNER, G. B., YU, P.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. **Animal Feed Science Technology**, v. 153, 2009, p. 1–10.

PEREIRA, D. H.; PEREIRA, O. G.; SILVA, B. C.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. D. C.; CHIZZOTI, F. H. M.; GARCIA, R. Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. **Livestock Science**, 107(1), 2007, p. 53–61.

PRIMAVESI, O., FRIGHETTO, R.T.S., LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P.F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, 2004, p.277-283.

PUTRINO, S.M.; LEME, P.R.; SILVA, S.L.; MANELLA, M.Q.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LIMA, C.G.; ALLEOM, G.F. Digestibilidade aparente de dietas com níveis crescentes de concentrado em novilhos Brangus e Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 2, 2007, p. 406-413.

RENNÓ, L.N. Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois de proteína. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 252p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RODRIGUES, L.R.R., FONTES, C.A.A., JORGE, A.M. et al. Consumo de rações contendo quatro níveis de concentrado por bovinos holandeses e nelores e por bubalinos. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, 25(3), 1996, p. 568-581.

RODRIGUES, P. H.; M. PINEDO L. A.; SOLORZANO, L. A. R.; PERNA JR, F.; MARTINS M. F.; CASTRO A. L.; GODOY G. L. A.; MARINO, C. T.. Descrição da metodologia ex-situ de estudo da fermentação ruminal (micro-rúmen) com vistas à mensuração da produção de metano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA A PRODUÇÃO ANIMAL NO MUNDO EM TRANSFORMAÇÃO, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Brasília – DF, 2012.

SANTOS, F. A. P.; MENDONÇA, A. P. Metabolismo de Proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap. 9. p. 265-297.

SILVA, J.F.C.; PEREIRA, J.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VILELA, L.M.R.; LOMBARDI, C.T. Valor nutritivo da palha de arroz suplementada com amiréia, fubá+uréia e farelo de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29,1994, p.1475-14881.

STEINFELD, H.; WASSENAAR, T. The Role of Livestock Production in Carbon and Nitrogen Cycles. **Annual Review of Environment and Resources**, 32(1). 2007. 271–294p.

VAN KESSEL, J. A. S.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, n. 4, 1996, p. 205-210.

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

VÉRAS, A.S.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; PAULINO, M.F.; CECON, P.R.; VALADARES, R.F.D.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, L.S. Consumo e digestibilidade aparente em bovinos nelore não-castrados, alimentados com rações contendo diferentes níveis de concentrado. **Rev. Bras. Zootec.**, 29(6), 2000, p. 2367 – 2378.