



Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos¹

Viviane Aparecida Carli Costa², Edenio Detmann³, Sebastião de Campos Valadares Filho², Mário Fonseca Paulino², Lara Toledo Henriques⁴, Hilário Cuquetto Mantovani⁵

¹ Projeto financiado pela FAPEMIG (Programa Pesquisador Mineiro) com apoio do CNPq.

² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP: 36571-000. Bolsista do CNPq.

³ DZO-UFV, Viçosa, MG. Pesquisador do CNPq.

⁴ Bolsista PRODOC-CAPES, DZO-UFV, Viçosa, MG.

⁵ Departamento de Microbiologia, UFV, Viçosa, MG. Pesquisador do CNPq.

RESUMO - Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação proteica e/ou com carboidratos sobre a degradação ruminal da fibra em detergente neutro (FDN) de forragem tropical de alta qualidade. No experimento, foi simulada a suplementação de bovinos em terminação sob pastejo durante o período chuvoso (70% de forragem e 30% de concentrado, com base na matéria seca). Como forragem basal utilizou-se amostra de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cortado aos 21 dias de rebrotação. O concentrado utilizado no tratamento-base foi formulado de forma a apresentar 30% de proteína bruta, com amido como componente energético e caseína como componente proteico. Os tratamentos foram construídos mediante o não-fornecimento das fontes proteica e/ou energética do suplemento e substituição total do amido por pectina. Desta forma, avaliaram-se seis tratamentos (1. forragem; 2. forragem + amido; 3. forragem + pectina; 4. forragem + caseína; 5. forragem + caseína + amido; e 6. forragem + caseína + pectina) em ambiente ruminal simulado por incubação *in vitro* em diversos tempos de incubação: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. O procedimento de incubação foi repetido cinco vezes, perfazendo o total de cinco avaliações por tempo de incubação para cada tratamento. Os resíduos de incubação foram avaliados quanto ao teor de FDN e interpretados por intermédio de modelo não-linear logístico. A suplementação isolada com amido ou pectina reduziu em 9,9 e 8,4% a taxa de degradação da FDN potencialmente degradável (FDNpd). Efeitos similares foram verificados com a suplementação exclusivamente proteica, com redução de 19,1% sobre a taxa de degradação da FDNpd. A suplementação conjunta com proteína e carboidratos promove redução dos efeitos deletérios da suplementação isolada com esses compostos.

Palavras-chave: capim-elefante, degradação ruminal, modelos matemáticos, suplementos

In vitro degradation of neutral detergent fiber from high-quality tropical forage according to supplementation with protein and (or) carbohydrates

ABSTRACT - The objective was to evaluate the effect of protein and (or) carbohydrate supplementation on the rumen degradation of neutral detergent fiber (NDF) from high-quality tropical forage. The experiment simulated the supplementation of finishing cattle under grazing during the rainy season (70:30 forage to concentrate ratio, as dry matter basis). Samples of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) cut after 21 days regrowth were used as basal forage. The concentrate used was formulated to contain 30% crude protein, using starch as the energetic source and casein as the protein source. The treatments were established by omission of the protein and/or energy source and replacement of starch by pectin. Thus, six treatments were evaluated: 1. Forage, 2. Forage plus Starch, 3. Forage plus Pectin, 4. Forage plus Casein, 5. Forage plus Casein plus Starch and 6. Forage plus Casein plus Pectin. The treatments were evaluated under rumen environment, simulated by *in vitro* incubation, where the experimental diets were submitted to different incubation periods: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 hours. The incubation procedure was repeated five times so that five evaluations within each incubation time were made for each treatment. The incubation residues were evaluated according to their NDF contents and interpreted using a non-linear logistic model. It was observed that the exclusive supplementation with starch or pectin depressed 9.9 and 8.4% the degradation rate of potentially degradable NDF. A similar effect was observed with exclusive supplementation with protein, where a decrease of 19.1% on the degradation rate of potentially degradable NDF was observed. As carbohydrates and protein were supplemented together, a decrease in negative effect on NDF degradation was observed.

Key Words: elephant grass, mathematical models, rumen degradation, supplements

Introdução

No período das chuvas, embora as forragens tropicais sob pastejo possuam teor adequado de proteína bruta (PB), os ganhos de peso obtido estão aquém do observado sob condições similares em regiões temperadas. Essa discrepância pode ser, em parte, atribuída à alta degradabilidade da PB da forragem, que provoca perda excessiva de compostos nitrogenados no ambiente ruminal na forma de amônia, gerando déficit proteico em relação às exigências para ganhos elevados (Poppi & McLennan, 1995).

Assim, embora durante o período de chuvas as principais deficiências nutricionais do pasto estejam relacionadas à proteína, a melhoria da qualidade da forragem altera o perfil nutricional dessas deficiências, passando de dietéticas durante o período da seca para metabólicas durante o período de chuvas (Detmann et al., 2005). As principais limitações para o crescimento microbiano residiriam no fato de a forragem disponível ao pastejo permitir baixa assimilação do nitrogênio disponível em proteína no rúmen, em decorrência da alta degradabilidade dos compostos nitrogenados ou da baixa velocidade de degradação dos carboidratos fibrosos da forragem (Detmann et al., 2005).

Nesse contexto, aumentos no desempenho animal seriam obtidos pelo fornecimento de fontes proteicas não-degradáveis no rúmen, que ampliariam diretamente o suprimento de proteína metabolizável ao animal (Poppi & McLennan, 1995), ou de fontes energéticas de rápida disponibilidade no rúmen, as quais ampliariam a assimilação do nitrogênio oriundo dos compostos nitrogenados de alta degradabilidade da forragem (Poppi & McLennan, 1995; Detmann et al., 2005).

Por outro lado, em virtude dos elevados níveis de compostos nitrogenados não-proteicos em gramíneas tropicais sob pastejo durante o período favorável a seu crescimento, respostas positivas poderiam ser obtidas com a suplementação com fontes de proteína verdadeira degradáveis, as quais favoreceriam interações positivas entre espécies microbianas no ambiente ruminal (Detmann et al., 2005).

A elevada proporção de compostos nitrogenados insolúveis em detergente neutro em relação à PB total em gramíneas tropicais (Paulino et al., 2002), os quais são considerados de lenta e incompleta degradação (Sniffen et al., 1992), pode implicar carência de compostos nitrogenados aos microrganismos ruminais para máxima produção de proteína microbiana e para ganhos de peso adequados dos animais.

Assim, seriam obtidas respostas positivas sobre o crescimento microbiano no rúmen, sobre a utilização dos

carboidratos fibrosos da forragem basal e sobre o desempenho animal durante o período das chuvas, a partir da suplementação energética ou proteica.

Desta forma, é importante a investigação dos efeitos de fontes proteicas e energéticas suplementares sobre a dinâmica ruminal dos carboidratos fibrosos da forragem, o que permitiria delinear com maior exatidão estratégias de suplementação para a otimização do uso dos substratos energéticos basais, de menor custo.

Assim, objetivou-se avaliar a dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) de forragem de alta qualidade mediante a suplementação com proteína e/ou diferentes fontes de carboidratos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (DZO-UFV), Viçosa, Minas Gerais.

A forragem utilizada nos procedimentos de avaliação *in vitro* foi proveniente de amostras de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com 21 dias de rebrotação. A forragem foi cultivada nas dependências do Laboratório de Animais do DZO-UFV, Viçosa, Minas Gerais, entre os meses de outubro e novembro de 2005 (período das águas). A coleta da forragem foi feita por meio de corte rente ao solo.

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

Procedeu-se, ainda, à quantificação do total de compostos nitrogenados não-proteicos na forragem, segundo método do ácido tricloroacético (Licitra et al., 1996).

O tratamento considerado como referência na implementação dos demais foi construído de forma a simular situação de suplementação para bovinos em terminação sob pastejo durante o período das águas (70% de forragem

Tabela 1 - Composição química da forragem e dos componentes dos suplementos

Item	Forragem	Componente		
		Amido	Pectina	Caseína
Matéria seca (g/kg de matéria natural)	111,9	880,5	854,4	901,3
Matéria orgânica (g/kg de MS)	804,0	989,1	967,4	978,7
Proteína bruta (g/kg de MS)	193,0	0,0	36,8	878,9
Nitrogênio não-proteico (g/kg de PB)	222,6	-	-	-
Extrato etéreo (g/kg de MS)	24,8	1,2	3,7	5,6
Carboidratos totais (g/kg de MS)	586,2	987,9	926,9	94,2
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	652,6	-	-	-
FDNcp (g/kg de MS)	518,3	-	-	-
PIDN (g/kg de PB)	426,5	-	-	-
Carboidratos não-fibrosos	67,9	987,9	926,9	94,2
Fibra em detergente ácido (g/kg de MS)	353,6	-	-	-
FDACP (g/kg de MS)	298,1	-	-	-
PIDA (g/kg de PB)	108,9	-	-	-
Lignina (g/kg de MS)	43,2	-	-	-

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

e 30% de concentrado, com base na matéria seca), segundo valores observados em experimentos similares *in vivo* (Kabeya et al., 2002; Detmann et al., 2005).

O concentrado referente ao tratamento referência foi formulado de forma a apresentar 30% de PB, utilizando-se amido como componente energético e caseína como componente proteico. Todos os componentes utilizados nos procedimentos de incubação foram avaliados de forma similar aos métodos utilizados para as amostras de forragem (Tabela 1).

As demais combinações foram construídas pelo não-fornecimento da fonte proteica e/ou energética do suplemento e pela substituição total do amido suplementar por pectina. Desta forma, foram avaliados seis tratamentos: 1. forragem; 2. forragem + amido; 3. forragem + pectina; 4. forragem + caseína; 5. forragem + caseína + amido (tratamento referência); e 6. forragem + caseína + pectina.

A escolha dos componentes utilizados na constituição dos suplementos foi feita com base na pureza da fonte proteica ou energética e na ausência de FDN, o que permitiu avaliar de forma exclusiva a degradação da fração fibrosa insolúvel da forragem. As seguintes fontes foram utilizadas: caseína oriunda do leite bovino (pó purificado; Sigma C-5890); pectina cítrica (Sigma P-9135); e amido solúvel (PA, ACS, F. Maia S/A).

Alíquotas de forragem (245 mg de MS) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Em seguida, adicionou-se a fonte proteica e/ou energética segundo a estrutura dos tratamentos anteriormente descritos, perfazendo o total de 350 mg de MS por frasco para os tratamentos que envolveram suplementação energética e proteica simultaneamente (Tabela 2).

Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução tampão de McDougall (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 por meio de aspersão com CO₂. Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C) para prévia hidratação das amostras.

Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de um bovino doador, fistulado no rúmen, mantido nas proximidades da sala de incubação. O animal foi alimentado com capim-elefante fornecido à vontade e suplementado com 1 kg/dia de farelo de soja, sem jejum prévio. A alimentação-base do animal doador, em conjunto da ausência do período de jejum, visou à obtenção de inóculo ruminal com características similares ao de animais mantidos em pastos tropicais durante o período das águas, sem suplementação. O animal teve disponibilidade irrestrita de água e mistura mineral completa (6% de fósforo).

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

Foram adicionados 7 mL de inóculo ruminal por frasco, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de incubação com CO₂ e à vedação dos frascos. A relação final, para os tratamentos com a adição de suplementos proteico (caseína) e energético, foi de 100 mg de MS/10 mL de solução final e 1 mL de inóculo ruminal/4 mL de solução tampão (Tilley & Terry, 1963). Os frascos foram mantidos a 39°C sob agitação orbital (40 rpm). Procedeu-se à retirada dos gases oriundos da fermentação a cada 3 horas com auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. O procedimento de incubação

Tabela 2 - Descrição dos componentes adicionados ao sistema *in vitro* em cada tratamento

Componente	Tratamento					
	Forragem	Forragem + amido	Forragem + pectina	Forragem + caseína	Forragem + caseína + amido	Forragem + caseína + pectina
Forragem (mg)	245	245	245	245	245	245
Amido (mg)	-	65	-	-	65	-
Pectina (mg)	-	-	65	-	-	65
Caseína (mg)	-	-	-	40	40	40
Inóculo ruminal (mL) ¹	7	7	7	7	7	7
Tampão de McDougall (mL)	28	28	28	28	28	28

¹ O inóculo ruminal apresentou teor médio de 8,56 mg de nitrogênio amoniacal/dL.

foi repetido cinco vezes, perfazendo o total de cinco avaliações por tempo de incubação para cada tratamento.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidos à mensuração do pH com potenciômetro digital; e o conteúdo foi filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes (porosidade grossa). Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais adicionaram-se 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Depois de vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora; equivalente a aproximadamente 0,5 kgf/cm²), de forma a se extraírem todos os componentes solúveis em detergente neutro (método de microextração; Pell & Schofield, 1993). Após este tratamento, procedeu-se novamente à filtração sob vácuo e lavagem sequencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não-ventilada (105°C/16 horas).

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

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

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

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

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

em que: λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h⁻¹).

Para todos os tratamentos avaliados, foi necessária a reparametrização da Equação (1), empregando-se desta forma apenas a Equação (2) na descrição dos perfis de degradação.

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

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

em que: c' = taxa fracional de degradação da FDNpd (h⁻¹) para os casos em que o modelo reparametrizado foi utilizado (Equação 2).

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

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

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

Os valores de t_i foram obtidos segundo descrições de Van Milgen et al. (1991):

$$t_i = \frac{1}{\lambda} \quad (5);$$

A taxa específica de crescimento microbiano sobre a fração potencialmente degradável da FDN foi estimada segundo proposições de Beuvinck & Kogut (1993):

$$Sgr = \frac{R'(t_i)}{U} \quad (6);$$

em que: Sgr = taxa específica de crescimento microbiano (h⁻¹).

A partir das estimativas de S_{gr} , obtiveram-se as eficiências de crescimento microbiano, segundo proposições de Pirt (1965):

$$\frac{1}{Y} = \frac{m}{S_{gr}} + \frac{1}{Y_m} \quad (7);$$

em que: Y = eficiência microbiana (g células $\times g^{-1}$ carboidrato degradado); m = exigência de manutenção das bactérias (g carboidrato $\times g^{-1}$ célula $\times h^{-1}$); e Y_m = eficiência teórica máxima dos microrganismos sobre o substrato (g células $\times g^{-1}$ carboidratos).

Adotou-se como referência ao parâmetro Y_m o valor de $0,4 g$ célula $\times g^{-1}$ carboidrato degradado e para m o valor de $0,05 g$ carboidrato $\times g^{-1}$ célula $\times h^{-1}$, conforme especificações de Russell et al. (1992).

As estimativas de S_{gr} foram obtidas com base nos valores médios gerais das frações U ($86,99 \pm 4,26\%$) e I ($11,30 \pm 4,15\%$), sob o pressuposto de serem características únicas e exclusivas do substrato (forragem) (Ørskov, 2000).

Os modelos ajustados para os perfis de degradação nos tratamentos foram comparados de forma descritiva, enquanto os valores de pH obtidos para os tempos de incubação foram avaliados segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando cada partida de incubação como bloco, em esquema fatorial $2 \times 3 \times 10$ (com ou sem proteína; três fontes de carboidratos; e dez tempos de incubação). Todos os procedimentos estatísticos, tanto os lineares, como os não-lineares, foram conduzidos por meio do programa SAS (*Statistical Analysis System*), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

Resultados e Discussão

A suplementação exclusiva com carboidratos produziu efeito inibitório sobre a taxa de degradação da FDNpd em comparação ao tratamento basal (forragem), provocando reduções de 9,9% para a suplementação com amido e 8,4% para aquela com pectina (Tabela 3). Esse comportamento refletiu negativamente no crescimento microbiano sobre a FDNpd (Tabela 4).

Independentemente do tratamento avaliado, as variações na latência discreta foram consideradas de pequena magnitude (Tabela 3) e, portanto, não serão abordadas na discussão.

A redução na degradação ruminal da fibra decorrente da suplementação com carboidratos não-fibrosos (CNF) pode ser atribuída a dois efeitos distintos, denominados efeito pH e efeito concentrado ou efeito carboidrato (Mould et al., 1983; Arroquy et al., 2005). No primeiro caso, reduções significativas no pH ruminal são responsáveis pela inibição parcial da degradação fibrosa por comprometerem a condição ideal de meio para crescimento dos microrganismos fibrolíticos (Mould et al., 1983; Hoover, 1986; Van Soest, 1994).

A investigação do pH do meio não permitiu identificar efeitos de interação entre quaisquer fatores estudados ($P > 0,05$). Contudo, foram verificados efeitos independentes para a suplementação com carboidratos e para o tempo de incubação ($P < 0,05$).

A adição de carboidratos ocasionou redução no pH médio ($P < 0,05$) (Tabela 5). Contudo, nenhuma das fontes de carboidratos propiciou valores médios de pH considerados

Tabela 3 - Estimativas da taxa fracional comum para latência e degradação (λ), taxa fracional de degradação da FDNpd obtida a partir da conversão do parâmetro λ (c'), valor relativo da taxa de degradação (VRTD) e tempo de latência discreta (L) para a degradação ruminal da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (FDNpd) e desvios-padrão assintóticos (DPA) para os perfis de degradação ajustados em função da suplementação proteica e/ou com carboidratos

Parâmetro	Fonte de carboidrato		
	Sem carboidrato	Amido	Pectina
	Sem proteína		
λ (h^{-1})	0,1640 \pm 0,0084	0,1478 \pm 0,0080	0,1503 \pm 0,0126
c' (h^{-1}) ¹	0,0978	0,0881	0,0896
VRTD (%) ²	100,0	90,1	91,6
L (h^{-1})	1,72	1,91	1,87
DPA	5,76	6,66	8,86
	Caseína		
λ (h^{-1})	0,1327 \pm 0,0085	0,1622 \pm 0,0150	0,1487 \pm 0,0105
c' (h^{-1}) ¹	0,0791	0,0967	0,0886
VRTD (%) ²	80,9	98,9	90,6
L	2,12	1,74	1,90
DPA	6,74	9,19	8,30

¹ Estimado segundo propriedades da distribuição Gama-2: $c' = 0,59635\lambda$.

² Estimado em relação ao tratamento basal (sem suplementação).

Tabela 4 - Máxima taxa de degradação ($\mu - h^{-1}$), taxa de crescimento específico de microrganismos ($Sgr - h^{-1}$) e eficiência de crescimento microbiano a FDN potencialmente degradável da forragem (EFM - g MS microbiana/kg de carboidrato degradado no rúmen) em função da suplementação proteica e/ou com carboidratos

Fonte proteica	Fonte de Carboidrato ¹		
	Sem carboidrato	Amido	Pectina
	μ		
Sem proteína	5,2483 (100,0)	4,7299 (90,1)	4,8099 (91,6)
Caseína	4,2466 (80,9)	5,1907 (98,9)	4,7587 (90,7)
	Sgr		
Sem proteína	0,0603 (100,0)	0,0544 (90,2)	0,0553 (91,7)
Caseína	0,0488 (80,9)	0,0597 (99,0)	0,0547 (90,7)
	EFM		
Sem proteína	300,4 (100,0)	292,5 (97,4)	293,8 (97,8)
Caseína	283,7 (94,4)	299,6 (99,7)	292,9 (97,5)

¹ Os valores entre parênteses referem-se ao percentual em relação ao tratamento controle (sem suplementação).

danosos à atividade microbiana sobre os carboidratos fibrosos da forragem (Mould et al., 1983; Hoover, 1986). Dessa forma, o efeito carboidrato parece ter predominado sobre a utilização da FDNpd. De forma complementar, os valores médios de pH apresentaram comportamento quadrático de acordo com o tempo, com ponto de mínimo em 34,9 horas (Figura 1).

Efeitos deletérios sobre a utilização da FDNpd com a suplementação com compostos amiláceos (Tabela 3) foram observados por diversos autores (El-Shazly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; Piwonka & Firkins, 1993; Haddad & Grant, 2000; Arroquy et al., 2005) e recentemente relatados em condições de forragem tropical de baixa qualidade (Costa et al., 2008).

O efeito carboidrato verificado com a adição de amido parece envolver a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas, resultando em maior proliferação dos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961; Coelho da Silva & Leão, 1979; Mould et al., 1983). Essa competição conduziria à preferência inicial pela utilização do amido como substrato energético no ambiente ruminal como um todo (El-Shazly et al., 1961), com a transformação gradativa dos carboidratos fibrosos em substratos energéticos predominantes à medida que se reduz a disponibilidade de amido (El-Shazly et al., 1961; Mertens & Loften, 1980; Arroquy et al., 2005), podendo envolver, concomitantemente, mecanismos de regulação catabólica (Russell & Baldwin, 1978).

Por outro lado, alguns autores têm observado inibição da atividade de enzimas fibrolíticas na presença de amido no meio (Hiltner & Dehority, 1983, citados por Arroquy et al., 2005; Piwonka & Firkins, 1993), fato que parece estar associado a liberação de compostos inibidores pelos microrganismos

Tabela 5 - Médias de quadrados mínimos para o pH do meio mediante a suplementação proteica e com carboidratos

Suplementação com carboidratos	pH ¹
Sem carboidrato	7,00a
Amido	6,95b
Pectina	6,95b
Suplementação proteica	
Sem proteína	6,95a
Caseína	6,95a

¹ Médias na coluna, dentro de fontes proteicas ou de carboidratos, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey-Kramer ($P < 0,05$).

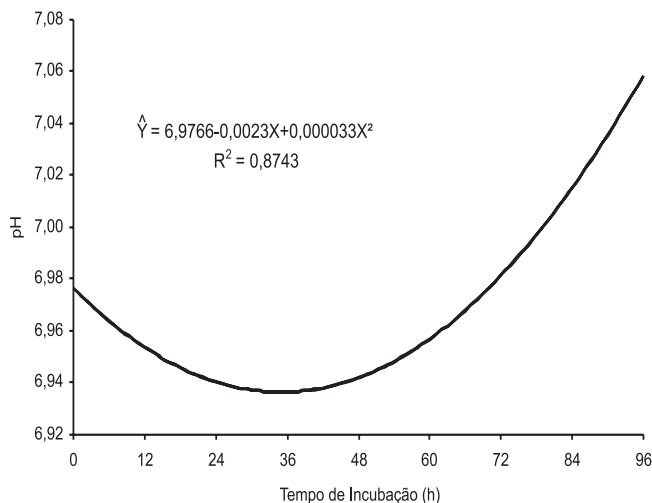


Figura 1 - Estimativa para a relação entre o pH do meio e o tempo de incubação.

que degradam o amido (El-Shazly et al., 1961), os quais parecem ser de natureza proteica (bacteriocinas) (Piwonka & Firkins, 1993; Kalmokoff et al., 1996). A união destes argumentos implicaria redução na degradação da FDNpd na presença de amido como suplemento exclusivo, como verificado neste trabalho (Tabelas 3 e 4).

Os resultados obtidos com a suplementação exclusiva com pectina corroboram os relatos de Arroquy et al. (2005) de que outras formas de carboidratos solúveis em detergente neutro agiriam similarmente ao amido sobre a degradação fibrosa no rúmen (Tabela 3). Contudo, Costa et al. (2008) verificaram, avaliando forragem tropical de baixa qualidade, que a suplementação com pectina não comprometeu a degradação da FDNpd, ao passo que efeitos deletérios foram verificados com a suplementação com amido. Segundo esses autores, a pectina, embora seja um CNF do ponto de vista analítico geral, constitui polissacarídeo não-amiláceo (fibra solúvel) e apresenta processo de degradação microbiana predominantemente acético, similar, embora mais rápido, aos padrões de fermentação da celulose e hemicelulose (Van Soest, 1994), o que incorreria ausência de efeitos deletérios sobre a utilização da FDNpd.

Esse comportamento aparentemente contraditório talvez seja explicado pelas características de síntese de compostos microbianos. Os microrganismos responsáveis pela degradação de compostos estruturais, tanto solúveis (ex: pectina) como insolúveis (ex: hemicelulose), crescem utilizando amônia como substrato preferencial para síntese de compostos nitrogenados (Russell, 2002). Desta forma, a adição de pectina ao meio poderia incorrer em maior competição por amônia, acarretando redução na taxa de crescimento microbiano sobre a FDNpd, o que justifica os resultados obtidos (Tabelas 3 e 4). Assim, como o processo de degradação da pectina ocorre de forma mais rápida que para os compostos fibrosos insolúveis (Russell et al., 1992; Van Soest, 1994), haveria maior e mais rápida captura de amônia para degradação da pectina, retardando o processo de degradação da FDNpd.

É possível que esse mesmo comportamento ocorra em condições de forragem de baixa qualidade. Contudo, em razão da deficiência severa de compostos nitrogenados (Costa et al., 2008), os efeitos da competição talvez não sejam quantitativamente relevantes ao processo global de ação microbiana, o que justifica a divergência entre os resultados desta pesquisa (Tabelas 3 e 4) e aqueles obtidos por Costa et al. (2008).

Por outro lado, a suplementação exclusivamente proteica, à semelhança da suplementação com carboidratos, gerou efeitos deletérios sobre a utilização da FDNpd (Tabela 3). Verificou-se redução de 19,1% sobre a taxa de

degradação da FDNpd com a suplementação exclusiva com caseína em comparação ao tratamento basal (forragem).

Efeitos inibitórios da proteína sobre a degradação ruminal de carboidratos têm sido relatados. Cone & Van Gelder (1999) verificaram redução na taxa de produção de gases por unidade de matéria orgânica *in vitro* à medida que caseína foi adicionada ao meio. Em estudo similar *in vitro*, Oliveira et al. (2005) observaram redução proporcional à adição de caseína ao meio sobre a taxa de produção de gases a partir de celulose. Em adição, Paez-Bernal (2007) verificou que a adição isolada de caseína ao meio de incubação reduziu em 13,6% a taxa de degradação da FDNpd de *Brachiaria decumbens*.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a adição de caseína não implicou alterações deletérias à atividade fibrolítica via alterações no pH do meio (Tabela 5). O efeito negativo da caseína sobre a degradação da FDNpd (Tabela 3), o qual poderia ser denominado “efeito proteína”, pode ser atribuído ao excesso de competição por substratos essenciais devido ao estímulo ao crescimento de microrganismos proteolíticos e/ou a interações amensais, ou seja, à inibição do crescimento de uma ou mais espécies microbianas, em decorrência da produção de compostos inibidores por outras espécies (Paez-Bernal, 2007). Além disso, a eficiência de crescimento microbiano sobre a FDNpd reduziu 5,6% com a adição de caseína ao meio (Tabela 4).

As bacteriocinas podem ser definidas como produtos primários ou modificados de liberação extracelular oriundos da síntese ribossomal, os quais apresentam estreito espectro de atividade bactericida, caracterizada pelo fato de o microrganismo produtor apresentar algum mecanismo de autoproteção (Parente & Ricciardi, 1999). Segundo Wolin et al. (1997), a ação de bacteriocinas pode implicar redução da atividade celulolítica no rúmen

Resultados obtidos *in vitro* indicam que a ampliação no fornecimento de aminoácidos aumenta a produção de bacteriocinas (De Vuyst & Vandamme, 1993; Kim et al., 1997; Parente & Ricciardi, 1999; Aasen et al., 2000; Mantovani & Russell, 2003).

Conforme os resultados obtidos (Tabelas 3 e 4), a suplementação conjunta com caseína e amido ou pectina permitiu a manutenção da degradação da FDNpd em patamares superiores aos observados com a suplementação exclusivamente proteica, embora ainda inferiores ao observado no tratamento basal. Os efeitos da suplementação conjunta, para ambos os carboidratos, não se mostraram aditivos entre si, ou seja, foram inferiores à soma dos efeitos observados na suplementação isolada com caseína ou carboidratos.

Esse comportamento parece refletir esquema de regulação cruzada dos efeitos deletérios entre caseína e carboidratos. A produção de bacteriocinas no meio de fermentação é reduzida com a ampliação da disponibilidade de glicose (Aasen et al., 2000), o que indica a possibilidade de haver mecanismo de regulação catabólica por meio da elevação na disponibilidade de carboidratos no meio (Mantovani & Russell, 2003). Por outro lado, a possível elevação na disponibilidade de nitrogênio amoniacal no meio propiciada pela suplementação com caseína pode indicar redução do efeito carboidrato, no sentido de se reduzirem as competições por substratos essenciais entre espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas.

Resultados similares aos obtidos nesta pesquisa foram descritos por Paez-Bernal (2007), que verificou regulação cruzada entre os efeitos carboidrato e proteína ao avaliar a dinâmica de degradação da FDN de capim-braquiária em estudo *in vitro*. De modo geral, os resultados (Tabelas 3 e 4) permitem suportar a afirmativa de Paulino et al. (2006) de que o conceito de otimização do uso de forragens de alta qualidade sob pastejo com suplementação envolve, não estímulos, mas sim a prevenção de efeitos deletérios sobre a utilização da FDNpd.

Conclusões

A suplementação, nos casos de alimentação com forragem de alta qualidade, de forma exclusiva com caseína (proteína verdadeira) ou carboidratos (amido ou pectina) pode ter efeitos deletérios na degradação dos carboidratos fibrosos da forragem. A suplementação conjunta com proteína e carboidratos permite a redução dos efeitos deletérios em comparação à suplementação isolada com esses compostos.

Literatura Citada

- AASEN, I.M.; MØRETRO, T.; KATLA, T. et al. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.159-166, 2000.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN R.C.; NAGARAJA, T.G. et al. Effect of types of non-fiber carbohydrate on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.93-106, 2005.
- BEUVINK, J.M.W.; KOGUT, J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated ruminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1041-1046, 1993.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocetes, 1979. 380p.
- CONE, J.W.; Van GELDER, A.H. Influence of protein fermentation on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.251-264, 1999.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.494-503, 2008.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1380-1391, 2005.
- De VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* batch fermentations using complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.17-22, 1993.
- ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; HILL, T.M. et al. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.682-756.
- EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B.A.; JOHNSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.20, p.268-273, 1961.
- HADDAD, S.G.; GRANT, R.J. Influence of nonfiber carbohydrate concentration on forage fiber digestion *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.107-115, 2000.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Animal Science**, v.63, p.40-44, 1986.
- KABEYA, K.S.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E. et al. Suplementação de novilhos mestiços em pastejo na época de transição água-seca: desempenho produtivo, características físicas de carcaça, consumo e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.213-222, 2002.
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? **Journal of Animal Science**, v.79, p.2297-2306, 1996.
- KIM, W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.449-453, 1997.
- LICITRA, G.; HERNANDES, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MANTOVANI, H.C.; RUSSELL, J.B. Factors affecting the antibacterial activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* HC5. **Current Microbiology**, v.46, p.18-23, 2003.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R.; MANNS, O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-30, 1983.
- OLIVEIRA, A.L.F.; CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Efeito da fermentação de proteínas na cinética de produção de gases *in vitro*. In: ZOOTEC'2005, 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABZ, 2005. (CD-ROM).
- ØRSKOV, E.R. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. et al. (Eds.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.175-188.
- PAEZ-BERNAL, D.M. **Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de**

- suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.628-638, 1999.
- PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K. et al. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., 2002, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002, p.153-196, 2002.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Suplementação animal em pasto: energética ou proteica? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3., 2006, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p.359-392.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- PIRT, S.J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society, Series B**, n.163, p.224-231, 1965.
- PIWONKA, E.J.; FIRKINS, J.L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2196-2206, 1993.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, 2002. 119p.
- RUSSELL, J.B.; BALDWIN, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.319-329, 1978.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.
- SNIFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2515-2529, 1991.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. The influence of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.
- WOLIN, M.J.; MILLER, T.L.; STEWARD, C.S. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P.N; STEWARD, C.S (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1997. p.467-491.