

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* POR DE RAÇÕES COM NÍVEIS
CRESCENTES DE CONCENTRADO**

Autor: Rodrigo Pacheco
Orientador Prof.Pós-Dr: Luiz Juliano Valério Geron

“Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Zootecnia, apresentado ao Departamento de Zootecnia da Universidade do Estado de Mato Grosso Campus Universitário de Pontes e Lacerda, como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM ZOOTECNIA.”

PONTES E LACERDA
JULHO/2012

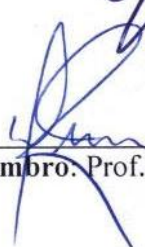
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE RAÇÕES COM
NÍVEIS CRESCENTES DE CONCENTRADO**

Autor: Rodrigo Pacheco



Orientador: Prof. Dr. Luiz Juliano Valério Geron



Membro: Prof. Deivison Novaes Rodrigues



Membro: Prof. Thiago Ouverney Leite

PONTES E LACERDA
JUNHO/2012

À Lazaro Gomes Pacheco (pai) que é meu alicerce,
À Edith Simão Lino (mãe), pois sem ela não teria chegado até aqui,
À Nubia Cristina Pacheco (irmã) que dê de sempre me apoio e me deu forças para
chegar até aqui.

Dedico-lhes com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é quem me dá forças diante das dificuldades e quando me sinto fraco me fortalece.

A Edith e Lazaro que são meu exemplo, minha inspiração, minha mãe e meu pai, que tem o dom de me animar, de me colocar pra cima, quando sinto vontade de desistir de tudo, com poucas palavras me acalma e me faz sentir muito mais forte. Obrigada pelo amor incondicional.

A minha irmã Nubia, pois sempre quando preciso, ela não mede esforços para me ajudar, é a melhor irmã que alguém poderia ter.

À Universidade do estado de Mato Grosso, por possibilitar minha formação acadêmica, por me abrir portas e me fazer ver o mundo de maneira mais ampla.

Ao Prof. Luiz Juliano Valério Geron por ter participado da minha formação acadêmica, orientar e auxiliar no desenvolvimento do meu conhecimento científico e profissional, pela confiança em mim depositada e pela paciência durante o período de convívio e por ser além de meu orientador, meu amigo.

Aos membros da banca examinadora, Deivison Novaes Rodrigues e Thiago Ouverney Leite.

Ao Departamento de Zootecnia e funcionários, pela contribuição para minha formação e para os ensinamentos adquiridos ao decorrer do curso.

A todos os professores do curso de Zootecnia, pela colaboração no desenvolvimento do meu conhecimento teórico e prático, pois graças a ajuda de cada um, sairei desta universidade (UNEMAT) uma pessoa muito melhor, por me ensinar a importância do trabalho em equipe e pela contribuição para a conclusão desse trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus colegas e amigos, pelo carinho.

*Mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que meus caminhos sejam
errados, mesmo que meu jeito de levar a vida incomode muita gente, eu sei quem sou e sei
pelo que devo lutar.
Se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha fé.
Pois tendo amor e saúde da vida eu não reclamo.
Eu amo a vida que levo e levo a vida que amo.*

(Tião Carreiro)

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial digestivo da matéria seca (MS) de rações com níveis crescentes de concentrado, (0,0%; 20,0%; 40,0%; 60,0% 80,0% na MS) pelo método *in vitro*. Atualmente, existe varias técnicas laboratoriais para a avaliação de digestibilidade de alimentos destinado para os ruminantes, sendo utilizadas principalmente para estimar o seu valor nutritivo, dentre essas a técnica *in vitro* se destaca por ser uma técnica simples, de baixo custo e que nos da uma certa confiabilidade. O experimento foi realizado no *Campus* Universitário de Pontes e Lacerda, no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LAANA) e no (setor de Metabolismo Animal) pertencentes à Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT. Foram utilizados fontes de alimentos diferentes para a confecção do concentrado , como o Grão de milho (GM), farelo de soja (FS) e silagem de milho (SM). Foram utilizados no experimento dois cordeiros sem raça definida (SRD), inteiros, mantidos em gaiola de metabolismo, com peso corporal médio de 22,50, sendo destes, realizada as coletas de líquido ruminal por meio de sonda esofágica. A inclusão de níveis crescentes de concentrado nas rações experimentais não alterou ($P>0,05$) a DIV da MS. A ausência de diferença significativa para a DIV da MS pode ter sido influenciada pelo elevado valor do coeficiente de variação. Os diferentes níveis de concentrado nas rações experimentais não influenciaram ($P>0,05$) o valor de pH do líquido ruminal após as 24 horas de fermentação. A inclusão de níveis crescentes de concentrado nas rações experimentais alterou de maneira quadrática ($P<0,05$) a concentração do $N-NH_3$ do líquido ruminal após 24 horas de fermentação ($Y= 3,41375+0,018054X-0,0001753X^2$). O valor de máxima concentração de $N-NH_3$ do líquido ruminal após as 24 horas de fermentação ficou abaixo da concentração de 5,0 mg/100 mL estabelecida pela literatura para não limitar o crescimento microbiano. A digestibilidade *in vitro* da MS não é alterada com a utilização de rações com diferentes níveis de concentrado.

Palavras chave: enzimas, microrganismos, produção e ruminação.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the potential digestion of dry matter (DM) of diets with increasing levels of concentrate (0.0%, 20.0%, 40.0%, 60.0% 80.0% DM) by the in vitro. Currently, there are several laboratory techniques for the evaluation of digestibility of feed intended for ruminants, being used primarily to estimate their nutritional value, among them the in vitro technique stands out as a simple, low cost, and that gives us a some reliability. The experiment was conducted at the University Campus of Pontes e Lacerda, Laboratory of Food Analysis and Nutrition (LAANA) and (industry Metabolism Animal) belonging to the University of Mato Grosso - UNEMAT. We used different sources of food for the manufacture of the concentrate such as grain maize (GM) soybean meal (SBM) and corn silage (MS). Were used in experiment two sheep breed (SRD), whole, kept in a metabolism cage, with average body weight of 22.50, and these held the collection of rumen fluid by gavage. The inclusion of increasing levels of concentrate in the experimental diets affected ($P > 0.05$) DIV of DM. The lack of significant difference for the DIV of DM may have been influenced by the high coefficient of variation. The different levels of concentrate in the diet did not affect ($P > 0.05$) the pH of the rumen fluid after 24 hours of fermentation. The inclusion of increasing levels of concentrate in the experimental diets altered so quadratic ($P < 0.05$) the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ in ruminal fluid after 24 hours of fermentation ($Y = 3.41375 + 0.018054 X - 0.0001753X^2$). The maximum value of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in the ruminal fluid 24 hours after fermentation was below the concentration of 5.0 mg/100 ml established in the literature not to limit microbial growth. The in vitro digestibility of DM is not changed with the use of diets with different concentrate levels.

Key words: enzymes, microorganisms, production and rumination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estomago dos ruminantes com seus quatros compartimentos.....	14
Figura 2: Kitasato instalado na bomba de sucção e mantido em recipiente contendo água morna (A); Lubrificação utilizando óleo mineral, antes de iniciar as atividades de coleta do líquido ruminal (B)	30
Figura 3: Comportamento da digestibilidade <i>in vitro</i> da MS para as rações experimentais contendo diferentes níveis de concentrado (0,0%; 20,0%; 40,0%; 60,0%; 80,0% na MS).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nichos trópicos e principais produtos de espécies bacterianas	16
Tabela 2- Características morfológicas dos gêneros de fungos anaeróbicos. Os gêneros se referem a organismos classificados com divisão <i>Eumycotina</i> subdivisão <i>Mastigomycotina</i> Classe <i>Chytriumycetes</i> ordem <i>Neocallimasticales</i> e família <i>Neocallimastigaceae</i> .. As descrições se referem às características morfológicas mais frequentemente observadas.	20
Tabela 3- Fungos presentes no sistema ruminal dos animais e seus respectivos hospedeiros.	20
Tabela 4- Efeitos benéficos e adversos da presença de protozoários no rumen.	21
Tabela 5- Composição bromatológica dos alimentos utilizados na ração basal utilizada na alimentação dos cordeiros doadores de inóculo para a digestão <i>in vitro</i>	27
Tabela 6- Composição bromatológica dos alimentos utilizados na formulação das diferentes rações com níveis crescentes de concentrado avaliadas no processo de digestão <i>in vitro</i> da matéria seca.	28
Tabela 7- Composição percentual (%) e bromatológica da ração basal utilizada na alimentação dos cordeiros doadores de inóculo para a digestão <i>in vitro</i>	28
Tabela 8- Composição percentual e bromatológica das rações experimentais na digestão <i>in vitro</i>	29
Tabela 9- Composição química da mistura mineral fornecida aos cordeiros utilizados no experimento.	30
Tabela 10- Valores de digestibilidade <i>in vitro</i> (DIV) da matéria seca (MS) das diferentes rações contendo níveis crescentes de concentrado, valor de pH e concentração de nitrogênio amoniacal após a fermentação de 24 horas <i>in vitro</i> para as diferentes rações experimentais. .	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 Revisão bibliográfica	13
2.1 Particularidades dos ruminantes	13
2.2 Ecossistema ruminal e suas características	14
2.2.1 Bactérias	15
2.2.1.1 Bactérias celulolíticas	17
2.2.1.2 Bactérias Amilolíticas.....	17
2.2.1.3 Bactérias Proteolíticas	18
2.2.2 Fungos	19
2.2.3 Protozoários	21
2.3 Ambiente Ruminal.....	22
2.4 Substratos da fermentação ruminal.....	23
2.5 Técnica de digestibilidade <i>in vivo</i>	24
2.5.1 Relação volumoso (V) concentrado (C) em digestão “ <i>in vivo</i> ”	24
2.6 A técnica de digestibilidade “<i>in vitro</i>”	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Composição química dos alimentos experimentais	27
3.2 Animais doadores do líquido ruminal	29
3.4 Digestibilidade <i>in vitro</i>	31
3.5 Determinação do valor de pH e concentração do nitrogênio amoniacal do líquido ruminal.	32
3.6 Análises químicas dos alimentos	32
3.7 Delineamento experimental	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Na criação de ruminantes, a alimentação é responsável pela maior parte dos custos de produção sendo muito importante conhecer a qualidade dos alimentos a serem fornecidos, seu valor nutritivo e sua composição química, visando assim explorar sua máxima capacidade digestiva, através de dietas balanceadas para suprir a necessidade dos animais (ALVES et al., 2003)

A avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos pelos animais é um desafio constante para os profissionais na área de nutrição animal (ALVES et al., 2003). De acordo com Cardoso et al. (2000), o principal objetivo é ajustar a quantidade e qualidade da dieta baseando-se nas exigências dos animais. Uma forma de se avaliar a qualidade do alimento é através da determinação de sua digestibilidade.

Segundo Alves et al. (2003), digestão pode ser definida como um processo de conversão de macromoléculas dos nutrientes em compostos mais simples, que podem ser absorvidos a partir do trato gastrintestinal, e medidas de digestibilidade servem para qualificar os alimentos quanto ao seu valor nutritivo, expressa pelo coeficiente de digestibilidade, que indica a quantidade percentual de cada nutriente do alimento que o animal tem condição de utilizar.

Atualmente, existe varias técnicas laboratoriais para a avaliação de digestibilidade de alimentos destinado para ruminantes, sendo utilizadas principalmente para estimar o seu valor nutritivo. Dentre essas podemos destacar a técnica de digestibilidade *in vitro* por ser uma técnica simples, de baixo custo e de considerável confiabilidade, sendo assim de grande importância para a nutrição animal (GOBBO, 2001).

Além das qualidades citadas, esta técnica de digestibilidade *in vitro* pode ser proposta como uma ferramenta para prever o desempenho dos ruminantes em geral, pois isso implica em uma grande importância econômica (MARCHESIN, 2010).

Os rebanhos de caprinos e ovinos, que juntos correspondem a uma população mundial de aproximadamente 1,94 bilhões de animais (GENTIL, 2010). No Brasil este rebanho é de aproximadamente 26 milhões, sendo 9 milhões de caprinos e 17 milhões de ovinos (BRASIL, 2009), dos quais grande parte são criados extensivamente em sistemas de baixa eficiência produtiva.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial digestivo da MS de rações com níveis crescentes de concentrado, (0,0%; 20,0%; 40,0%; 60,0% 80,0% na MS) pelo método *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O homem e o ruminante têm dividido uma longa história de produção desde os primórdios da civilização. Primeiro de uma forma mais simples e nômade, e agora com modernas formas de manejo principalmente no aspecto nutricional, com tudo a evolução da nutrição dos ruminantes, o interesse sobre a fisiologia do trato digestivo, em particular dos pré-estômagos, tem aumentado constantemente. Isso porque os pré-estômagos possuem estruturas próprias para a realização do processo de fermentação, permitindo ao animal o aproveitamento de plantas fibrosas (FURLAN et al., 2011).

Os ruminantes não produzem enzimas necessárias para o processo de digestão das fibras alimentares, mas permite o desenvolvimento de bactérias, protozoários, e fungos que realizam essa função. Nesse sentido, para a obtenção de uma alta eficiência produtiva na criação de ruminantes, deve se atentar para a interação entre o animal e o processo digestivo, a fim de que os custos sejam os menores possíveis (FURLAN et al., 2011).

2.1 Particularidades dos ruminantes

É denominado ruminante os animais que realizam o processo de regurgitação, remastigação e redeglutição. Estes têm um estômago constituído de pré-estômagos não secretórios (rúmen, retículo e omaso) e um compartimento secretório (abomaso). Estes pré-estômagos funcionam como uma câmara de fermentação microbiana (principalmente pela hidrólise e oxidação anaeróbica) dos alimentos ingeridos pelo animal. (LEEK, 1996).

De acordo com Furlan et al. (2011) os compartimentos, retículo, rúmen e omaso, tem funções associadas ao processo fermentativo devido as características de epitélio não glandular, sendo recoberto por epitélio mucoso, com capacidade absorviva. Considerando a característica alimentar dos ruminantes, em especial os bovinos, com ingestão de forragem, os pré-estômagos tem função de reter o alimento nesses segmentos para a ação fermentativa dos microrganismos no rúmen, os quais têm papel relevante na digestão das fibras através de fermentação anaeróbica.

Os ruminantes em geral como os bovinos, ovinos e caprinos, são animais cujo estômago possui quatro ou compartimento (Figura 1).

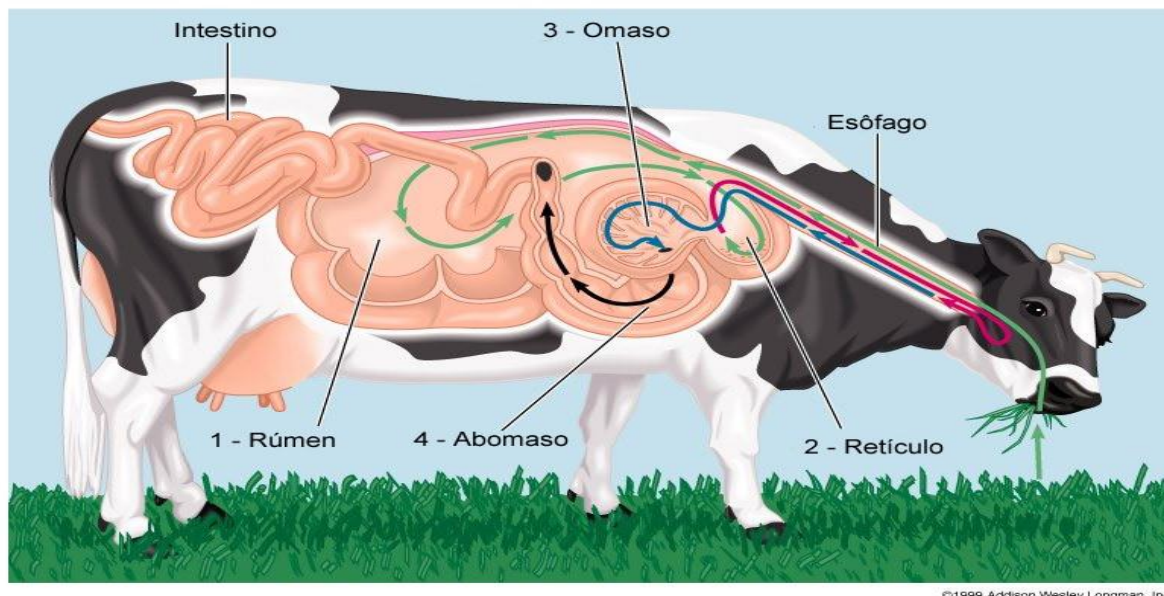


Figura 1: Os quatros compartimentos de estômago dos ruminantes

Apenas o abomaso, tem a função de digestão dos alimentos por meio de secreções glandulares (sulco gástrico e pepsinogênio), função essa equivalente ao estômago simples dos não ruminantes (DYCE et al., 2004). Assim quanto maior for o tempo de permanência da digesta (bolo alimentar) nos pré-estômagos, mais intenso será o processo de fermentação microbiana e a transformação desses nutrientes em ácidos graxos de cadeia curta, produto final da fermentação anaeróbica (FURLAN. et Al., 2011).

2.2 Ecossistema ruminal e suas características

Aproximadamente cerca de 70 a 85% da matéria seca (MS) digestível da ração é fermentada no rúmen, esse processo de fermentação ocorre a produção de ácidos graxos voláteis (AGV), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), amônia (NH_3) e células microbianas (LANA, 2007).

Para que seja realizado o processo digestivo dos alimentos nos ruminantes, há a necessidade de colonização por microrganismos na câmara de fermentação (rúmen-retículo),

sendo que estes são essenciais para a fermentação e digestão dos alimentos fibrosos, e concentrados, ingeridos pelo animal ruminante (FURLAN et al., 2011).

De maneira geral, os carboidratos fibrosos como a hemicelulose e celulose são os principais componentes das dietas dos ruminantes produzidos a pasto, estando também presentes em menores quantidades os carboidratos não fibrosos (amido, e açúcares), proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. (Zeoula et al., 2003)

Segundo Silva. (2008) os nutrientes contidos nos diferentes alimentos ingeridos pelos animais ruminantes são metabolizados pelos microrganismos residentes no rúmen, e algumas reações são sequenciais, nas quais um produto final do metabolismo de um microrganismo fornece substrato para o metabolismo de outro microrganismo. Entre os principais produtos finais da decomposição das hexoses no rúmen estão os ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico e butírico).

De maneira geral, o trato gastrintestinal dos ruminantes é colonizado por uma grande diversidade de microrganismos, sendo que no rúmen estão presentes uma das mais variadas e densas populações microbianas conhecidas na natureza. Os microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação podem ser divididos em três grupos: as bactérias, os fungos e os protozoários (FURLAN et al., 2011).

2.2.1 Bactérias

As bactérias ruminais são microrganismos que variam de 1 a 5 μm de tamanho. Sabe-se que essa população de microrganismos é a mais diversa do rúmen, tanto em termo populacional quanto em capacidade metabólica. As bactérias ruminais têm uma densidade populacional no rúmen maior do que qualquer outro ecossistema conhecido. Normalmente são observados valores próximos de 10^{10} células/g de conteúdo ruminal (STEWART et al., 1997).

As principais espécies de bactérias ruminais e consequentemente, as mais estudadas estão principalmente relacionadas com o processo de degradação da fibra vegetal. A Tabela 1 demonstra as características mais importantes de bactérias estudadas de microrganismos ruminais.

As bactérias são classificadas mediante a utilização de substratos ou características fermentativas comum. Entretanto, se produz uma grande superposição de bactérias nos grupos, porque a maioria das espécies é capaz de fermentar vários substratos (CHURCH, 1993).

Tabela 1- Nichos tróficos e principais produtos de espécies bacterianas.

Espécie	Nichos tróficos	Principais produtos
<i>Fermentadores de carboidratos fibrosos</i>		
Fibrobacter succinogenes	Parede celular (PC) Celulose pura (CEL)	Succinato (Su), Formato (Fo) Acetato (Ac)
Ruminococcus albus	PC, Cel	Ac, Fo, Etanol (Et)
Ruminococcus flavefaciens	PC, Cel	Su, Fo, Ac
Butyrivibrio fibrisolvens	PC, Cel, Hemicelulose , (hemicel), Amido (Am), Pectina (PEC), Açúcares diversos (AD)	Butirato (Bu), Fo, Lactato (La), Ac
<i>Fermentadores de carboidratos não fibrosos</i>		
Ruminobacter amylophilos	Amido (Am)	Su, Fo, Ac
Selenomonas ruminantium	Am, La AD	La, Ac, Propionato (Pro) Bu, Hidrogênio (H ₂)
Prevotella SP.	Am, Hemicel, Pec, Beta- glucanos, Proteínas	Su, Ac, Fo, Pro
Succinivibrio dextrinosolvens	Maltodextrinas (Mal)	Su, Ac, Fo, La
Streptococcus bovis	Am, AD	La, Ac, Fo, Et
<i>Organismos fermentadores de pectina</i>		
Lachnospira multiparus	Pec, AD	La, Ac, Fo
<i>Lipolíticos</i>		
Anaerovibrio lipolytica	Glicerol (Gli), La	Ac, Su, Pro
<i>Proteolíticos</i>		
Peptostreptococcus SP.	Peptídeos (Pep), AA	AGCR, Ac
Clostridium aminophilum	Pep, AA	Ac, Bu
Clostridium Sticklandii	Pep, AA	Ac, Bu, Pro, AGCR
<i>Facultativos</i>		
Lactobacillus sp	Am, Ça, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂
Enterobacter SP	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂
Streptococcus SP	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂

Adaptado por Church (2007).

As mesmas são classificadas em função dos subprodutos utilizados e dos produtos de fermentação Lana. (2007), conforme apresentado a seguir.

2.2.1.1 Bactérias celulolíticas

As bactérias de maior importância para a fermentação ruminal da fibra alimentar são, *Fbrobacter succinogenes*, *Ruminococos albus* e *R. Flavefaciens*. Portanto este grupo de bactérias pode ser considerados o mais decisivo para a evolução dos ruminantes, quanto aos animais de produção, já que conferem a estes animais a degradação da fibra alimentar, o que não ocorre em não ruminantes (ORSKOV, 1988).

De maneira geral as bactérias celulolíticas retiram energia para seu crescimento da fibra alimentar, porém para que ocorra a síntese de proteína microbiana existe a necessidade de outros nutrientes como nitrogênio, enxofre, condições de pH ruminal, temperatura e outros. Portanto a amônia é o substrato nitrogenado de escolha das bactérias celulolíticas para a sua síntese protéica, bem como para as bactérias amilolíticas (VAN SOEST, 1994).

2.2.1.2 Bactérias Amilolíticas

Segundo Otero. (2008), o amido esta presente na fermentação de carboidratos não-estruturais, principalmente quando se trata de dietas a base de concentrado. As principais bactérias amilolíticas são, *Bacteroides amilophilus* e *Streptococcus bovis* que, em conjunto com bactérias utilizadoras de açúcares solúveis, que ocupam nicho comum.

De acordo com Arcuri, et al. (2011) as bactérias *streptococcus bovis* possuem capacidade de fermentar o amido em açúcares solúveis, produzindo assim com essa ação o acetato, quando esses carboidratos são abundantes na dieta do animal, podem ser fermentados, acetato, formato e etanol, ou acetato e propionato quando a concentração de substrato decresce no rúmen. Sendo assim estas ultimas rotas maximizam a produção de ATP em um ambiente anaeróbico.

A presença de amido em grandes quantidades no rúmen propicia o desenvolvimento de bactérias amilolíticas, quais apresentam padrão de fermentação diferente daquelas que utilizam carboidratos fibrosos e, adicionalmente, a fermentação mais rápida do amido propicia o acúmulo de ácidos orgânicos, o que pode resultar em declínio do pH, que é uma condição considerada como sendo anormal e indesejável; por vários motivos, como por afetar negativamente a digestão da fibra, e comprometer a saúde do animal podendo levar o mesmo a uma acidose ruminal (MILLEN et al., 2007).

2.2.1.3 Bactérias Proteolíticas

As bactérias proteolíticas tem uma importância bem significativa, isso se deve ao fato de que quando a proteína dietética é degradada pelos microrganismos ruminantes acontece a liberação de amônia e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Sendo que quando ocorre o processo pelo qual o aminoácido libera o seu grupo amina na forma de amônia isso pode exceder a taxa de utilização da mesma para a síntese microbiana, podendo acarretar na perda da eficiência na conversão alimentar (TEDESCHI et al., 2000).

O conhecimento detalhado do processo digestivo da proteína nos ruminantes em geral é de suma importância para o entendimento e avaliações das necessidades proteicas dos mesmos. A síntese e a degradação da proteína que ocorre no rúmen, alteram em grandes quantidades a qualidade dos compostos nitrogenados utilizados pelos animais (SOUZA, 1999).

As proteínas são degradadas por ação de enzimas de microrganismos, como *Bacteroides sp*, *Selenomonas sp*, *Butyrivibrio sp*, formando peptídeos e aminoácidos que serão utilizados na síntese microbiana ou sofrerão deaminação oxidativa, formando amônia e esqueletos de carbono. A amônia não utilizada durante o processo fermentativo para a síntese proteica, pelas bactérias celulolíticas, poderá ser absorvida na parede ruminal sendo reciclada pelo fígado em uréia, depois desse processo ela voltará ao rúmen pela saliva em forma de ureia formando então o ciclo da ureia (OTERO, 2008).

A proteína que é sintetizada no rúmen segue seu trânsito alimentar e, no abomaso e intestino é hidrolisada novamente pelas enzimas do animal, que irá resultar em aminoácidos que serão absorvidos pelas vilosidades intestinais e via porta, seguindo assim para o fígado e

depois para os tecidos, completando assim o processo de degradação e metabolismo da proteína (ALISSON et al., 1996).

O esqueleto de carbono contido nos carboidratos e proteínas poderá ser utilizado pelos microrganismos ruminais para a síntese de AGCC e também na formação de, ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) sendo estes (isoburitato, isovalerato e 2-metibutirato), e poderão ser associados na disponibilidade de aminoácidos dos AGCR que são (valina, leucina e isoleucina), os quais são aminoácidos fundamentais no processo de síntese proteica para algumas espécies de bactérias (OTERO, 2008).

2.2.2 Fungos

Os primeiros registros de fungos flagelados no rúmen foram observados no ano 1910, mas acreditava-se que eram protozoários flagelados (KAMRA, 2005). Somente na década de 70 é que descobriram que estes microrganismos ruminais eram fungos, que foram identificados como *Callimastix sp*, *Sphaeromonas sp*, *Oikomona sps*, entre outros. A confirmação foi devido a presença de quitina na parede celular desses microrganismos.

De acordo com Arcuri et al. (2011), resumidamente, os zoósporos eles tem como principal função a degradação de alimentos fibrosos, o que diferencia dos protozoários, os mesmos aderem se aos fragmentos das forragens, invadindo os tecidos vegetais por meio de talos e rizóides.

De acordo com Dehority. (2003), se não houver a germinação de novos zoósporos isso irá impedir a colonização do material vegetal ingerido pelo hospedeiro. Provavelmente, isto irá acontecer devido a queda drástica do pH no líquido ruminal na presença de altas concentrações de açúcares, inibindo a produção de zoósporos no rúmen.

As características morfológicas usadas para a identificação dos gêneros conhecidos de fungos ruminais são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Características morfológicas dos gêneros de fungos anaeróbicos. Os gêneros se referem a organismos classificados com divisão *Eumycotina* subdivisão *Mastigomycotina* Classe *Chytriumycetes* ordem *Neocallimasticales* e família *Neocallimastigaceae*.. As descrições se referem às características morfológicas mais frequentemente observadas.

Genero	Numero de flagelos do zoósporo	Forma do zoósporo	Talo ou hifa	Referências
Neocallimastix	Poliflagelado (7-17)	Elipsoide	Abundantes e muito ramificados	Orpin (1975, 1977a) Orpin e Bouniff (1978)
Piromyces	Mono e tetraflagelado	Ovoide a piriforme	Pequenos e muitos ramificados	Ho et al. (1993a, 1993b)
Caecomyces (ou Sphaeromonas)	Mono a biflagelado	Esférica	Ausencia de sistema de hifas ramificadas	Orpin (1976)
Orpinomyces	Poliflagelado	Ovoide	Policêntricas	Barr et al. (1989)
Anaeromyces	Monoflagelado	Ovoide	Policêntricas	Breton et al., (1990) Ho et al. (1993c)

Os tipos de fungos presentes no sistema rúmen-retículo dos animais ruminantes pode ser observados na Tabela 3.

Tabela 3- Fungos presentes no rúmen dos animais e seus respectivos hospedeiros.

Fungos	Hospedeiro
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Vaca
<i>N. patriciarum</i>	Ovelha
<i>N. hurleyensis</i>	Bovino
<i>Sphaeromonas communis</i> (<i>Caecomyces communis</i>)	Bovino
<i>Caecomyces equi</i>	Cavalo
<i>Orpinomyces bovis</i>	Bovino
<i>Anaeromyces mucronatus</i> (<i>Ruminomyces mucronatus</i>)	Bovino
<i>Ruminomyces elegans</i>	Bovino
<i>Piromyces communis</i> ,	Cavalo, elefante
<i>Piromyces mae</i> ,	Cavalo, elefante
<i>Piromyces dumbonica</i>	Cavalo, elefante

Adaptado de Kamra (2005).

2.2.3 Protozoários

As protozoários são microrganismos unicelulares, anaeróbicos, variando seu tamanho em torno de 20 a 200 μm , sendo assim, seu tamanho, é de 10 a 100 vezes maior do que as bactérias (DEHORITY, 1993).

Devido ao seu tamanho e quantidade populacional dos protozoários a qual varia entre 10^4 a 10^6 protozoários /ml de conteúdo ruminal, essa concentração em geral representara cerca de 40 a 60% da biomassa microbiana total do rúmen (EZEQUIEL et al., 2002).

Como consequência, a presença desses microrganismos no rúmen traz efeitos benéficos e outros adversos para a produção animal. Na Tabela 4 foram compilados os efeitos benéficos e adversos de protozoários mais frequentes, a partir de trabalhos de vários autores.

Tabela 4- Efeitos benéficos e adversos da presença de protozoários no rúmen.

Efeitos aumentados com a presença de protozoários ruminais	Efeitos diminuídos com a presença de protozoários ruminais
<i>Efeitos benéficos</i>	
Estabilidade da fermentação e do pH	Concentração do ácido láctico
Aspecto físico do	Níveis de cobre no plasma sanguíneo e fígado
Concentração de AGCCs elevada e estável	Susceptibilidade à acidose por ácido láctico
Degradação da MS	Susceptibilidade à toxidez por cobre
Degradação da fibra e Digestão do amido	Susceptibilidade a diarreias
<i>Efeitos adversos</i>	
Concentração de amônia	População bacteriana
Atividade proteolítica	Síntese de proteína microbiana
Metanogênese	Fluxo de nitrogênio para o intestino delgado
Níveis plasmáticos de AGS	Níveis plasmáticos de AGI
Susceptibilidade ao timpanismo	Ganho de peso
Gordura na carcaça	Crescimento de lã
	Eficiência na CA

Adaptado de Williams e Coleman (1997), Lopes et al. (2002); Dayrell et al. (1993)

Os protozoários, possuem uma grande capacidade de degradação e fermentação dos componentes fibrosos, como celulose, hemicelulose e pectina. Além de possuir a capacidade de degradação desses substratos, os protozoários utilizam as próprias bactérias ruminais como fonte de substratos o que vai contribuir para o controle do ambiente ruminal (ORSKOV, 1988).

Eles também tem, como características, a ingestão de amido e açúcares solúveis, tornando-o microrganismos particularmente benéficos, principalmente para animais que recebem dietas com alto teores de concentrado, pois eles irão reduzir a quantidade e disponibilidade de substratos altamente fermentáveis às bactérias, e consequentemente irão auxiliar no controle do pH ruminal (DERORTY E TIRABASSO, 2000).

2.3 Ambiente Ruminal

Para manter uma população microbiana ruminal ativa deve levar em consideração algumas características ruminais que são mantidas pelo próprio hospedeiro, tendo como principais a manutenção do pH, temperatura, anaerobiose e umidade ideais ao crescimento microbiano (VALADARES FILHO E PINA, 2011).

Segundo Valadares Filho e Pina. (2011) através de estudos *in vitro* relataram que pH do líquido ruminal abaixo de 6,0 podem inibir as bactérias fermentadoras de celulose e diminuir significativamente a eficiência de síntese de proteína bruta (PB), sabendo que o pH ruminal ideal é 7,0 pode ocorrer uma variação entre 5,5 a 7,2,.

A temperatura do ambiente ruminal apresenta uma variação, oscilando entre 39 e 41°C, tendo uma média em torno de 39°C, e essa característica auxilia na manutenção de uma população microbiana ruminal ativa (VALADARES FILHO E PINA. 2011).

Segundo Van Soest. (1994), o principal fator que determina uma perturbação da fermentação ruminal e distúrbios digestivos, é a mudança abrupta de uma dieta, fazendo que os microrganismos ruminais alterem seu balanço fermentativo, causando um desequilíbrio das espécies microbianas, possibilitando o desenvolvimento de organismos facultativos oportunistas que podem ter uma dominância da fermentação por meio da baixa do pH e produção de ácidos, conduzindo a um distúrbio ruminal.

2.4 Substratos da fermentação ruminal

A fermentação ruminal é um processo resultante de atividades físicas e químicas que transformam os substratos da dieta em produtos que são úteis como os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVC), proteína microbiana, vitaminas do complexo B e produtos inúteis como o metano e gás carbônico, além dos produtos nocivos como a amônia quando em excesso para o animal hospedeiro (OWENS E GOETSCH, 1993; OTERO, 2008).

Para os animais ruminantes os carboidratos compõe cerca de 70 a 80% da ração e são uma das principais fontes de energia, componente do leite e também na manutenção da saúde do animal (NUSSIO et al., 2011).

A fermentação dos carboidratos no rúmen da origem aos AGCC, que é a maior fonte de energia para os ruminantes, atendendo até 80% das exigências diárias (ISHLER et al.; 2000). Além disso o uso desses carboidratos pelos microrganismos ruminais, é um fator limitante para a maximização da síntese de proteína microbiana, e manutenção da flora ruminal (VARGA E KONONOFF, 1999).

A maioria desses carboidratos consumidos pelos ruminantes são polímeros de glucose que aparecem na forma de celulose ou amido, entretanto em outras rações podem conter quantidades importantes de celulose e pectina. Para que esses carboidratos sejam submetidos a fermentação, a maioria deles são hidrolisados no rúmen, os carboidratos estruturais fazem parte da parede celular das plantas (celulose, hemicelulose e pectina). Os carboidratos não estruturais estão distribuídos no conteúdo celular entre eles destacam-se a glicose, frutose, amido (degradação de 40 -90%, dependendo da fonte e do tipo de processamento) e outros (NUSSIO et al., 2011).

A fermentação ruminal que vai exercer a digestão gástricas nos ruminantes, fornece a maior parte dos componentes nutritivos dos alimentos disponíveis para que possa ser utilizada diretamente pelos tecidos dos animais. Dessa forma tanto o carboidrato estrutural (CE) e o carboidrato não estrutural (CNE), proteína e outros substratos fermentáveis são convertidos em AGCC, gás carbônico, metano, amônia e células microbianas, como produtos finais da fermentação (LENG, 1976; OTERO, 2008).

2.5 Técnica de digestibilidade *in vivo*

A digestibilidade “*in vivo*” parece ser uma das técnicas mais adequadas para a avaliação dos alimentos porque fornece os resultados mais próximos dos que realmente ocorre dentro do organismo animal e conseqüentemente aproxima-se mais dos resultados obtidos na aplicação prática (FERRARI, 2003).

Um dos principais objetivos de experimentos de digestibilidade é para que obtenha resultados de formas apuradas da quantidade de alimentos que foi fornecido para o animal e a quantidade excretada em determinados períodos. É importante lembrar que os animais usados para tal processo precisam passar por uma adaptação na dieta, levando em consideração que o resíduo indigestível nas fezes seja a mesma dieta a ser testada, sendo que de 10 a 15 dias é suficiente para que ocorra uma adaptação satisfatória (BERCHIELLI et al., 2011).

Porém como todas as técnicas e medidas utilizadas para experimentos, a técnica “*in vivo*” esbarra em alto custo e também, na necessidade de infra estrutura (gaiolas metabólicas, animais, grande quantidade de alimento, etc), e conseqüente uma mão de obra qualificada, além de ser um processo demorado e portanto de difícil aplicação (FERRARI, 2003).

As metodologias “*in situ*” e “*in vitro*”, procuram obter resultados parecidos com a técnica acima citada, porém são técnicas mais baratas, mais rápida e menos trabalhosas. Outro impasse na técnica “*in vivo*” é que ela estima somente a degradabilidade do alimento no trato digestivo total, sendo que a degradabilidade ruminal e intestinal separadamente acaba se tornando impossível (FERRARI, 2003).

2.5.1 Relação volumoso (V) concentrado (C) em digestão “*in vivo*”

Redução na relação volumoso concentrado v/c, impõe condições aos animais que implicam modificação de seu comportamento, bem como do ambiente ruminal (GONÇALVES et al., 2001). Segundo Mertens et al. (1997), os ruminantes requerem teor mínimo de fibra em sua dieta, para que possa oferecer estímulo para a ruminação, através do movimento antiperistáltico do esôfago, levando o bolo alimentar novamente a boca, onde o

bolo alimentar sofre remastigação e estimula a liberação de saliva, que apresenta ação tamponante no rúmen.

Resende et al. (2001), através de estudos com bovinos mestiços, relataram que os diferentes níveis da relação v/c não apresentaram efeito significativo sobre a ingestão de matéria seca (MS), constatou também que para energia bruta EB, expressa em Mcal/dia, não apresentou efeito significativo dos níveis de concentrado na dieta sobre a ingestão da mesma, sendo o valor médio obtido de 43,3 Mcal/dia.

Quando o animal encontra-se sob regulação física da ingestão, a energia aumenta com o valor nutritivo da dieta e, dessa forma, a distensão ruminal é o principal mecanismo regulador da saciedade. Dietas à base de forragem enquadram-se, normalmente, neste caso, sendo a ingestão diretamente ligada ao valor nutritivo dessa dieta, entretanto, quando a adição de concentrado melhora o valor nutritivo da dieta, a ingestão de energia aumenta até determinado ponto, de transição entre o controle físico e fisiológico e, a partir daí, permanece constante. (RESENDE et al., 2001),

As forragens, constituem em grande proporção os nutrientes das dietas dos ruminantes, e na composição desses alimentos há energia, proteína e fibra, devido a presença da fibra nesses alimentos assim vai ocorrer estímulos indiretos para a mastigação, ruminação e salivação. Os alimentos concentrados são utilizados para complementar as dietas a base de volumoso, e em alguns casos ocorre o aumento e disponibilidade de energia, para os microrganismos ruminais (TEIXEIRA E ANDRADE, 2001).

2.6 A técnica de digestibilidade “*in vitro*”

O método “*in vitro*” consiste em deixar as amostras em contato com o líquido ruminal por cerca de 24 a 48 horas, visando repetir o que ocorre “*in vivo*” onde se tenta com este método reproduzir as condições predominante do rúmen-retículo (presença de microrganismos, anaerobiose, temperatura, poder tampão, e pH), isso no interior de um tubo de ensaio (BAUMGARDT, 1962 descrito por SILVA E QUEIROZ, 2002).

Devido aos avanços das leis de bem estar animal e campanhas contrarias a utilização de animais em experimentos, a técnica “*in vitro*” será uma metodologia que tomará mais impulso no futuro. Sendo que tal técnica terá que ser utilizada juntamente com modelos matemáticos

testados a fim de garantir um significado aplicável para os resultados obtidos (GIVENS E GILL, 1998).

O método de digestibilidade *in vitro*, teroricamente pode ser capaz de representar o processo de digestão decorrente no rúmen, abomaso ou intestino para que possa ser estimado quantitativamente a taxa e o grau de digestão similar aos obtidos *in vivo*. Devido a isso este método vem sendo bastante utilizado e conseqüentemente aperfeiçoados, para que se possa ter um resultado mais similar ao método de digestibilidade *in vivo* (BERCHIELLI, et al., 2011).

As principais preocupações para se evoluir na técnica de digestibilidade *in vitro* são o efeito sobre a estrutura física do alimento e principalmente, determinar não apenas um valor nutricional, mas o porque o alimento tem esse valor (FERRARI, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no *Campus* Universitário de Pontes e Lacerda, no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LAANA) e no Setor de Metabolismo Animal, pertencentes à Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT.

Os alimentos utilizados foram cinco rações com níveis crescentes de concentrado sendo utilizado a silagem de milho como único alimento volumoso, as rações apresentaram os níveis de 0,0%, 20,0%, 40,0%, 60,0% e 80,0% de concentrado, sendo utilizadas, 3 repetições de cada ração por bateria, além disso foram realizadas três baterias em dias diferentes para serem utilizadas como repetição experimental.

Foram utilizados fontes de alimentos diferentes para a confecção do concentrados, como o Grão de milho (GM) e o farelo de soja (FS). A silagem de milho foi coletada em diferentes pontos do silo, uma vez que se sabe que a qualidade da silagem pode variar de um ponto para o outro dentro do silo.

3.1 Composição química dos alimentos experimentais

A composição bromatológica dos alimentos que foram utilizados na ração fornecida aos cordeiros está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5- Composição bromatológica dos alimentos utilizados na ração basal utilizada na alimentação dos cordeiros doadores de inoculo para a digestão *in vitro*.

Alimentos	% de nutrientes expressos na MS					
	% MS	%MO	%PB	%EE	%FDN	%FDA
Feno	91,30	91,05	5,040	0,80	75,65	55,58
GMM	89,98	98,45	9,10	4,20	15,57	5,88
FS	88,62	92,71	50,00	1,16	14,44	10,41

Feno: feno de capim massai (*Panicum maximum* cv. massai); GMM: grão de milho moído; FS: farelo de soja; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido.

A composição química e bromatológica dos alimentos utilizados para confecção das rações experimentais com os diferentes níveis de concentrado esta demonstrada na Tabela 6.

Tabela 6- Composição bromatológica dos alimentos utilizados na formulação das diferentes rações com níveis crescentes de concentrado avaliadas no processo de digestão *in vitro* da matéria seca.

Alimentos	% de nutrientes expressos na MS					
	% MS	MO	PB	EE	FDN	FDA
SM	90,4	93,24	7,3	2,25	57,43	38,48
MGM	89,98	98,45	9,10	4,20	15,57	5,88
FS	88,62	92,71	50,00	1,16	14,44	10,41

Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato e etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), silagem de milho (SM), milho grão moído (MGM) e farelo de soja (FS).

A composição percentual e bromatológica da ração basal fornecida aos cordeiros doadores de líquido ruminal (inóculo), esta demonstrada na Tabela 7.

Tabela 7- Composição percentual (%) e bromatológica da ração basal utilizada na alimentação dos cordeiros doadores de inóculo para a digestão *in vitro*.

Alimentos	Ração Experimental
<i>Composição percentual (%) da ração basal fornecida aos cordeiros</i>	
Feno	70,00
MGM	23,25
FS	6,75
Total	100

<i>Composição bromatológica da ração basal fornecida aos cordeiros</i>						
Alimentos	% de nutrientes na MS da Ração basal					
	% MS	MO	PB	EE	FDN	FDA
Feno	63,91	63,74	5,04	0,56	52,96	38,91
MGM	20,92	22,89	2,12	0,98	3,62	1,37
FS	5,98	6,26	3,36	0,08	0,97	0,70
Total	90,81	92,88	10,53	1,61	57,55	40,98

Feno: feno de capim massai (*Panicum maximum* cv. massai); GMM: grão de milho moído; FS: farelo de soja; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido.

A composição percentual e bromatológica das rações avaliadas na metodologia da digestão *in vitro*, com os diferentes níveis de concentrado podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8- Composição percentual e bromatológica das rações experimentais na digestão in vitro.

Alimentos	Níveis crescentes de concentrado nas rações experimentais				
	0,0%	20,0%	40,0%	60,0%	80,0%
<i>Composição percentual das rações experimentais</i>					
Silagem de milho	100	80	60	40	20
Grão de milho moído	0	8	28,5	49	69,5
Farelo de soja	0	12	11,5	11	10,5
Total	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Composição bromatológica das rações experimentais avaliada na digestão in vitro</i>					
Matéria seca (MS)	90,4	90,16	90,08	90,00	89,92
Materia orgânica (MO)	93,24	93,58	94,66	95,73	96,81
Proteína bruta (PB)	7,30	12,57	12,72	12,88	13,03
Extrato etéreo (EE)	2,25	2,27	2,68	3,08	3,49
Fibra em detergente neutro (FDN)	57,60	48,92	40,56	32,19	23,82
Fibra em detergente neutro (FDA)	26,30	32,50	25,96	19,42	12,88
Carboidratos totais (CHT)	82,9	78,75	79,26	79,77	80,28
Carboidratos não fibrosos (CNF)	27,76	29,83	38,70	47,58	56,46
Nutriente digestíveis totais (NDT) ¹	67,21	68,07	72,72	77,37	82,02

3.2 Animais doadores do líquido ruminal

Foram utilizados no experimento dois cordeiros sem raça definida (SRD), não castrados, mantidos em gaiola de metabolismo, com peso corporal médio de $22,50 \pm 2,00$ kg, sendo destes, realizada as coletas de líquido ruminal por meio de sonda esofágica.

A composição bromatológica da ração basal fornecida na alimentação dos animais durante o período experimental esta descrita na Tabela 7. O consumo da ração total em % de MS PCV⁻¹ foi de 3,5 %.

O sal utilizado nas rações fornecidas aos cordeiros doadores de líquido ruminal foi fornecido em quantidade de 10g por animal dia e sua composição está descrito na Tabela 9.

Os cordeiros foram alimentados duas vezes ao dia, as 7:00 e posteriormente as 16:00, sendo o fornecimento diário da ração fracionado em 50% do volume da ração total por refeição. Os animais foram adaptados com a dieta durante 15 dias, para que a microbiota ruminal dos mesmos estivesse adaptada a fonte de carboidrato

Tabela 9: Composição química do sal mineral fornecido aos cordeiros utilizados no experimento.

Elemento	Quantidade Kg ⁻¹ do Sal Mineral		
Cálcio	(Mín / Máx)	98,00 / 120,00	g Kg ⁻¹
Cobalto	(Mín)	50,00	mg Kg ⁻¹
Cobre	(Mín)	500,00	mg Kg ⁻¹
Enxofre	(Mín)	16,00	g Kg ⁻¹
Ferro	(Mín)	2.000,00	mg Kg ⁻¹
Flúor	(Máx)	900,00	mg Kg ⁻¹
Fósforo	(Mín)	85,00	g Kg ⁻¹
Iodo	(Mín)	106,00	mg Kg ⁻¹
Magnésio	(Mín)	500,00	mg Kg ⁻¹
Manganês	(Mín)	1.350,00	mg Kg ⁻¹
Selênio	(Mín)	16,00	mg Kg ⁻¹
Sódio	(Mín)	148,00	g Kg ⁻¹
Zinco	(Mín)	4.800,00	mg Kg ⁻¹

No dia de coleta, os cordeiros eram alimentados as 7:00 horas, sendo a coleta realizada duas horas após o fornecimento, de acordo com Silva & Queiroz (2002).

A sonda utilizada na coleta do líquido ruminal foi devidamente lubrificada com óleo mineral, para que a mesma não causasse algum tipo de lesão ao esôfago do cordeiro (Figura 2)



Figura 2: Kitassato instalado na bomba de sucção e mantido em recipiente contendo água morna (A); Lubrificação utilizando óleo mineral, antes de iniciar as atividades de coleta do líquido ruminal (B)

Para a coleta do líquido ruminal (inóculo), os animais eram retirados da gaiola de metabolismo, e contidos, individualmente. Foi utilizado um kitassato como recipiente receptor

do inoculo, o qual se encontrava devidamente acoplado à bomba de sucção a vácuo, sendo que este era mantido em temperatura semelhante à encontrada no rúmen (o kitassato era mantido em outro recipiente contendo água morna, mantendo temperatura entre 39 a 40 °C).

3.4 Digestibilidade *in vitro*

No dia anterior a coleta do líquido ruminal e realização da DIVMS, era preparada as soluções, descritos por McDougall, mais ureia e glicose (utilizadas para compor a saliva artificial), cujas quais eram colocadas juntamente com o inóculo dentro do tubo com as dietas experimentais e posteriormente eram colocados no aparelho de banho-maria com movimentação continua para simular os movimentos ruminais e mantendo a temperatura aproximada a temperatura ruminal de 39,2 °C.

A saliva artificial foi preparada utilizando a solução tampão de McDougalll (NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2) e mais duas outras soluções, sendo uma de uréia (5,5 g /100 mL de H_2O destilada) e outra de glicose (5,5 g/100 mL de H_2O destilada), conforme descrito por Silva & Queiroz (2002). Uma hora antes da incubação *in vitro* rãs rações utilizadas foi adicionado a cada 300 mL da solução de McDougall, 5 mL da solução tampão de uréia e 5 mL da solução de glicose e acondicionado em banho Maria a 39° C até a sua utilização.

A cada tubo foi adicionado 50 mL da mistura (37,5 mL da saliva artificial e 12,5 mL de líquido ruminal – inoculo), logo em seguida foi acrescentado CO_2 sobre a superfície interna dos tubos e fechados imediatamente com rolhas de borracha equipadas com válvulas de Bunsen.

Sendo os mesmos mantidos em banho Maria com agitação constante por um período de 24 horas.

3.5 Determinação do valor de pH e concentração do nitrogênio amoniacal do líquido ruminal.

Para a mensuração do pH, do líquido contido em cada tubo de ensaio após a fermentação *in vitro* foi transferidos para recipientes menores onde foi medido imediatamente em potenciômetro digital (medidor de pH microprocessado, modelo TEC-5 com compensação automática de temperatura - Tecnal[®]) após a filtração. Em seguida foi mensurado o pH, os recipientes contendo os líquidos da digesta eram congelados para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH_3).

Na determinação do N-NH_3 , os recipientes congelados eram removidos do congelador e após os líquidos descongelados eram colocados aproximadamente 12,0 mL do líquido em tubos de ensaio cônicos para serem centrifugados 3.000 rpm (CentriBio[®]) por 15 minutos. Depois de centrifugado, o sobrenadante era pipetado 2,0 mL e disposto em tubo de proteína. Após pipetado o líquido sobrenadante no tubo de proteína, era adicionado aproximadamente 12 mL de água destilada, simplesmente para o aumento do volume.

O processo para a determinação do N-NH_3 era semelhante ao de determinação de nitrogênio (N) em alimentos utilizando a metodologia do Semi-micro-Kjeldahl, porém a solução base de hidróxido de sódio (NaOH) era substituída pelo hidróxido de potássio (KOH). O tubo contendo líquido da fermentação *in vitro* centrifugado e H_2O destilada era colocado no destilador, e após a destilação do N-NH_3 o mesmo era titulado com ácido clorídrico (HCl) em proporção 1:1, técnica esta proposta por Fernner. (1965) modificada por Vieira. (1980).

3.6 Análises químicas dos alimentos

O teor de nitrogênio dos alimentos estudados foi obtido pelo método semi-micro-Kjeldahl, usando 6,25 como fator de conversão para PB, a matéria mineral (MM) e matéria orgânica (MO) foram realizadas pelo método por incineração em mufla a 600 °C e o teor de extrato etéreo (EE) foi determinado pela extração por lavagem com éter de petróleo, segundo citações de Silva & Queiroz (2002).

A determinação da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos foi realizada de acordo com Van Soest *et al.* (1991). A determinação dos

carboidratos totais (CHT) dos alimentos, sobras e fezes foi obtida pela equação $CHT = MO - [EE + PB]$ de acordo com Sniffen et al. (1992).

3.7 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições (baterias) com cinco rações com diferentes níveis de concentrado para comparar a digestibilidade *in vitro* da MS

A análise das variáveis estudadas foi interpretada por meio de análise de variância no programa Sistema de Análise Estatística e Genética - SAEG (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 1997). As diferenças observadas para os diferentes níveis de concentrado nas rações experimentais sobre as variáveis estudadas (digestibilidade *in vitro* da MS, pH e concentração do nitrogênio amoniacal) foram determinadas por análise de regressão considerando 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de digestibilidade *in vitro* (DIV) da matéria seca (MS), valor de pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) do líquido ruminal após a fermentação *in vitro* de 24 horas estão demonstrado na Tabela 10.

A inclusão de níveis crescentes de concentrado nas rações experimentais não alterou (P>0,05) o DIV da MS (Tabela 10) com valores médios de 59,74%.

A ausência de diferença significativa para a DIV da MS pode ter sido influenciada pelo elevado valor do coeficiente de variação observado para esta variável, assim, mesmo sendo observado uma variação ampla na DIV da MS de 7,80% (Figura 3) entre as rações com 0,0% e 40,0% de concentrado não foi observado diferença significativa entre os tratamentos

Tabela 10: Valores de digestibilidade *in vitro* (DIV) da matéria seca (MS) das diferentes rações contendo níveis crescentes de concentrado, valor de pH e concentração de nitrogênio amoniacal após a fermentação de 24 horas *in vitro* para as diferentes rações experimentais.

Variável	Níveis de concentrado nas rações experimentais					Regressão	%CV
	0%	20%	40%	60%	80%		
CDIVMS (%)	57,87	59,98	62,77	59,29	58,79	$\bar{Y} = 59,74$	7,34
pH	7,44	7,41	7,41	7,39	7,40	$\bar{Y} = 7,41$	4,00
N-NH ₃ mg/100 mL	3,36	3,79	3,88	3,74	3,79	¹	5,11

$$^1Y = 3,41375 + 0,018054X - 0,0001753X^2 \quad (R^2 = 47,11\%)$$

Os dados do presente trabalho ficaram abaixo do observado por Moreno *et al.* (2010) em estudo *in vivo* com cordeiros alimentados com diferentes níveis de concentrado, os quais observaram um CDT da MS de 77,23%, para a ração com media de 50,0% de concentrado, este valor foi 18,72% superior aos dados observado para o tratamento com 40,0% de concentrado no presente estudo. Indicando que metodologia “*in vitro*” para determinação da digestibilidade da MS pode acarretar em valores subestimados em comparação aos estudos *in vivo*.

Beleze *et al.* (2007), através de estudos da DIVMS pelo método BAUMGARDT com bubalinos e bovinos com dietas de diferentes níveis de concentrado 0, 5, 10 e 20% utilizando

feno de capim estrela (*Cynodon plectostachyus*), milho e farelo de soja e inclusão de aditivo relataram que rações contendo ionóforos obtiveram valores mais baixos de digestibilidade, diferenciando das rações com a inclusão de probiótico onde resultou em um aumento na DIV da MS.

Com a inclusão de 40% de concentrado observou-se uma DIV da MS de 62,77% valor este que corrobora com os resultados obtidos por Restle et al. (2004), uma vez que estes trabalhando com cabras leiteiras recebendo rações com diferentes níveis de concentrado e substituição do grão de sorgo (GS) pela casca de soja (CS), notaram um declínio na DIV da MS a medida em que houve a substituição do GS pela CS, fato este que pode ser explicado em parte pelo alto teor de FDN da CS em relação GS.

Os valores obtidos neste trabalho ficaram abaixo dos dados observados por Zambom et al. (2001), onde estes avaliando o valor nutricional de rações com diferentes níveis de concentrado, relataram que a DIV da MS do grão de milho (GM) e do farelo de soja (FS) teve uma média de DIV da MS de 96,51% valor este superior ao observado neste estudo para todas as rações testadas com os diferentes níveis de concentrados.

Freitas. (2001), através de estudos com o método “*in vitro*” para a produção de gás ele relatou que apesar de conseguir demonstrar a ocorrência de resultados associativos em algumas amostras, concluiu que esta técnica ainda requer maiores estudos, para que possa ser plenamente confiável pois apresentou resultados diferentes aos observados em outras técnicas como a de Baumgardt (fermentação ruminal).

Gonçalves et al. (2001), através de estudos com cabras leiteiras alimentadas com diferentes teores de volumoso (V) e concentrado (C) sendo 100%, 80:20%, 60:40%, 40:60%, 20:80%, relataram que a utilização de concentrados na dieta acarretou um incremento significativo em função ao aumento da produtividade, que, de certa forma, se contrapõe à característica principal dos ruminantes, que é a degradação de componentes da fibra dos alimentos, pela presença de microrganismos ruminais.

Os diferentes níveis de concentrado nas rações experimentais não influenciaram ($P>0,05$) o valor de pH do líquido ruminal após as 24 horas de fermentação Tabela 10. Este fato, pode ter ocorrido devido a saturação do ambiente *in vitro*, que ocorre rapidamente e assim diminuir o metabolismo das bactérias presente no inoculo e consequentemente a DIV da MS.

O valor médio mensurado para o pH do líquido ruminal após 24 horas de fermentação foi de 7,41. Estudo *in vivo* realizado por Maeda et al. (2007) demonstrou que o valor de pH

obtidos próximos a quatro horas após a alimentação apresentam o menor valor (6,54) devido a fermentação máximas dos carboidratos ocorrem durante este período de fermentação.

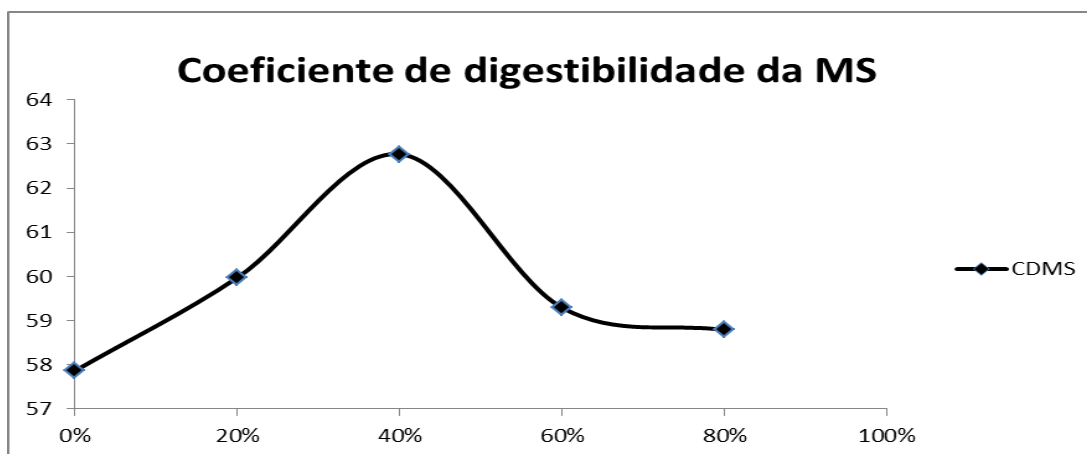


Figura 3: Comportamento da digestibilidade *in vitro* da MS para as rações experimentais contendo diferentes níveis de concentrado (0,0%; 20,0%; 40,0%; 60,0%; 80,0% na MS)

A inclusão de níveis crescentes de concentrado nas rações experimentais alterou maneira quadrática ($P < 0,05$) a concentração do $N-NH_3$ do líquido ruminal após 24 horas de fermentação ($Y = 3,41375 + 0,018054X - 0,0001753X^2$) Tabela 10.

O ponto de máxima concentração de nitrogênio amoniacal foi estimado para o nível de 51% de concentrado com valor médio de 3,88 mg de nitrogênio/100 mL do conteúdo fermentado.

O valor de máxima concentração de $N-NH_3$ do líquido ruminal após as 24 horas de fermentação ficou abaixo da concentração de 5,0 mg/100 mL estabelecida pela literatura para não limitar o crescimento microbiano (Zeoula et al., 2003). Este fato podem ter influenciado no desenvolvimento da bactérias acarretando no baixo valor de DIV da MS observada para as diferentes rações experimentais.

5 CONCLUSÃO

A digestibilidade *in vitro* da MS não é alterada com a utilização de rações com diferentes níveis de concentrado. Porém novas pesquisas deverão ser realizadas para compara aos métodos de digestibilidade *in vitro* com o *in vivo*, para que os pesquisadores tenha confiança nos valores obtidos nas diferentes metodologias.

REFERÊNCIAS

ALLISON, M. J. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Duckes **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. Ed., Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1996. 856 p.

ALVES. S. K.; CARVALHO de .F. F. R.; VÉRAS. A. S.C. et al. Níveis de Energia em Dietas para Ovinos Santa Inês: Digestibilidade Aparente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.6, 2003, p. 1962-1968.

BELEZE, J. R. F.; ZEOULA, L. M.; JACOBI, G. et al. Aditivos vs teores de concentrado na ração de bubalinos e bovinos: digestibilidade in vitro da matéria seca. **Revista Acta Scientiarum Animal Science**. Maringá, v. 29, n. 4. 2007. p. 417-424.

BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA de.S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição In: In: BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA de.S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011 616 p. 415-436.

BRASIL. Instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE). **Produção da pecuária municipal**. 2009 55p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/ppm2009.pdf>>. Acesso em: 11/05/2012.

CALDWELL, D.R.; KEENEY, M.; VAN SOEST, P.J. Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by *Bacteroides amylophilus*. Journal of Bacteriology, 98:668, 1969.

CARDOSO, R.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DASILVA, J. F. et al. Consumo e digestibilidade aparentes totais e parciais de rações contendo diferentes níveis de concentrado, em novilhos F1 Limousin X Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1832-1843, 2000.

CHURCH, D.C. Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes. Zaragoza: Acríbia, 1993. 641 p. Citado por: OLIVEIRA, J. de. S.; ZANINE, A. de. M.; SANTOS, .E .D. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletronica de Veterinária**. Viçosa, v.8, n.6, 2007, p. 1695-7504.

DEHORYTI, B. A **Laboratory manual for classification and mosphology of rumen ciliate protozoa**. Boca Raton, Fla: CRC Press 1993. 325 p.

DEHORYTI, B. A. ; ORPIN, C. G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON P.N.; STEWART, C.S. (Eds). **The rumen microbial ecosystem**. 2. Ed. London: Blackie Academic, 1997. p. 196-245.

DEHORYTI, B. A.; TIRABASSO, P.A. **Antibiosis between ruminal bacteria an ruminal fungi**. Applied and Environmental Microbiology, 66:2921, 2000.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Tratado de anatomia veterinária. Rio de Janeiro. 3 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 668 p. Disponível em:<http://br.librosintinta.in/biblioteca/verpdf/www.unimar.br/cursos/graduacao/veterinaria/ementas_veterinaria-unimar.pdf.htm> . Acesso em: 05/04/2012.

EZEQUIEL, J. M. B. et al. Quantificação das bactérias solidas aderidas, bactérias e protozoários líquidos-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 31. 2002. 107 p.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam destilation. **Journal of Dairy Science**, v. 48. n. (4). 1965. p. 249-251.

FERRARI, R. V. B. **Estimativa do efeito associativo entre concentrados e volumoso, através da medida de digestibilidade *in situ* da matéria seca e da fibra bruta em detergente neutro**. 2003. 104p. Dissertação (Mestrado em zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul Departamento Zootecnia, Porto Alegre 2003, 104 p.

FERRARI, R.V-B. **Estimativa do efeito associativo entre concentrados e volumoso, através da medida de digestibilidade “in situ” da matéria seca e da fibra em detergente neutro**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Departamento de Produção animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 2003. 97 p.

FILHO, S. de. C. V.; PINA, D. dos.S. Fermentação ruminal. In. BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA de.S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011 616 p. 161-189.

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

FREITAS, T. S. **Avaliação de misturas de volumosos de baixa qualidade com concentrados pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro***. 2001. 132 p.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2001. 132 p.

FURLAN. R. L.; MACARI. W.; FILHO. D. E. de. F. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. . In: BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA de.S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011 616 p. 1-25.

GENTIL.R.S.; **Substituição do milho ou feno pela casca de soja na alimentação de pequenos ruminantes**. 2010. 115P. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Departamento de Ciência Animal e Pastagens, São Paulo, 115 p.

GIVENS, D. I.; GILL, M. Current and future potential of alternative techniques. **British Society of Animal Science**. Lothian. v . 22. 1998. p. 161-171.

GIVENS, D. I; GILL, M. Current and future potential of alternative techniques. **British Society of Animal Science**. Lothian, v.22, 1998. p. 161-171.

GOBBO. S. P. **Comparações entre procedimentos laboratoriais das técnicas de produção de gases e incorporação de radiofósforo pelos microrganismos na avaliação *in vitro* de alimentos para ruminantes**. 2001. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Departamento de Energia Nuclear na Agricultura, São Paulo 2001, 60 p.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. de. P.; RODRIGUES, M. T. et al. **Padrão Nictemeral do pH Ruminal e Comportamento Alimentar de Cabras Leiteiras Alimentadas com Dietas Contendo Diferentes Relações Volumoso:Concentrado1**. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa. v. 30. n. 6. 2001. p. 1886-1892.

HOBSON, P. N. Rumen Microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*, v. 9, p 42-77, 1971. Citado por. OTERO, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas**. 2008. 86p. Dissertação (Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal). Universidade de São Paulo, Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo 2008, 86 p.

ISHLER, V.; HEINRICHS, J.; VARGA, G. From feed to milk: **Understanding rumen function**. Extension Circular. 2000. p. 422.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, v.89, n.1, p. 124-134, 2005. LEEK, B.F. Digestão dos ruminantes. In: SWENSON, M.J., REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Ed. 11, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p. 353-389.

LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Sugar cane for cattle production: present constraints , perspective and research priorities. *Tropical Animal Production*. v. 1. n. 1. 1976. p. 1-22. Citado por: OTERO, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas**. 2008. 86p. Dissertação (Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal). Universidade de São Paulo, Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo 2008, 86 p.

LIN, K. W.; PATERSON, J. A.; LADISCH, M. R. Anaerobic fermentation: Microbes from ruminants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 3, 1985. p. 98-107,

Maeda, E.M.; Zeoula, L.M.; Geron, L.J.V.; Best, J.; Prado, I.N.; Martins, E.N.; Kazama, R. Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes níveis de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36. N. 3. 2007. p. 716-726.

MARCHESIN, W.A. **Estudo da produção de gases pela digestibilidade *in vitro* do CAPIM-MARANDU [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF], submetido a intensidades de pastejo**. 2010. 60p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Departamento de Qualidade e Produtividade Animal, São Paulo, 60 p.

MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal Dairy Science**. v. 80. n. 5. 1997. p 1463-1481.

MILLEN, D. D.; ARRIGONI, M. de. B.; LAURITANO, R. D. et al. Manipulação da fermentação ruminal: saúde animal e qualidade do produto final. **Pubvet**. São Paulo. v.1, n.5, 2007, p. 1263-1282.

MORENO, G.M.B.; SILVA SOBRINHO, A.G.; LEÃO, A.G.; LOUREIRO, C.M.B.; Perez, H.L.; ROSSI, R.C. Desempenho, digestibilidade e balanço de nitrogênio em cordeiros alimentados com silagem de milho ou cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39. n. 4. 2010. p. 853-860.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, de. F. P.; LIMA, de. M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA de. S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011 616 p. 193-234, p.

ORSKOV, E. R. Rumen Microorganisms and their Nutrition. In: Protein Nutrition in ruminants. Academic Press LTDA, Second Edition, 1988, 175 p. Citado por: ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNERO, J. da C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA de. S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011, p. 115-147.

OTERO, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas.** 2008. 86p. Dissertação (Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal). Universidade de São Paulo, Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo 2008, 86 p.

QWENS, F. N.; GOETSH, A. L. In: CHURCH, C. D. The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition. New Jersey: Waveland Press. 1993. 564, p. Citado Por: OTERO, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas.** 2008. 86p. Dissertação (Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal). Universidade de São Paulo, Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo 2008, 86 p.

RANSKIN, L. et al. **Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems.** In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A.; ISAACSON, R.E. (Eds). **Gastrointestinal Microbiology: gastrointestinal microbes and host interactions.** New York: Chapman & Hall, International Thompson Publishing, v. 2, 1997. p. 243-298.

RESENDE, de. F. D.; QUEIROZ, de. A. C.; OLIVEIRA, de. J. V. et al. Bovinos Mestiços Alimentados com Diferentes Proporções de Volumoso:Concentrado. 2. Efeito sobre a Ingestão de Nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia.** Viçosa. v. 30. n. 1. 2001. p. 270-279.

RESTLE, J.; FATURI, C.; FILHO, D. C. A. et al. Substituição do Grão de Sorgo por Casca de Soja na Dieta de Novilhos Terminados em Confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia.** Viçosa. v. 33. n. 4. 2004. p. 1009-1015.

SILVA, A. C. C. **Efeito da extrusão termoplástica nas características físico-químicas e nutricionais do rumem bovino e sua aplicação na alimentação humana.** 2008. 178p. Universidade de São Paulo. Tese (Pós graduação em nutrição). Departamento de nutrição. São Paulo 2008. 178 p.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3. Ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2002. 235 p.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science,** v. 70. n. 11. 1992. p. 3562-3577.

SOUZA, N. de. H. **Efeitos de níveis crescentes de fibra em detergente neutro na dieta sobre a fermentação e digestão ruminal em bubalinos e bovinos.** 1999. 115p. Dissertação

(Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Departamento de,Concentração de Qualidade e Produtividade Animal São Paulo 1999, 115 p.

STEWART,C.S.; BRYANT, M.P. The rúmen bactéria. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds). The Rumen Microbial Ecosystem. London: Blackie Academic, v.2, 1997. P. 10-72. Citado por: ARCURI,P.B.; LOPES,F.C.F.; CARNERO, J. da C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI.T.T.; PIRES.A.V.; OLIVEIRA de.S.G. **Nutrição de ruminantes** 2 ed. Jaboticabal: funep, 2011, p. 115-147.

STROBEL, H.J., RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein syntheses by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal Dairy Science.**, v. 69. n. 10. 1986. p. 2947-2959.

TEDESCHI, L.O. et al. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure oh the cornell Net Carboydrate an Protein System. **Journal of Dairy Science**, v. 78. 2000. 1648. P.

TEIXEIRA, J.C. e ANDRADE, G.A. Carboidratos na Alimentação de Ruminantes. Em: **II Simpósio de Forragicultura e Pastagens**. Lavras. Editora UFLA. 2001. p. 165-210.

Universidade Federal de Viçosa – UFV. 1997. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG** (Manual do usuário). Viçosa: UFV. 150 p.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: Comstock Publ. Assoc., 1994. 476p. Citado por: ALVES. S. K.; CARVALHO de. .F. F. R.; VÉRAS. A. S.C. et al. Níveis de Energia em Dietas para Ovinos Santa Inês: Digestibilidade Aparente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.6, 2003, p. 1962-1968.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and nostarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74. n. 12. 1991. p. 3583-3597.

VARGA, G. A.; KONONOFF, P. Diary ration using structural and nonstructural carbohydrates: From theory to practice In: **Southwest Nutrition And Management Conference. Arizona**. 1999. University of Arizona. 1999. p. 77-90.

VIEIRA, P.F.. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG: UFV. 1980. 98 p.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. In: HOBON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds). **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. Ed. London: Blackie Academic, 1997. p. 73-139.

ZAMBON, .M. A.; SANTOS, G. T. dos.; MODESTO, E. C. et al. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Revista Acta Scientiarum**. Maringa. v. 23. n. 4. 2001. p. 937-943.

ZEOULA, L.M.; CALDAS NETO, S.F.; GERON, L.J.V.; MAEDA, E.M. PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M. Substituição do milho pela farinha de varredura de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) em rações de ovinos: consumo, digestibilidade, balanços de nitrogênio e energia e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32. n. 2. 2003. p. 491-502.