



Suplementação energética e proteica de um volumoso de baixa qualidade pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro*

Cássio André Wilbert¹, Ênio Rosa Prates¹, Júlio Otávio Jardim Barcellos¹, Teresa Cristina Moraes Genro², André Luís Finkler da Silveira³, Luciana Fagundes Christofari⁴

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia, Porto Alegre, RS.

² Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

³ Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Pato Branco, PR.

⁴ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Educação Superior Norte RS. Palmeira das Missões, RS.

RESUMO - Um experimento foi conduzido utilizando-se a técnica semiautomática de produção cumulativa de gás *in vitro* com o objetivo de avaliar a combinação da suplementação energética com a proteica em dietas à base de um volumoso de baixa qualidade, feno de capim-tifton (*Cynodon dactylon* L.), com 7,69% de proteína bruta, 70,34% de fibra em detergente neutro e 57,98% de digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. Foram avaliadas duas fontes de proteína degradável no rúmen (ureia ou proteína isolada de soja); quatro níveis de grão de milho moído (0, 20, 40 e 60%) e quatro níveis suplementares de proteína degradável no rúmen (0; 2,8; 5,6 e 8,4%) em delineamento completamente casualizado em um fatorial $2 \times 4 \times 4$. A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica aumentou linearmente em resposta à inclusão de milho com inclinação maior utilizando proteína isolada de soja. O fator de partição foi superior com proteína isolada de soja e foi detectado aumento linear em resposta ao aumento da proteína degradável com 20% de milho. A produção máxima de gás da fração de rápida (A) e de lenta (D) de degradação aumentou linearmente em resposta à inclusão de milho, com proteína isolada de soja, e quadraticamente com ureia. A taxa de degradação de A aumentou com a inclusão de até 20% de milho e a taxa de degradação de D foi maior com ureia. O *lag-time* de A aumentou linearmente em resposta a inclusão de milho e no *lag-time* de D foi observada diminuição com até 20% de milho sem alterações em níveis superiores. A suplementação com até 60% de milho moído foi benéfica para a digestibilidade de dietas com volumoso de baixa qualidade. A associação entre energia e proteína foi benéfica em alguns parâmetros estudados. A ureia gerou melhores respostas em níveis moderados de grão de milho moído.

Palavras-chave: fontes de proteína, milho, proteína isolada de soja, ureia

Energy and protein supplementation of a low quality roughage by the *in vitro* gas cumulative production technique

ABSTRACT - It was conducted an experiment using the semi-automatic *in vitro* cumulative gas production with the objective of evaluating the combination of energy and protein supplementations in diets based on low quality roughage, Tifton hay (*Cynodon dactylon* L.), with 7.69% of crude protein; 70.34% of neutral detergent fiber and 57.98% of organic matter *in vitro* digestibility. It was evaluated two sources of rumen degradable protein (urea or isolated soybean protein); four levels of ground corn grain (0, 20, 40 and 60%) and four supplementary levels of rumen degradable protein (0; 2.8; 5.6 and 8.4%) in complete random design in a $2 \times 4 \times 4$ factorial arrangement. The organic matter *in vitro* digestibility increased linearly in response to grain corn inclusion with a greater slope by using isolated soybean protein. The partitioning factor was higher with isolated soybean protein and it was detected a linear increase in response to increasing rumen degradable protein with 20% of grain corn. The maximum gas production of the fraction of fast (A) and slow (D) degradation increased linearly in response to the grain corn inclusion, with isolated soybean protein, and it quadratically increased with urea. The A degradation rate was increased with inclusion of up to 20% of grain corn and the degradation rate of D was higher with urea. The A *lag-time* increased linearly with the inclusion of grain corn and in the D *lag-time* it was observed a decrease with up to 20% of grain corn unchanged at high levels. The supplementation with up to 60% of grain corn was beneficial to digestibility of diets with low quality roughage. The association between energy and protein supplementation was positive in some studied parameters. Urea gave better responses at moderate levels of ground grain corn.

Key Words: corn, isolated soybean protein, protein sources, urea

Introdução

A suplementação tem como objetivo fornecer nutrientes complementares sem prejuízo à utilização dos nutrientes que podem ser colhidos da forragem. No entanto, a suplementação energética em níveis excessivamente altos pode causar efeitos indesejáveis, diminuindo a utilização e o consumo dos alimentos volumosos (Orskov, 1999), especialmente quando se trata da suplementação com grãos ricos em amido. O efeito de substituição no consumo da forragem pelo concentrado costuma ser o mais frequente com animais consumindo grandes quantidades de forragem de alta digestibilidade (Elizalde et al., 1998; Dixon & Stockdale, 1999), enquanto com forragens de baixa qualidade normalmente ocorre redução na digestão da fração fibrosa da dieta (Van Soest, 1994).

Uma hipótese bastante utilizada para explicar essa diminuição na digestibilidade da forragem de baixa qualidade é a depressão no pH ruminal, o qual, segundo Mould et al. (1983), deve ser mantido acima de 6 para a manutenção da atividade das bactérias ruminais celulolíticas. No entanto, o mais plausível é que a deficiência de nutrientes essenciais, sobretudo nitrogênio, seja o principal causador desse efeito (El-Shazly et al., 1961; Bodine et al., 2000; Medeiros et al., 2008). Além de fornecer adequado nível proteico para contornar os efeitos indesejáveis da suplementação energética, também é importante considerar a fonte de proteína utilizada e em que situações cada uma é mais adequada, pois as bactérias celulolíticas, fermentadoras de carboidratos estruturais, necessitam de amônia (NH₃) como fonte de nitrogênio enquanto as amilolíticas, fermentadoras de carboidratos não estruturais, apesar de terem a capacidade de utilizar nitrogênio amoniacal (N-NH₃), utilizam preferencialmente aminoácidos e peptídeos pré-formados (Russel et al., 1992; Tedeschi et al., 2000; Bach et al., 2005).

Com este trabalho objetivou-se avaliar a combinação da suplementação energética com a suplementação proteica proveniente de duas diferentes fontes de proteína degradável no rúmen (PDR) em dietas baseadas em um

volumoso de baixa qualidade sobre a digestibilidade, eficiência fermentativa e parâmetros de degradação ruminal pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado na EMBRAPA Pecuária Sul – Bagé, Rio Grande do Sul, onde foram estudados, com a técnica semiautomática de produção cumulativa de gás *in vitro*, duas fontes de proteína degradável no rúmen (proteína isolada de soja – PIS ou ureia), quatro níveis de inclusão de grão de milho moído em relação a MS total (0, 20, 40 e 60%) e quatro níveis suplementares de proteína degradável no rúmen (0; 2,8; 5,6 e 8,4%) (Tabela 1). O volumoso utilizado foi feno de capim-tifton (*Cynodon dactylon* L.). Foi assumida degradabilidade da PIS igual a 100%, conforme Knaus et al. (2002).

A produção cumulativa de gás foi medida pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gás, proposta por Maurício et al. (1999). Em cada frasco de vidro, com capacidade para 160 mL, foi incubado 1 g de amostra e adicionados 90 mL de meio de cultura, segundo Theodorou et al. (1994). O meio de cultura foi previamente aquecido, mantido a cerca de 39°C e saturado com gás carbônico (CO₂) por cerca de 15 minutos. Os frascos foram saturados com CO₂ por cerca de 30 segundos, rapidamente fechados com rolhas de borracha e levados a estufa a 39°C até a adição do inóculo, composto por líquido ruminal e fração sólida do conteúdo ruminal na proporção de 1:1, coletado de um bovino macho, fistulado no rúmen, da raça Jersey.

O animal foi mantido em uma área de 0,2 ha com água potável e sal mineral *ad libitum* e pastagem com presença de trevo-branco (*Trifolium repens*), cornichão (*Lotus corniculatus*), capim-quicuio (*Pennisetum clandestinum*, Hochs), capim-anonni 2 (*Eragrostis plana*, Nees) e grama-paulista (*Cynodon dactylon*). Também faziam parte da alimentação cerca de 3 kg de ração comercial (20,07% de PB, 6,77% de GB e 24,15% de FDN) e 4 kg de feno de alfafa (*Medicago sativa*; 23,16% de PB e 50,68% de FDN).

Tabela 1 - Composição bromatológica (% MS) e proteína insolúvel em detergente ácido dos alimentos individuais

	Feno de capim-tifton	Grão de milho moído	Ureia	Proteína isolada de soja
Matéria seca	85,79	86,25	97,06	87,65
Matéria orgânica	92,34	98,73	99,98	95,19
Proteína bruta	7,69	8,92	291,1	91,08
Fibra em detergente neutro ^a	70,34	12,42	-	-
Fibra em detergente ácido	43,93	4,84	-	-
Lignina	9,76	0,75	-	-
PIDA ^b	13,82	-	-	-

^a Livre de cinzas.

^b Proteína insolúvel em detergente ácido.

Foi utilizado transdutor de pressão tipo PDL 200 para mensurar a pressão de gás decorrente da fermentação por 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 e 96 horas após a incubação. Para transformação dos dados de pressão em volume, utilizou a seguinte equação estabelecida no Laboratório de Nutrição Animal da EMBRAPA Pecuária Sul por Velho et al. (2003): $Y = -0,9831 + 4,8533 P + 0,0583 P^2$; em que: Y = volume de gás em mL; P = pressão do gás dentro dos frascos de fermentação, em psi (*pound force per square inch*). Para ajuste dos parâmetros de fermentação, os dados de produção de gás foram ajustados ao modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994): $Y = A(1 + \exp(2 - 4B(x-C)))^{-1} + D(1 + \exp(2 - 4E(x - F)))^{-1}$, em que: Y = produção acumulada de gás no tempo x (mL/g de MO); A e D = produção de gás máxima referente à fração de rápida e de lenta fermentação, respectivamente; B e E = taxas de fermentação da fração A e D, respectivamente; C e F = *lag-time* da fração A e D, respectivamente. Os dados foram ajustados ao modelo usando o *software* Statgraphics 5.1, que utiliza o método iterativo de Marquardt para estimar os parâmetros. O fator de partição (FP) foi determinado segundo Makkar (2004) através do seguinte cálculo: FP = mg MO verdadeiramente degradada/mL de gás nas 96 horas de incubação. Após as 96 horas de incubação, foram adicionados 50 mL de solução de detergente neutro (Goering & Van Soest, 1970) e os frascos foram mantidos em estufa a 90 °C por 16 horas para extração da fibra solúvel em detergente neutro, conforme técnica descrita por Chai & Udén (1998). O resíduo foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado e levado a estufa a 105 °C por 12 horas, pesado e incinerado em mufla a 500 °C por 4 horas, para cálculo da digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO).

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, em fatorial $2 \times 4 \times 4$ (duas fontes de nitrogênio: ureia ou PIS; quatro níveis de inclusão de milho moído: 0, 20, 40 e 60%; e quatro níveis de PDR suplementar: 0; 2,8; 5,6; 8,4) em três períodos experimentais, totalizando três repetições no tempo por tratamento. Observando efeito de fatores que envolvem níveis ou suas interações, foram realizadas análises de regressão linear, quadrática e cúbica. Na interação nível de milho \times nível de proteína, o nível de proteína foi considerado como variável contínua e o nível de milho como variável classificatória e em interações com fonte de PDR, esta foi considerada como variável classificatória e os níveis de milho/PDR como variável contínua e, no caso de haverem duas ou mais regressões lineares, com o PROC GLM (SAS, 1992) foi testada a diferença entre suas inclinações para avaliar estas interações (Kaps & Lamberson, 2004). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias quando não houve

significância para as análises de regressão, comparando todos os níveis de PDR e todos os níveis de milho moído entre si. Quando conveniente para o entendimento dos resultados, foi utilizado o modelo de regressão segmentada de uma inclinação (*broken-lines analysis*) com o procedimento PROC NLIN (SAS, 1992). As demais análises estatísticas foram realizadas através do procedimento GLM do aplicativo computacional SAS versão 8.1 (SAS, 1992). Foram aceitos como significativas as probabilidades de erro menores que 5%.

Resultados e Discussão

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica respondeu de maneira diferente à inclusão de grão de milho moído em função da fonte de PDR ($P < 0,05$; Tabela 2). De acordo com resultados da análise de regressão linear, houve aumento de somente 0,21 pontos percentuais na DIVMO por unidade percentual de milho quando utilizada ureia, ao passo que, quando a PIS foi a fonte de PDR, esse aumento foi de 0,37 ponto percentual, comprovando que a PIS responde de maneira superior ao incremento na inclusão de milho moído na dieta ($P < 0,05$; Figura 1). Entretanto, foi observada melhor resposta utilizando ureia do que utilizando PIS, em níveis de inclusão de milho inferiores a cerca de 30%, ocorrendo o contrário em níveis superiores ($P < 0,05$).

Esse comportamento evidencia que há melhor resposta ao nitrogênio não-proteico (NNP) quando há menor população microbiana ruminal amilolítica, entretanto, o fornecimento de aminoácidos e peptídeos é essencial para aumentar a digestibilidade quando há maior utilização de amido. Isso ocorre porque os microrganismos amilolíticos, apesar de sua capacidade de utilizar N-NH₃, retiram cerca de dois terços do seu nitrogênio de peptídeos ou aminoácidos, enquanto aqueles que degradam carboidratos estruturais têm necessidade de N-NH₃ como fonte de nitrogênio (Russel et al., 1992; Tedeschi et al., 2000; Bach et al., 2005).

Essa teoria foi comprovada por experimento *in vitro* de Oh et al. (1999), porém esses autores não obtiveram embasamento para essa teoria em experimento *in situ*, pois observaram, com a suplementação de 200 g de amido a ovinos, que a caseína aumentou a síntese de proteína microbiana, porém, utilizando 500 g de amido, houve igual incremento utilizando ureia ou caseína. Griswold et al. (2003) trabalharam com dois níveis de suplementação com PDR (8 e 11%) contendo ou não ureia e sugeriram que bactérias hemicelulolíticas podem ter a habilidade de competir com as bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais por peptídeos e aminoácidos quando o nitrogênio for limitante.

Tabela 2 - Valores médios da digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica e do fator de partição em função dos tratamentos avaliados

Grão de milho (%)	PDR (%)	DIVMO (%)		Fonte de proteína (mg de MO degradada/mL gás)	
		Fonte PDR		Fonte PDR	
		Ureia	PIS	Ureia	PIS
0	0	57,98	57,98	5,33	5,33
	2,8	62,48	55,01	5,14	6,06
	5,6	62,16	56,93	5,46	5,81
	8,4	61,37	55,54	5,51	5,69
20	0	64,32	64,32	4,30	4,30
	2,8	66,69	63,53	5,12	5,10
	5,6	64,59	61,71	5,02	5,08
	8,4	65,13	64,95	5,22	5,43
40	0	67,84	67,84	4,83	4,83
	2,8	69,33	68,60	4,56	4,44
	5,6	67,32	70,20	4,28	4,62
	8,4	71,29	71,60	4,48	4,35
60	0	75,87	75,87	4,19	4,19
	2,8	74,34	79,93	3,71	4,54
	5,6	72,78	80,09	4,17	4,15
	8,4	72,16	79,61	4,17	4,34
Média		67,23	67,11	4,68b	4,93a
CV (%)		6,60	14,84	12,77	13,61

Fontes variação significativa (P<0,05)

MM x Ft

MM x PDR

Ft

DIVMO = digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. FP = fator de partição. PDR = proteína degradável no rúmen. PIS = proteína isolada de soja. MM x Ft = interação entre inclusão de milho moído e fonte de PDR; MM x PDR = interação entre inclusão de milho moído e PDR suplementar; Ft = fonte de PDR. CV = coeficiente de variação. ^{a,b} Médias na mesma linha com letras diferentes diferem entre si pela análise da variância a 5% de significância.

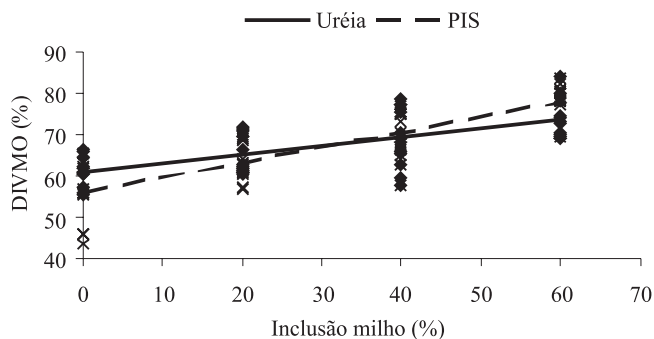


Figura 1 - Interação entre a inclusão de grão de milho moído (%) e a fonte de proteína degradável no rúmen na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO, %). Ureia: $y = 60,908 + 0,2107x$ ($r^2 = 0,4752$); PIS: $y = 56,088 + 0,3673x$ ($r^2 = 0,6945$).

Em experimento *in vitro*, Griswold et al. (1996) observaram que há deficiência de aminoácidos quando suplementa somente com ureia. Esses autores verificaram maior incremento na digestibilidade da FDA utilizando proteína verdadeira do que ureia. Essa diferença desapareceu após o acréscimo de aminoácidos ao tratamento com NNP.

Segundo Dixon & Chanchai (2000), microrganismos digerindo alimentos deficientes em nitrogênio são mais dependentes de $N-NH_3$ do que aqueles que digerem alimentos com maior teor proteico. Entretanto, deve ser levado em

conta que, apesar do grão de milho utilizado apresentar somente 8,92% de PB em sua composição, segundo o NRC (2001) o grão de milho moído possui somente cerca de 0,3% desse total insolúvel em detergente ácido, ao passo que o feno incubado apresentou 7,69% de PB e 1,05% de PIDA, a qual é indigestível. Dessa forma, à medida que aumentou a inclusão de milho, também aumentou o teor de proteína potencialmente aproveitável, contribuindo para a explicação do resultado observado.

É necessário correlacionar a produção cumulativa de gás com o desaparecimento de substrato incubado para uma correta interpretação dos dados, pois a produção de gás indica somente como o substrato é utilizado para produzir gás e ácidos graxos voláteis (AGV), enquanto o desaparecimento do substrato indica sua disponibilidade para a fermentação (Freitas, 2001). O fator de partição (FP) integra essas duas medidas e é indicativo da eficiência fermentativa.

A utilização de PIS levou a FP médio superior ao observado do que com ureia (4,93 versus 4,68 mg MO degradada/mL gás produzido; $P < 0,05$; Tabela 2) devido à sua menor produção de gás utilizando essa fonte de PDR, já que a DIVMO das duas fontes foi bastante semelhante (67,23 e 67,11% para ureia e PIS, respectivamente) e indica maior eficiência fermentativa, com menores perdas por gás utilizando PIS.

A interação entre inclusão de milho moído e PDR suplementar influenciou o FP ($P < 0,05$; Tabela 2). Com 20% de milho houve aumento linear no FP ($P < 0,05$; Figura 2) em resposta à PDR suplementar. Nos demais níveis de milho não foram detectados efeitos. Esses resultados evidenciam que a suplementação com PDR associada a níveis moderados de carboidratos rapidamente fermentáveis pode ser benéfica para a fermentação ruminal em dietas baseadas em volumosos de baixa qualidade e concordam com a teoria inicialmente proposta por El-Shazly et al. (1961) de que os efeitos associativos negativos decorrentes do uso de suplementação com carboidratos rapidamente fermentáveis sejam causados por uma deficiência de nitrogênio e não de uma depressão no pH ruminal, desde que em níveis não excessivos.

Houve maior produção de gás com a fermentação da fração rapidamente degradável que com a fermentação da fração de lenta degradação do material incubado, tanto com PIS (86,97 *versus* 39,00 mL/g de MO; $P < 0,05$; Tabela 3) quanto com ureia (76,66 *versus* 50,87 mL/g de MO; $P < 0,05$; Tabela 3). Esse resultado está de acordo com trabalho de Getachew et al. (2004), contrariando a tese de que a fração fibrosa do alimento, por proporcionar maior relação acetato:propionato, liberaria mais gás por sua menor eficiência fermentativa e pelas maiores perdas por dióxido de carbono e metano (Cheeke, 1991).

Enquanto com 20 e 60% de milho foi observada resposta quadrática do parâmetro A para o acréscimo na PDR suplementar ($P < 0,05$; Figura 3), sem a inclusão de milho moído, a resposta foi linear ($P < 0,05$), com aumento de 2,20 mL/% a mais de PDR. Com 40% de milho não foi observado efeito significativo.

O aumento linear no parâmetro A sem a inclusão de milho indica aumento na fermentação dessa fração em

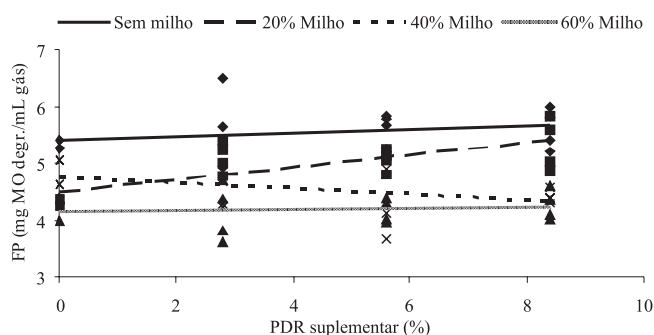


Figura 2 - Efeito da interação entre inclusão de grão de milho moído (%) e PDR suplementar (%) sobre o fator de partição (FP, mg MO degradada/mL gás produzido). Sem milho: $y = 5,54$; 20% milho: $y = 4,4932 + 0,108x$ ($r^2 = 0,5424$); 40% milho: $y = 4,55$; 60% milho: $y = 4,18$.

resposta à PDR suplementar, contrariando os trabalhos de Cone & Van Gelder (1999) e Getachew et al. (2004), que demonstraram haver correlação negativa entre produção de gás e proteína incubada. Provavelmente, devido à falta de carboidratos rapidamente fermentáveis para a síntese de proteína microbiana, com a suplementação com PDR, ocorrem mais perdas por gases indesejáveis como o CO_2 e o CH_4 .

A resposta quadrática com 20 e 60% de milho indica diminuição na fermentação em níveis maiores de PDR e pode estar relacionada com a existência de bacteriocinas, que são compostos liberados por determinadas categorias de microrganismos com o objetivo de inibir o crescimento de outros microrganismos, levando ao aparecimento do chamado efeito proteína, descrito por Costa et al. (2008). Esse mesmo efeito pode ser responsável pelo comportamento quadrático observado no parâmetro D quando foi utilizada ureia (Figura 4). Entretanto, esse comportamento pode ser explicado por excessiva produção de NH_3 , que é tóxica para os microrganismos ruminais quando em níveis altos, com consequente diminuição da fermentação.

Houve acréscimo linear quando foi utilizada PIS, em resposta ao aumento na inclusão de milho moído, sobre o parâmetro A ($P < 0,05$; Figura 5). Este resultado indica que, com a utilização de proteína verdadeira, há maior fermentação da fração rapidamente degradável à medida que aumenta a inclusão de suplementação energética baseada em grão rico em amido. Com a utilização de ureia o comportamento foi quadrático ($P < 0,05$) com as menores produções de gás nos níveis intermediários de suplementação com milho. Esse comportamento discorda da hipótese inicial de que haveria melhora na fermentação com níveis intermediários de milho moído com ureia suplementar, comportamento observado no parâmetro D, pois nesse caso haveria adequado aporte de energia associado a uma quantidade satisfatória de nitrogênio.

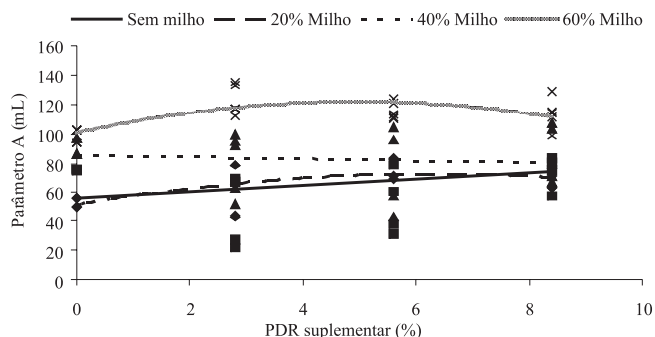
Sobre a fração de lenta fermentação foi observado efeito semelhante utilizando PIS ($P < 0,05$; Figura 6), com inclinação inferior. Com a utilização de ureia, foi detectado efeito quadrático ($P < 0,05$; Figura 6) com máxima produção de gás no nível de 30% de milho, indicando que, quando NNP é a fonte de PDR, em níveis excessivamente altos de inclusão de grãos ricos em amido, a fermentação é limitada, devido à falta de aminoácidos e peptídeos necessários para a manutenção da atividade das bactérias amilolíticas. A maior resposta à suplementação com NNP nos níveis intermediários de utilização de milho, provavelmente se deve ao fato de ainda haver população microbiana celulolítica considerável, portanto, havendo necessidade maior por N-NH_3 como fonte de nitrogênio, especialmente considerando que se trata da fração mais fibrosa do alimento.

Tabela 3 - Efeito da fonte de proteína degradável no rúmen, inclusão de grão de milho e nível de proteína degradável suplementar sobre os parâmetros de degradação

Fonte	Grão de milho (%)	PDR (%)	Parâmetro					
			A (mL)	B (%/h)	C (h)	D (mL)	E (%/h)	F (h)
Ureia	0	0	52,71	2,90	4,68	40,73	1,83	41,94
		2,8	74,26	2,31	6,32	43,37	1,83	34,76
		5,6	82,94	2,22	5,03	32,59	1,86	49,59
		8,4	63,56	2,73	4,92	34,38	2,56	43,99
	20	0	75,19	3,95	6,14	46,21	1,74	37,10
		2,8	24,64	6,08	3,79	92,67	2,17	17,55
		5,6	34,79	5,96	4,87	84,24	1,90	26,64
		8,4	81,67	3,63	6,84	34,77	2,04	33,03
	40	0	91,16	4,99	6,88	43,03	2,04	28,43
		2,8	57,27	4,90	5,37	76,68	2,34	24,95
		5,6	50,08	4,82	5,33	84,34	2,29	22,94
		8,4	68,64	4,25	7,17	49,68	2,20	25,12
	60	0	98,29	4,57	5,97	46,85	2,33	33,25
		2,8	134,58	4,31	7,62	45,57	2,34	30,43
		5,6	116,83	5,67	7,45	36,85	2,29	26,35
		8,4	121,09	6,05	7,79	21,91	2,07	27,84
Média			76,66	4,33	6,03	50,87	2,11a	31,00
CV (%)			39,03	31,67	26,33	39,98	16,52	35,26
PIS	0	0	52,71	2,90	4,68	40,73	1,83	41,94
		2,8	43,90	2,92	4,91	35,94	2,03	38,93
		5,6	70,27	2,63	5,68	18,85	1,75	57,17
		8,4	73,25	2,66	4,28	15,39	1,95	55,90
	20	0	75,19	3,95	6,14	46,21	1,74	37,10
		2,8	68,10	3,15	4,47	34,85	1,84	38,97
		5,6	69,37	4,44	5,41	46,10	1,75	31,57
		8,4	65,93	5,06	5,92	39,60	1,73	25,15
	40	0	91,16	4,99	6,88	43,03	2,04	28,43
		2,8	95,33	4,55	6,49	40,62	1,91	31,43
		5,6	100,46	4,96	5,63	34,83	2,02	27,43
		8,4	105,61	4,73	4,68	40,01	1,86	27,59
	60	0	98,29	4,57	5,97	46,85	2,33	33,25
		2,8	115,48	4,82	5,69	44,55	2,34	29,12
		5,6	115,14	4,70	6,49	44,67	2,09	30,51
		8,4	108,20	4,98	6,42	51,83	2,04	26,40
Média			86,97	4,12	5,61	39,00	1,96b	34,91
CV (%)			26,08	27,21	23,60	27,24	13,91	36,02
Fontes de variação significativas (P<0,05)			MM × PDR MM × Ft	MM	MM	PDR × Ft MM × Ft	M × PDR Ft	MM

Parâmetros de degradação: A e D = produção de gás máxima referente à fração de rápida e de lenta fermentação, respectivamente; B e E = taxas de fermentação da fração A e D, respectivamente; C e F = lag-time da fração A e D, respectivamente. PDR = proteína degradável no rúmen. PIS = proteína isolada de soja. Ft = fonte de PDR; MM = inclusão de milho moído; MM × PDR = interação entre inclusão de milho moído e nível de PDR suplementar; MM × Ft = interação entre inclusão de milho moído e fonte de PDR; PDR × Ft = interação entre PDR suplementar e fonte de PDR. CV = coeficiente de variação.

^{a,b} Médias na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pela análise da variância a 5% de significância.



Sem milho: $y = 55,743 + 2,197x$ ($r^2 = 0,2785$); 20% milho: $y = 51,182 + 6,7031x - 0,5323x^2$ ($r^2 = 0,3857$); 40% milho: $y = 83,22$; 60% milho: $y = 100,57 + 8,4927x - 0,8558x^2$ ($r^2 = 0,4266$).

Figura 3 - Efeito da interação entre inclusão de grão de milho moído (%) e PDR suplementar (%) sobre a produção máxima de gás referente à fração de rápida fermentação (parâmetro A, mL).

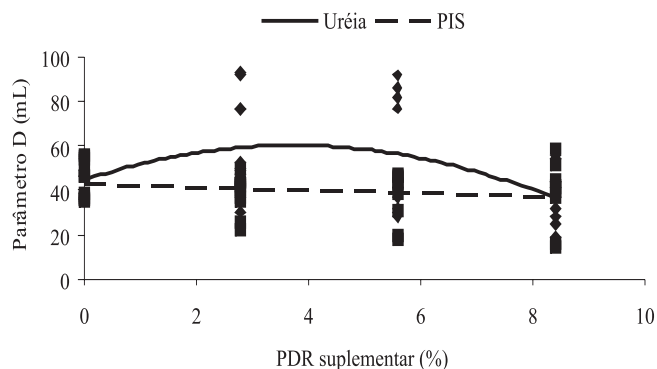
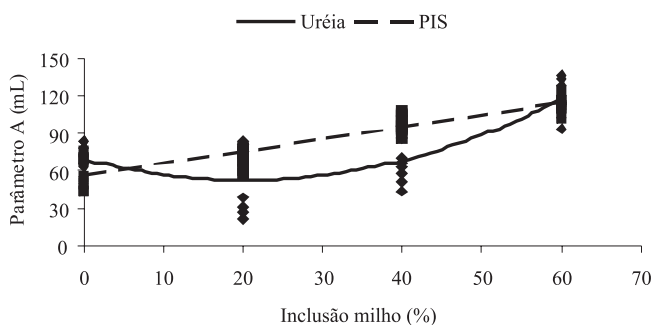
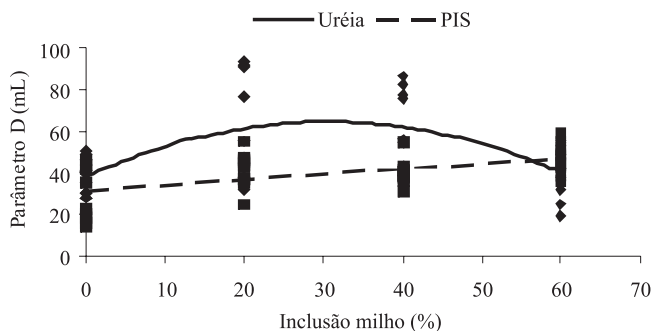


Figura 4 - Efeito da interação entre PDR suplementar (%) e fonte de PDR sobre a produção máxima de gás referente à fração de lenta fermentação (parâmetro D, mL). Ureia: $y = 45,009 + 7,9589x - 1,0656x^2$ ($r^2 = 0,1929$); PIS: $y = 39,92$.



Ureia: $y = 69,49 - 1,6727x + 0,0411x^2$ ($r^2 = 0,6568$); PIS: $y = 57,036 + 0,9423x$ ($r^2 = 0,8451$).

Figura 5 - Efeito da interação entre inclusão de grão de milho moído (%) e fonte de PDR sobre a produção máxima de gás referente à fração de rápida fermentação (parâmetro A, mL).



Ureia: $y = 38,107 + 1,7332x - 0,0283x^2$ ($r^2 = 0,3213$); PIS: $y = 31,449 + 0,2631x$ ($r^2 = 0,3172$).

Figura 6 - Efeito da interação entre inclusão de grão de milho moído (%) e fonte de PDR sobre a produção máxima de gás referente à fração de lenta fermentação (parâmetro D, mL).

A taxa de degradação da fração de lenta degradação (parâmetro E) foi influenciada pela interação entre inclusão de grão de milho moído e PDR suplementar ($P < 0,05$; Tabela 4). No maior nível de inclusão de milho, sem a presença de PDR suplementar, houve maior taxa de degradação da fração

Tabela 4 - Efeito da inclusão de grão de milho e proteína degradável no rúmen sobre a taxa de degradação da fração de lenta fermentação (parâmetro E, %/h)

PDR (%)	Inclusão Milho (%)			
	0	20	40	60
0	1,83Bb	1,74Ba	2,04ABa	2,33Aa
2,8	1,93Aab	2,01Aa	2,13Aa	2,34Aa
5,6	1,83Ab	1,83Aa	2,16Aa	2,19Aa
8,4	2,37Aa	1,88Aa	2,03Aa	2,06Aa
CV (%)	20,90	12,69	10,07	13,81

PDR = proteína degradável no rúmen. CV = coeficiente de variação. A,B,a,b Médias na mesma coluna com letras minúsculas diferentes e nas linhas, com letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

lentamente degradável, do que sem ou com 20% de milho. Também a taxa de degradação desta mesma fração no maior nível de suplementação com PDR foi maior que na ausência ou com 5,6% de PDR suplementar quando não foi incluído milho no substrato incubado.

O comportamento observado sem a inclusão de milho indica que a suplementação com PDR pode aumentar a degradação da fibra, pois disponibiliza maior concentração de NH_3 disponível para os microrganismos ruminais fibrolíticos.

A maior taxa de degradação observada no maior nível de milho moído, em comparação à ausência ou à adição de 20% milho, sem a utilização de PDR suplementar, contraria diversos trabalhos (Horn & McCollun, 1987; Moore et al., 1999; Medeiros, 2004) em que níveis excessivos de amido conduziram à menor aproveitamento do volumoso, sobretudo da sua fração fibrosa além de, segundo Dewhurst et al. (2000), aumentarem as exigências microbianas por nitrogênio, aminoácidos e peptídeos agravando ainda mais a deficiência dos microrganismos ruminais por esses componentes. Seguindo essa teoria, esse comportamento deveria ser observado nas combinações onde houvesse PDR suplementar, pois a ureia ou PIS aportariam nitrogênio enquanto o grão de milho seria uma fonte de energia prontamente digestível, necessária para a síntese de proteína microbiana (Henderickx, 1976).

Utilizando ureia, a taxa de degradação da fração de lenta fermentação (parâmetro E) foi 7% superior do que utilizando PIS como fonte de PDR (2,11 versus 1,96%/h; $P < 0,05$; Tabela 3), e deve-se ao fato de que, tratando-se da fração de lenta degradação, a degradação é realizada por microrganismos fermentadores de carboidratos estruturais, os quais necessitam de NH_3 como fonte de nitrogênio (Russel et al., 1992). A ureia é completamente desaminada em NH_3 durante a fermentação ruminal, o que não ocorre com a PIS, porém esta contém também aminoácidos e peptídeos pré-formados, essenciais para outras categorias de microrganismos ruminais (Bach et al., 2005).

A inclusão de milho moído influenciou ($P < 0,05$) a taxa de degradação da fração de rápida fermentação (parâmetro B) e o tempo de colonização da fração de rápida (parâmetro C) e de lenta fermentação (parâmetro F). Entretanto, enquanto nos parâmetros B e F foi observado comportamento quadrático ($P < 0,05$; Figuras 7 e 9), no parâmetro C foi observado aumento linear ($P < 0,05$; Figura 8).

A análise de regressão demonstrou que máxima taxa de degradação da fração rapidamente fermentável foi observada quando houve nível de inclusão de milho de cerca de 40% em relação a MS total incubada, com redução em níveis superiores a este. No entanto, a partir de 20% de

milho, observou-se que praticamente não houve alteração na taxa de degradação, o que levou à análise dos dados com o método de *broken-lines* para uma melhor interpretação dos resultados. Utilizando esta metodologia de análise, foi comprovado que a suspeita inicial estava correta, pois houve aumento na taxa de degradação da fração de rápida degradação com até 20% de milho, quando houve taxa de degradação de 4,73%/h, não havendo alteração em níveis superiores (Figura 7).

Este resultado demonstra que a suplementação com uma fonte de carboidratos rapidamente fermentáveis foi benéfica para a taxa de degradação da fração rapidamente fermentável, com incremento marcado até o menor nível de inclusão de milho utilizado neste trabalho sem que níveis superiores provocassem efeitos associativos negativos. Entretanto, Medeiros et al. (2008), em trabalho *in situ*, observaram uma resposta positiva à utilização de suplemento energético, desde que em níveis moderados, havendo efeito negativo sobre a taxa de degradação, mesmo da fração de rápida degradação da MO, em níveis excessivos de milho.

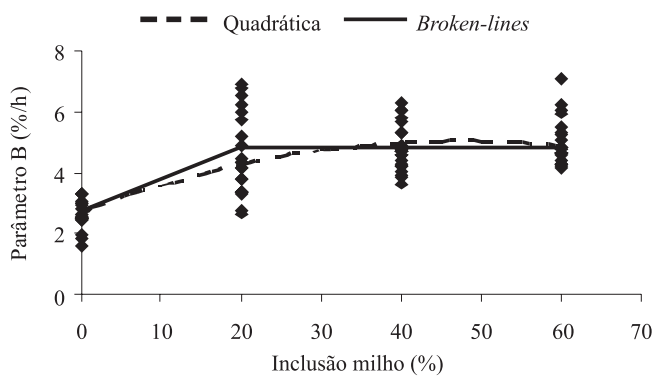


Figura 7 - Efeito da inclusão de grão de milho moído (%) sobre a taxa de degradação da fração de lenta fermentação (parâmetro B, %/h). $y = 2,7097 + 0,0975x - 0,001x^2$ ($r^2 = 0,5098$); Ponto de quebra: $x = 20$.

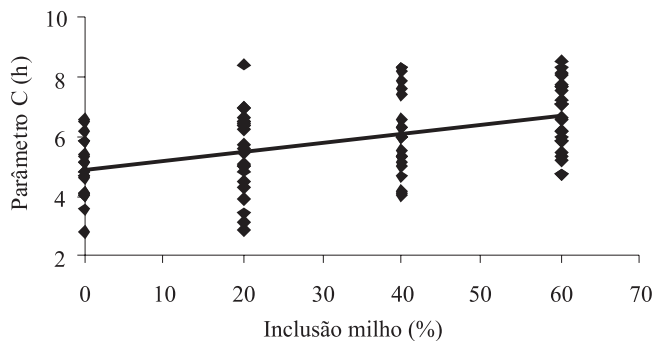


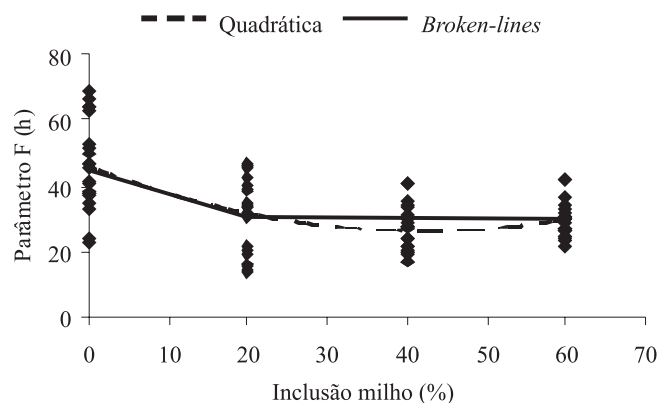
Figura 8 - Efeito da inclusão de grão de milho moído (%) sobre o tempo de colonização da fração de rápida fermentação (parâmetro C, h).

Já em relação à FDN, que pode ser considerada a fração de lenta degradação da MO incubada, Heldt et al. (1999) concluíram que níveis moderados de suplementação com amido podem ser benéficos para a digestibilidade da FDN, enquanto níveis excessivos conduzem a diminuição na digestibilidade da fibra. Provavelmente isso ocorra devido ao acréscimo no substrato e na taxa de crescimento das bactérias associadas à fase líquida (Dewhurst et al., 2000).

A não ocorrência de efeitos negativos em decorrência da utilização de grandes níveis de milho, no presente trabalho, pode estar associada ao fato, já comentado, de que o grão de milho, mesmo possuindo somente 8,92% de PB aporta mais proteína ao substrato à medida que é aumentada sua inclusão. O fato de ter sido utilizado feno contendo mais de 7% de PB, nível crítico para a manutenção da atividade ruminal, segundo Van Soest (1994) também pode ter influenciado os resultados, pois assim o milho moído forneceu energia para os microrganismos ruminais, essencial para o seu crescimento, em uma condição em que havia um aporte satisfatório de nitrogênio.

O aumento linear do parâmetro C em resposta ao incremento de milho, que aumentou em 32% o tempo de colonização da fração de rápida degradação demonstra que o suplemento energético modificou o ambiente de incubação, retardando o início da degradação do substrato. Entretanto, com maior suplementação com amido, a população amilolítica deveria ter crescimento maior e mais rápido, iniciando antes a degradação da fração rapidamente degradável, o que discorda do resultado observado.

Na taxa de degradação da fração lentamente degradável (parâmetro F) houve diminuição rápida em resposta aos níveis intermediários de inclusão de milho estudados, com



$y = 45,673 - 0,9241x + 0,011x^2$ ($r^2 = 0,363$); Ponto de quebra: $x = 20,18$. $y = 4,8873 + 0,0296x$ ($r^2 = 0,2284$).

Figura 9 - Efeito da inclusão de grão de milho moído (%) sobre o tempo de colonização da fração de lenta fermentação (parâmetro F, h).

o menor *lag-time* sendo observado com 40% de milho, e discreto incremento em níveis superiores a este. Entretanto, a exemplo do que ocorreu no parâmetro B foi observado que em inclusões de milho superiores a 20% praticamente não houve alterações no tempo de colonização e, por isso, aplicou-se o método de *broken-lines* para complementar a análise dos resultados do parâmetro F. Utilizando este método de análise, a interpretação dos resultados deve ser diferente. É possível notar que em inclusões de milho superiores a 20,18%, quando o *lag-time* foi de 29,19 horas, não houve alterações no tempo de colonização (Figura 9). A não ocorrência de efeitos associativos negativos nos maiores níveis de suplementação com milho sobre este parâmetro pode ser justificada pelo fato de, possivelmente, haver quantidade satisfatória de nitrogênio com a fermentação do volumoso incubado e um incremento nesse nutriente com a inclusão de milho, sem que a quantidade de amido presente no meio aumentasse consideravelmente as exigências por nitrogênio. Além disso, o milho moído atuou como importante fonte de carboidratos rapidamente fermentáveis, essenciais para o crescimento microbiano.

Conclusões

A digestibilidade de volumosos de baixa qualidade responde melhor à suplementação energética em níveis mais altos (60% de inclusão de milho). Entretanto, quando há suplementação proteica, as melhores respostas são obtidas com até 40% de grão de milho. Populações microbianas ruminais diferentes necessitam de distintas fontes de nitrogênio: em dietas com mais amido, há melhor resposta com proteína verdadeira que com nitrogênio não-proteico.

Referências

- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88 (Suppl. 1), p.E9-E21, 2005.
- BODINE, T.N.; PURVIS II, H.T.; ACKERMAN, C.J. et al. Effects of supplementing prairie hay with corn and soybean meal on intake, digestion, and ruminal measurements by beef steers. **Journal of Animal Science**, v.78, n.12, p.3144-3154, 2000.
- CHAI, W.; UDÉN, P. An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v.74, n.4, p.281-288, 1998.
- CHEEKE, P.R. Feed additives. In: CHEEKE, P.R. (Ed.). **Applied animal nutrition: feeds and feeding**. New York: MacMillan, 1991. 504p.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H. Influence of protein fermentation on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, n.3-4, p.251-264, 1999.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradação da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, 2008.
- DEWHURST, R.J.; DAVIES, D.R.; MERRY, R.J. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.85, n.1-2, p.1-21, 2000.
- DIXON, R.M.; CHANCHAI, S. Colonization and source of N substrates used by microorganisms digesting forages incubated in synthetic fibre bags in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, n.3, p.261-272, 2000.
- DIXON, R.M.; STOCKDALE, C.R. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.5, p.18, 1999.
- ELIZALDE, J.C.; CREMIN, J.D.; FAULKNER, D.B. et al. Performance and digestion by steers grazing tall fescue and supplement with energy and protein. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.1691-1701, 1998.
- 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, n.2, p.268-273, 1961.
- FREITAS, T.S. **Avaliação de misturas de volumosos de baixa qualidade com concentrados pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro***. 2001. 132f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GETACHEW, G.; ROBINSON, P.H.; DEPETERS, E.J. et al. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, n.4, p.57-71, 2004.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analyses** (apparatus reagents, procedures, and some applications). Washington, 1970. 20p. (Agricultural Handbook, 379).
- GRISWOLD, K.E.; APGAR, G.A.; BOUTON, J. et al. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v.81, n.2, p.329-336, 2003.
- GRISWOLD, K.E.; HOOVER, W.H.; MILLER, T.K. et al. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v.74, n.3, p.483-491, 1996.
- HELDT, J.S.; COCHRAN, R.C.; STOKKA, G.L. et al. Effects of different supplemental sugars and starch fed in combination with degradable intake protein on low-quality forage use by beef steers. **Journal of Animal Science**, v.77, n.10, p.2793-2802, 1999.
- HENDERICKX, H.K. Quantitative aspects of the use of non-protein nitrogen in ruminant feeding. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.10, p.1-18, 1976.
- HORN, G.W.; MCCOLLUN, F.T. Energy supplementation of grazing ruminants. In: GRAZING LIVESTOCK NUTRITION CONFERENCE, 1987, Jackson. **Proceedings...** Jackson: 1987. p.125-136.
- KAPS, M.; LAMBERSON, W. **Biostatistics for animal science**. Oxfordshire: CABI. 2004. 444p.
- KNAUS, W.F.; BEERMANN, D.H.; TEDESCHI, L.O. et al. Effects of urea, isolated soybean protein and blood meal on growing steers fed a corn-based diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.102, n.4, p.3-14, 2002.
- MAKKAR, H.P.S. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: **Assessing quality and safety of animal feeds**. Rome: FAO Animal Production and Health Series 160. 2004. p.55-88.

- MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.
- MEDEIROS, F.S. **Avaliação nutricional da suplementação de feno com níveis crescentes de milho em dietas não limitantes em proteína degradável no rúmen**. 2004. 137f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MEDEIROS, F.S.; PATINO, H.O.; SILVEIRA, A.L.F. et al. Efeitos associativos da energia em dietas não limitantes em proteína degradável no rúmen. **Archivos de Zootecnia**, v.57, n.218, p.190, 2008.
- MOORE, J.E.; BRANT, M.H.; KUNKLE, W.E. et al. Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. **Journal of Animal Science**, v.77, suppl. 2, p.122-135, 1999.
- MOULD, F.; ØRSKOV, E.R.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. 2. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, n.1, p.15-30, 1983.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, 2001. 408p.
- OH, Y.G.; KIM, K.H.; KIM, J.J. et al. The effect of the form of nitrogen in the diet on rumen fermentation and the yield of microbial protein in sheep consuming diets of grass silage supplemented with starch or sucrose. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, n.3-4, p.227-237, 1999.
- ØRSKOV, E.R. Supplement strategies for ruminants and management of feeding to maximize utilization of roughages. **Preventive Veterinary Medicine**, v.38, n.7, p.179-185, 1999.
- 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, n.11, p.3351-3561, 1992.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide: Statistics**. Cary: SAS Institute Inc., 1992. 842p.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Animal Science**, v.78, n.6, p.1648-1658, 2000.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.3-4, p.185-197, 1994.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VELHO, J.P.; SILVEIRA, V.C.P.; GENRO, T.C.M. et al. Determinação da relação entre pressão e volume para estabelecimento da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases no Laboratório de Nutrição Animal da EMBRAPA Pecuária Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. (CDROM).