

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

MARIANNA PELICIONI FARIA BATISTA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES RELAÇÕES  
VOLUMOSO:CONCENTRADO SOBRE A MICROBIOTA RUMINAL E  
PARAMETROS FERMENTATIVOS *IN VITRO*

ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO  
2023

MARIANNA PELICIONI FARIA BATISTA

AVAIÇÃO DE DIFERENTES RELAÇÕES  
VOLUOSO:CONCENTRADO SOBRE A MICROBIOTA RUMINAL E  
PARAMETROS FERMENTATIVOS *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Túlio Almeida

ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO  
2023

MARIANNA PELICIONI FARIA BATISTA

AVAIÇÃO DE DIFERENTES RELAÇÕES  
VOLUMOSO:CONCENTRADO SOBRE A MICROBIOTA RUMINAL E  
PARAMETROS FERMENTATIVOS IN VITRO

Trabalho de conclusão de curso apresentado Departamento de Zootecnia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do do  
título de Bacharel em zootecnia

Aprovado em ..... de ..... de .....

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

---

Zootecnista Diego Casagrande Pravato  
Serviço Nacional de Aprendizagem Rural - Senar

---

Profa. Dra. Roberta de Lima Valença  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

## RESUMO

O aumento exponencial da população mundial traz por consequência o aumento na demanda de alimentos, onde produtos de origem animal assumem grande importância, sendo assim, aumentar a eficiência de produção desses alimentos se torna indispensável para atender esta demanda. A relação volumoso:concentrado na dieta de animais ruminantes, é um dos principais fatores capazes de manipular a fermentação ruminal, podendo melhorar a eficiência de utilização dos alimentos, e por consequência melhorar o desempenho animal, trazendo maior retorno econômico ao produtor. O presente trabalho objetivou avaliar os principais parâmetros de fermentação ruminal, como nitrogênio amoniacal, pH, produção de gases, assim como impacto na população de protozoários, utilizando a técnica de incubação *in vitro*. Para isto foram utilizadas dietas contendo 0, 20, 40, 50, 60, 80, e 100% de concentrado, com níveis decrescentes de utilização de ureia. Após a realização das análises foi observado maiores concentrações de nitrogênio amoniacal para as dietas com maior nível de nitrogênio não proteico, ou maior nível de proteína verdadeira (dietas contendo 20 e 80% de concentrado). A produção de gases, assim como pH apresentaram uma relação direta com o nível de concentrado, onde quanto menor a relação volumoso concentrado, menor é o pH e maior é a produção de gases. Em conclusão, o tratamento contendo 20% de volumoso e 80% concentrado apresentou melhor desempenho nos parâmetros analisados, sendo nitrogênio amoniacal, produção de gases, pH, onde o mesmo não configurou acidose. Assim como, ficou evidente o impacto da ausência de sincronismo de degradação sobre o desempenho ruminal, através dos tratamentos contendo 100% volumoso e 100% concentrado.

**Palavras-chave:** Microbiota; Ruminantes; Eficiência alimentar; Fermentação.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Caracterização ruminal	3
2.2	Microbiota ruminal	3
2.2.1	Bactérias	4
2.2.2	Protozoários	6
2.2.3	Fungos	8
2.3	Saúde ruminal	8
2.3.1	Anaerobiose	8
2.3.2	Temperatura	8
2.3.3	pH	9
2.3.4	N-NH <sub>3</sub> ruminal	10
2.4	Produtos da fermentação ruminal	11
2.5	Sincronismo de degradação e síntese de proteína microbiana	12
3.	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.	RESULTADO E DISCUSSÃO	18
5.	CONCLUSÃO	30
6.	REFERÊNCIAS	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais e fermentativas de algumas principais espécies bacterianas ruminais.....	6
Tabela 2. Porcentagem de inclusão de ingredientes nas dietas experimentais.....	14
Tabela 3. Nutrientes fornecidos nas diferentes dietas experimentais.....	15
Tabela 4 Parâmetros fermentativos ruminais <i>in vitro</i> de diferentes relações volumoso:concentrado em dietas para ovinos.....	18
Tabela 5. Comportamento dos protozoários frente a diferentes relações volumoso:concentrado em dietas para ovinos.....	26

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Grupos de bactérias em função da sua estratégia nutricional.....	5
Quadro 2. Efeitos benéficos e adversos da presença de protozoários no rúmen.....	7
Quadro 3. Escala para avaliação da mortalidade protozoários.....	16

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características estruturais da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	4
Figura 2. Fatores que afetam a síntese microbiana.....	13
Figura 3. Valores médios de pH durante nos diferentes tempos de incubação.....	19
Figura 4. Concentrações médias de amônia (mg/dl) no líquido ruminal em diferentes tempos de incubação.....	21
Figura 5. Volume de gás produzido (mL/g) nos diferentes tempos de incubação.....	25
Figura 6. Mortalidade de protozoários em horas distintas de incubação.....	27
Figura 7. Mortalidade de protozoários em horas distintas de incubação.....	36
Figura 8. Motilidade de pequenos protozoários em horas distintas de incubação.....	36



## 1. INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) desempenham um importante papel produtivo, econômico e social em várias partes do mundo (Carvalho, et al., 2005). No Brasil, o efetivo fica em torno de 21,5 milhões de cabeças (IBGE, 2022). Contudo, devido ao crescente aumento da população, e conseqüente aumento da necessidade de alimentos, no qual a proteína de origem animal assume grande importância, aumentar a eficiência de produção de alimentos se torna indispensável para atender esta demanda.

Assim, com o intuito de aumentar a produção e produtividade, muitas propriedades têm adotado o sistema de confinamento, o qual em sua maioria utiliza dietas com alta inclusão de concentrado para atingir altos índices de produção (JUNIOR, 2014). No entanto, diferente dos monogástricos, o aumento do concentrado na dieta apresenta impactos no aproveitamento dos alimentos, devido a alterações no perfil de fermentação ruminal (CUNHA, 2012).

Dentre as alterações causadas pelo aumento no nível de concentrado nas dietas tem-se o aumento na taxa de fermentação com conseqüente queda no pH ruminal, o que pode afetar diretamente a degradabilidade da fibra pelo decréscimo da população de bactérias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*). Nestas condições o meio fica favorável para o aumento da atividade das bactérias degradadoras de carboidratos solúveis, que por sua vez produzem lactato, podendo ocasionar uma redução na eficiência microbiana e em conjunto com a redução da digestibilidade ocasionar também em redução no consumo de alimento (VAN SOEST, 1994; ANTUNES et al 2011; JUNIOR, Carlos 2014). Neste caso, através da manipulação da relação volumoso:concentrado é possível alterar os processos fermentativos a fim de maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes bem como a síntese de proteína microbiana sem que haja prejuízos ao processo fermentativo (RUSSELL et al., 1992).

De acordo com Paula et al. (2009), é possível aprimorar o desempenho dos animais e diminuir os impactos ambientais através de uma dieta equilibrada e precisa. Um exemplo concreto é a redução da concentração de N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal ao incorporá-lo na síntese de proteína microbiana. Isso resulta na diminuição da excreção de nitrogênio na urina, contribuindo para a redução da poluição ambiental e otimizando a eficiência na utilização desse nutriente. Contudo, qualquer estratégia de manipulação na dieta de ruminantes deve levar em consideração aspectos relacionados à fermentação ruminal, assim como a

microbiota presente e as características desta câmara fermentativa. Para isso é indispensável a compreensão da população dos microrganismos ruminais, para então fornecer as condições necessárias ao melhor aproveitamento do processo de fermentação (SOUZA, 2014)

Segundo Arcuri et al. (2011), às características ideais para fermentação são: altas taxas de digestão da fibra; ausência de ácido láctico; mínima produção de  $N-NH_3$  e gás metano ( $CH_4$ ); e elevada síntese de proteína microbiana. Assim, através da manipulação da dieta e manutenção do pH é possível manter essas características dentro do ideal, favorecendo o melhor aproveitamento dos alimentos, assim como um melhor desempenho animal.

Embora sejam conhecidos os efeitos da utilização das diferentes relações volumoso:concentrado sobre o metabolismo ruminal, poucos estudos abordam o impacto na microbiota ruminal, relacionando com os parâmetros fermentativos, e eficiência de uso dos nutrientes da dieta. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso de diferentes relações volumoso:concentrado sobre os parâmetros fermentativos ruminais *in vitro*, bem como os impactos sobre os protozoários.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Caracterização ruminal**

Os animais ruminantes são caracterizados por apresentarem o estômago dividido em quatro cavidades, sendo elas, rúmen, retículo, omaso e abomaso. Essa adaptação torna esses animais capazes de aproveitar frações da dieta que não são aproveitadas pelos animais monogástricos, isso se dá pelo fato de o rúmen funcionar como uma câmara de fermentação anaeróbia, onde comunidades bacterianas, protozoárias, e fúngicas interagem entre si e com o hospedeiro, fermentando alimentos fibrosos, sintetizando nutrientes como proteína microbiana, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e vitaminas do complexo B e K (ZEOULA E GERRON, 2011). Millen et al. (2016) sugerem que a proteína microbiana pode suprir até 100% da exigência de proteína metabolizável, e os AGCC, principal fonte de energia dos ruminantes, suprir até 80% da exigência energética dos ruminantes, fato que faz com que a fermentação ruminal seja priorizada.

Contudo, o ambiente ruminal é considerado um ecossistema complexo, onde a microbiota existente é de extrema importância para o aproveitamento dos alimentos. Dentre os grupos de microrganismos do rúmen, o grupo das bactérias são os mais estudados devido sua grande população e impacto no desempenho animal (DIAS, 2000).

Assim, para um ótimo desenvolvimento dos microrganismos é necessário que o hospedeiro forneça condições fisiológicas adequadas, como temperatura, pH, anaerobiose, substrato, e correta taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo. Dentre os principais fatores para prevalência dos microrganismos no ecossistema ruminal estão os substratos disponíveis para fermentação juntamente com o pH, e a concentração de amônia disponível no conteúdo ruminal, uma vez que é utilizada para produção de proteína microbiana (OLIVEIRA et al., 2013)

### **2.2 Microbiota ruminal**

No rúmen habitam três tipos de microrganismos ativos, sendo eles as bactérias, protozoários e fungos, que necessitam de um meio ideal para seu desenvolvimento. Em condições normais o rúmen apresenta temperatura variando de 39 a 42°C, pH entre 6,0 e 7,0, meio anaeróbico e presença constante de substrato para as atividades fermentativas realizadas pelos microrganismos (SEO et al., 2013, LETÍCIA et al., 2017)

Os microrganismos ruminais que interagem com as partículas de alimento podem ser funcionalmente descritos em quatro sub populações distintas: livres, associados ao fluido

ruminal; fracamente associadas a partículas; e fortemente aderidos a partículas de alimentos (REIS, 2015)

### 2.2.1 Bactérias

Dentre os grupos de microrganismos no rúmen, o grupo das bactérias se apresenta em maior concentração e atividade, posteriormente, protozoários e fungos. Mais de 20 espécies bacterianas apresentam contagens superiores a  $10^{10}$  células/g, porém já foram isoladas mais de 400 espécies em tratos digestório de diferentes animais (KRAUSE e RUSSELL, 1992)

As espécies bacterianas ruminais podem variar de acordo com tamanho (0,4 a  $2 \mu\text{m}$  de diâmetro e 1,0 a  $6,0 \mu\text{m}$  de comprimento), forma (cocos, bacilos, e em menor quantidade espiraladas) e quanto a parede celular (gram-positiva ou gram-negativa). Bactérias gram-negativas possuem duas membranas externas interligadas por uma camada de glicopeptídeos, enquanto as gram-positivas possuem uma membrana externa simples protegida por uma camada relativamente mais espessa de glicopeptídeos (ARCURI, et al 2011; DA SILVA; LEÃO, 1979)

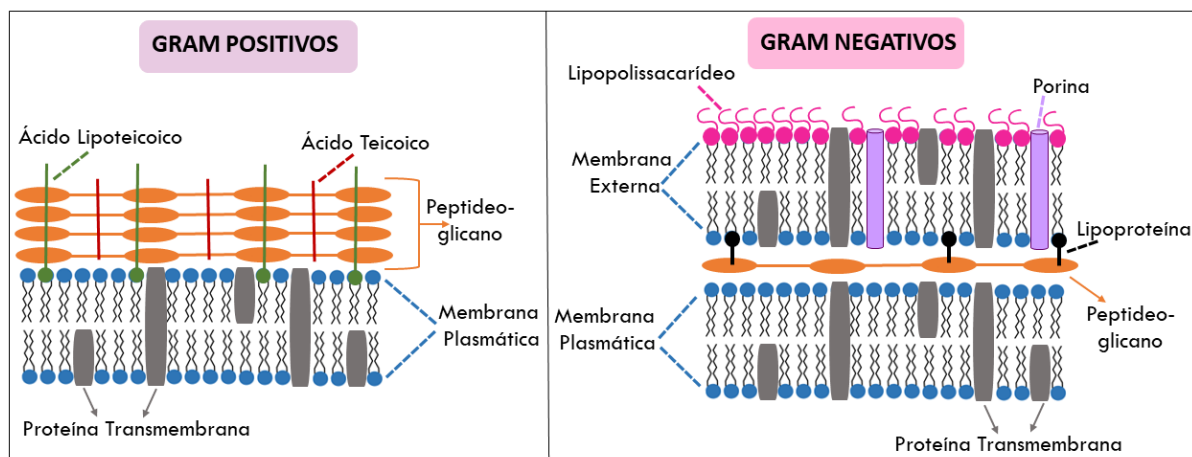


Figura 1. Características estruturais da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Schunk, 2023)

A classificação das bactérias comumente usada pelos pesquisadores é fundamentada no tipo de substrato no qual agem, e seus produtos finais da fermentação (Quadro 1, Kozloski, 2011).

Quadro 1. Grupos de bactérias em função da sua estratégia nutricional.

<p><b>Fermentadoras de carboidratos estruturais</b></p>	<p>Degradam componentes da parede celular (celulose e hemicelulose); Taxa de crescimento relativamente lenta em relação às fermentadoras de carboidratos solúveis; Dependentes de amônia; Exemplo: <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, e <i>Fibrobacter succinogenes</i>.</p>
<p><b>Fermentadoras de carboidratos solúveis</b></p>	<p>Degradam carboidratos de natureza não estrutural, como o amido, dextrinas, frutanas e açúcares; Taxa de crescimento alta; Utilizam amônia, aminoácidos e peptídeos para síntese proteica; Exemplo: <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i>, <i>Lactobacillus sp.</i> e <i>Prevotella sp.</i></p>
<p><b>Proteolíticas/ aminolíticas</b></p>	<p>A maior parte dos grupos de bactérias são capazes de degradar a proteína, porém, algumas espécies utilizam principalmente aminoácidos como substrato energético e possuem atividade proteolítica mais intensa que as demais; Exemplos: <i>Peptostreptococci sp.</i>, <i>Clostridium sp.</i></p>
<p><b>Láticas</b></p>	<p>Utilizam, entre outros, ácido láctico como substrato energético; Exemplos: <i>Megasphaera elsdenii</i> e <i>Selenomonas ruminantium</i></p>
<p><b>Pectinolíticas</b></p>	<p>Fermentadoras de pectina; Fermentação semelhante a de carboidratos solúveis Exemplo: <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i></p>
<p><b>Lipolíticas</b></p>	<p>Hidrolisam triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos Exemplo: <i>Anaerovibrio lipolytica</i></p>
<p><b>Ureolíticas</b></p>	<p>Encontram-se aderidas ao epitélio ruminal e hidrolisam uréia, liberando amônia no rúmen. Exemplo: <i>Enterococcus faecium</i></p>
<p><b>Metanogênicas</b></p>	<p>São archaeobactérias, se diferenciando das demais, pela estrutura da parede celular e por serem quimiotróficas. A parede celular é ausente. São as mais sensíveis ao oxigênio Produzem metano a partir de CO<sub>2</sub></p>

Os produtos resultantes da fermentação bacteriana, variam sobretudo de acordo com a natureza do substrato. Dentre os AGCCs, os principais produzidos na fermentação são acético, propiônico e butírico (Tabela 1; Teixeira, 1997).

Tabela 1. Características estruturais e fermentativas de algumas principais espécies bacterianas ruminais.

Espécie	Forma	Gram	Substratos fermentáveis									Principais produtos
			Amido	Celulose	Xilana	Pectina	Malto	Celobiose	Glicose	Xilose	Lactato	
Ruminococcus sp	Coco	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	A, S
Fibrobacter succinogenes	Bacilo	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	A, S
Butyrivibrio fibrisolvens	Bacilo	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	A, B
Streptococcus bovis	Coco	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	L
Ruminobacter amylophilus	Bacilo	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	A, S
Lactobacillus sp.	Bacilo	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	L
Prevotella sp.	Bacilo	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	A, P, iB, S
Megasphaera elsdenii	Coco	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	B, P, iB, V
Selenomonas ruminantium	Bacilo	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	A, P, L
Succinivibrio dextrinosolvens	Bacilo	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	A, S
Lachnospira multipara	Bacilo	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	A
Anaerovibrio lipolytica	Bacilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	A, S, P

\*A= acetato, B= butirato, P= propionato, S= succinato, L= lactato, iB= isobutirato, V= valetato.

Fonte: Kozloski, 2011

### 2.2.2 Protozoários

São microrganismos unicelulares, anaeróbios, não patogênicos, e considerados os microrganismos de maior tamanho rúmen (5–250  $\mu\text{m}$  de comprimento), cerca de dez a cem vezes maiores que as bactérias. Foram os primeiros a serem encontrados e descritos, por Gruby e Delafond em 1943 (NIGRI et al., 2017; DA SILVA; LEÃO, 1979). Segundo Kamra (2005), podem representar 2% de peso do conteúdo ruminal. Embora poucos em número, os protozoários, podem representar de 40 a 60% da biomassa microbiana total, em consequência do seu tamanho (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011).

Fatores como dieta e pH influenciam o número e a composição de protozoários, assim como frequência de alimentação, dentre estes, o pH parece ser de suma importância para seu estabelecimento e manutenção. Dietas ricas em concentrado com uma correspondente queda de pH, praticamente exterminaria os protozoários no rumem, porém nem todos os estudos evidenciam este fato (CLIMACO, 1993).

Estudos apontam a importância da participação dos protozoários na digestão e no equilíbrio do ecossistema ruminal (NIGRI et al., 2017). A presença deste microrganismo traz efeitos benéficos e adversos para o desempenho animal (Quadro 2). Porém, pouco é

conhecido sobre a ecologia e impacto desses microrganismos para animais submetidos a dietas desafiadoras (DAI, 2021).

Quadro 2. Efeitos benéficos e adversos da presença de protozoários no rúmen.

Efeitos aumentados com a presença de protozoários ruminais	Efeitos reduzidos com a presença de protozoários ruminais
<b>Efeitos benéficos</b>	
Estabilidade da fermentação e do pH	Concentração de ácido láctico
Concentração de AGCC elevada e estável	Susceptibilidade à acidose por ácido láctico
Degradação da fibra e digestão do amido	Susceptibilidade a diarreias
<b>Efeitos adversos</b>	
Concentração de amônia	População bacteriana
Atividade proteolítica	Fluxo de nitrogênio para o intestino delgado
Concentração de amônia	Eficiência de conversão alimentar

Adaptado de Arcuri, Lopes e Carneiro (2011)

Os protozoários ciliados, que se apresentam em maior proporção no rúmen, exibem uma notável versatilidade em sua capacidade de degradar e fermentar uma ampla variedade de substratos. Esses organismos consomem partículas de alimentos e desdobram os principais componentes fibrosos encontrados em vegetais, como celulose, amido e pectina. Os protozoários armazenam quantidades consideráveis de polissacarídeos, como o amido de reserva, e recorrem a essas reservas quando as fontes de energia exógenas estão esgotadas. Eles ingerem ativamente bactérias como fonte de proteína, competindo de maneira eficaz por substratos. Isso pode resultar em uma redução substancial no número de bactérias, frequentemente chegando à metade ou menos do inicial. (NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2011).

### 2.2.3 Fungos

Os fungos anaeróbios presentes no rúmen desempenham um papel crucial na digestão de forragens tropicais, uma vez que possuem a capacidade de produzir enzimas especializadas. Essas enzimas têm capacidade de acelerar o processo de degradação da celulose e hemicelulose lignificadas. Essa atividade enzimática é essencial para a eficiente

quebra desses materiais fibrosos, tornando-os mais acessíveis aos processos digestivos dos animais ruminantes. Assim, a contribuição dos fungos anaeróbios do rúmen desempenha um papel fundamental na maximização da utilização de forragens tropicais na dieta desses animais (CERDA, 2003).

As células vegetais mais antigas apresentam uma cobertura complexa de lignina, cutina, taninos e sílica, dificultando a adesão e a ação dos microrganismos ruminais em suas paredes celulares (VAN SOEST, 1994). Como resultado, a degradação dessas células ocorre preferencialmente de dentro para fora. Os fungos são os únicos microrganismos capazes desse processo, permitindo que outros microrganismos continuem a digestão das proteínas e carboidratos vegetais. Zoósporos fúngicos se ligam à partícula vegetal, e um rizóide simples atravessa a parede celular por lesões ou estômatos. Posteriormente, o rizóide se expande, formando "braços" que, por meio de enzimas e forças mecânicas, rompem a parede celular, expondo os açúcares solúveis internos. Isso possibilita que outros microrganismos ruminais se alimentem e concluam a digestão das fibras (PAUL et al., 2004; KAMRA, 2005)

## **2.3 Saúde ruminal**

### **2.3.1 Anaerobiose**

A ausência de oxigênio é indispensável, pois predominam no rúmen as bactérias anaeróbias restritas, e uma pequena população de anaeróbias facultativas (FURLAN et al., 2006). O oxigênio entra no rúmen através da ingestão de alimentos com água ou difusão por meio dos vasos sanguíneos, porém são rapidamente consumidos pelas bactérias anaeróbias facultativas e/ou eliminados pela eructação, mantendo suas concentrações sempre baixas (MALAFAIA et al., 1998).

### **2.3.2 Temperatura**

A temperatura ruminal é mantida relativamente constante, próxima a 39°C, por meio da própria homeostase do hospedeiro, no entanto a temperatura água consumida pode alterar a temperatura ruminal, influenciando na atividade fermentativa, podendo inibir o desenvolvimento e atividade microbiana (MARTINS, 2020).

Segundo Furlan (2011), quando consumido a água abaixo de 0°C, reduz a temperatura do rúmen, afeta o pH, suprime a atividade microbiana e por consequência, reduz a digestibilidade dos alimentos.



### 2.3.3 pH

O rúmen é considerado um ambiente relativamente tamponado, em torno de 7,0, porém, podendo variar de 8,0 a valores inferiores a 5,0 conforme o tipo de dieta e tempo de ingestão do alimento (KOZLOSKI, 2016). O pH tem interferência direta na prevalência dos grupos de bactérias dentro do rúmen, assim como os outros microrganismos. O tipo de dieta (composição dos ingredientes) tem relação direta com o pH. Dietas com alto teor de carboidratos solúveis estimulam o rápido crescimento microbiano, como consequência aumenta a taxa de fermentação, com isso, tem-se uma maior produção de ácidos (AGCC), acarretando uma queda no pH (SOUZA, 2005).

Contudo, Bactérias fibrolíticas são sensíveis a pH inferiores a 6,0, e possuem um ótimo desenvolvimento em pH próximo a 6,7 (VALADARES FILHO; VALADARES, 2011). Em dietas de alto concentrado a tendência é de redução no pH, devido à alta e rápida produção de AGCC, simultaneamente com a redução na população de bactérias fibrolíticas, que cessam seu crescimento em pH inferior a 5,8 (ARCURI et al., 2011), havendo um decréscimo da degradação da fibra, e maior degradação de carboidratos solúveis, acarretando uma maior produção de lactato.

Dietas com maior teor de carboidratos estruturais apresentam uma menor taxa de fermentação (a degradação ocorre mais lentamente) e estimulam a ruminação. Ao estimular a ruminação, por consequência é estimulado também a produção e secreção de saliva, mecanismo responsável pelo tamponamento ruminal, desta forma, ao consumir uma dieta rica em fibras, estimula-se a produção de saliva e tem-se um melhor tamponamento natural do rúmen, mantendo o pH na faixa ideal para o desenvolvimento das bactérias fibrolíticas e protozoários (KOZLOSKI, 2016).

Segundo Van Soest (1994), a fermentação do amido e dos açúcares reduz o pH, por produzir mais AGCC, principalmente o propionato pela via do ácido láctico, que pode se acumular no rúmen, inibindo o crescimento da flora bacteriana. A redução do pH abaixo de 6,0 ocasiona em perda acentuada da atividade fibrolítica, e sua ação é completamente cessada com pH entre 4,5 e 5,0, enquanto valores de pH acima de 6,2 são considerados como limite mínimo para a fermentação da fibra. Já valores de pH inferiores a 5,8 favorecem o crescimento das bactérias ácido-tolerantes, dentre elas então principalmente o grupo das degradadoras de amido/amilolíticas (OLIVEIRA, 2016; MILLEN et al., 2016).

Segundo Arcuri et al. (2011) às características ideais para fermentação são: altas taxas de digestão da fibra; ausência de ácido láctico; mínima produção de  $N-NH_3$  e gás  $CH_4$ ; e elevada síntese de proteína microbiana. Através da manipulação da dieta e manutenção do

pH é possível manter essas características dentro do ideal, favorecendo o melhor aproveitamento dos alimentos, assim como um melhor desempenho animal.

#### **2.3.4 N-NH<sub>3</sub> ruminal**

As proteínas são macromoléculas presentes nas células que podem apresentar diversas funções como componentes estruturais, função enzimática, funções hormonais, e armazenamento de informações genéticas. As unidades formadoras das proteínas são os aminoácidos, que são unidos por ligações peptídicas (proteínas simples), existindo também na forma complexa, havendo outros compostos ligados ao grupo dos aminoácidos, como exemplo as lipoproteínas (ligadas a lipídeos), e as glicoproteínas (ligadas a açúcares; SANTOS; PEDROSO, 2011).

A proteína bruta contida nos alimentos é composta pela proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradada no rúmen (PNDR). A PNDR passa pelo rúmen sem que ocorra a ação dos microrganismos podendo ser absorvida no intestino. Enquanto a PDR sofre ação das enzimas secretadas pelas bactérias (proteases, peptidases, e desaminase). Ao degradarem a PDR, os microrganismos utilizam peptídeos, aminoácidos, e amônia, para síntese microbiana e multiplicação celular (SANTOS; PEDROSO, 2011).

Existem diversos fatores que alteram extensão da degradação da proteína no rúmen (PDR), como composição da PB (relação NNP e proteína verdadeira), atividade proteolítica microbiana, o acesso microbiano a proteína, tempo de retenção do alimento no rúmen, pH ruminal, processamento do alimento e temperatura ambiente (SANTOS; PEDROSO, 2011). Existem duas principais fontes de N utilizadas na dieta de ruminantes, o nitrogênio não protéico, oriundo de fontes não orgânicas, e a proteína verdadeira, proveniente de fontes vegetais/orgânicas. A principal fonte de NNP é a ureia, que apresenta vantagem em relação ao custo por unidade de nitrogênio em relação a proteína verdadeira, presente em farelos, grãos, oleaginosas, entre outros (PAULA, 2009).

A degradabilidade da proteína se refere ao processo de conversão da proteína da dieta em amônia, onde ocorre primeiro a digestão da proteína até aminoácidos e posteriormente a fermentação dos aminoácidos a ácidos orgânicos (LIMA, 2009). Segundo RUSSELL et al. (1992), o termo fermentação refere-se as etapas de desaminação e formação de produtos finais, enquanto digestão refere-se as etapas iniciais de degradação protéica. A degradação da proteína é um processo múltiplo envolvendo solubilização, hidrólise extracelular, transporte para o interior da célula, desaminação e a formação de amônia, ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub> e metano (BACH et al, 2005).

Segundo Santos e Pedroso (2011), os aminoácidos podem ser utilizados na síntese de glicose e ácidos graxos, além de poderem ser oxidados a  $\text{CO}_2$  e água para produção de energia. Na falta de energia prontamente disponível os microrganismos podem utilizar os aminoácidos como fonte de energia, trazendo uma perda econômica pois as fontes de proteína verdadeira, que trazem a maior parte dos aminoácidos da dieta, tendem a ser mais caras quando comparado às fontes de energia como os carboidratos (Millen et al., 2016).

O desempenho de animais ruminantes é dependente do metabolismo proteico, pois a partir do mesmo tem-se como produto a amônia utilizada pela microbiota. Este metabolismo ocorre em dois processos distintos, sendo eles a degradação de proteína como fonte de nitrogênio para os microrganismos e síntese de proteína microbiana a partir de peptídeos, aminoácidos ou amônia livre no conteúdo ruminal (ERNANDES, 2014).

#### **2.4 Produtos da fermentação ruminal**

Os alimentos ingeridos são fermentados pela atividade enzimática dos microrganismos ruminais, em AGCC, que são absorvidos pelo epitélio ruminal. Os AGCC representam fonte de energia e contribuem de forma significativa na produtividade dos ruminantes (BERGMAN et al., 1990; MAGAÇO E DUARTE, 2019).

Os AGCC, como um conjunto, possuem de 1 a 7 átomos de carbonos dispostos para formar compostos com cadeias lineares ou ramificadas. Este grupo inclui ácido fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, 2-metilbutírico, hexanóico e heptanóico (BERGMAN et al., 1990).

Valadares, Filho e Pina (2011), afirmam que ruminantes utilizam AGCC como principal fonte de energia, principalmente acético, propiônico e butírico, provenientes da fermentação de carboidratos e em alguns casos proteínas.

Segundo Moss *et al* (2000), as diferenças na composição nutricional dos alimentos podem resultar em padrões fermentativos diversos, gerando proporções distintas dos produtos finais da fermentação, tais como os ácidos graxos acético, propiônico e butírico. Esses ácidos constituem uma fonte significativa de energia para o metabolismo dos ruminantes. Concomitantemente a esses processos fermentativos, ocorre a produção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e  $\text{CH}_4$ , cujas quantidades variam conforme a proporção individual dos ácidos produzidos. Essa proporção é influenciada pela composição da matéria orgânica das dietas, destacando-se a natureza e taxa de fermentação dos carboidratos como fatores preponderantes (MORGADO, 2013).

A relação volumoso:concentrado nas dietas desempenham um papel fundamental na determinação da composição de AGCC. Quando essa relação é reduzida, ocorre uma

redução na relação acetato:propionato. Desta forma, dietas contendo maior proporção de grãos, leva a uma maior produção de ácido propiônico, e dietas ricas em volumoso produzem mais ácido acético. (SUTTON et al., 2003; ERNANDES, 2014).

Em situações de maior fornecimento de carboidratos estruturais ocorre maior produção de acetato. Na formação do acetato a partir do piruvato, ocorre a liberação de moléculas de  $H_2$  e  $CO_2$ . Archeas metanogênicas são responsáveis por utilizar este produto e formar  $CH_4$  (VALADARES; FILHO; PINA, 2011). Segundo Demarchi et al. (2003) o processo de metanogênese pode consumir até 14% do total da energia digestível, gerando assim um desperdício de energia e prejuízo à produção animal, além do fator de impacto ambiental ocasionado pela liberação de gases de efeito estufa.

Já na formação do propionato a partir piruvato, não ocorre a liberação de  $H_2$  e  $CO_2$ , por consequência há redução na produção de  $CH_4$ , reduzindo assim a produção de gases de efeito estufa. Ou seja, dietas ricas em concentrado podem reduzir a emissão de  $CH_4$ , e além de reduzir impactos ambientais, podem melhorar o desempenho produtivo do ruminante (VALADARES; FILHO; PINA, 2011).

### **2.5 Sincronismo de degradação e síntese de proteína microbiana**

Para produção de proteína microbiana é necessário além das condições fisiológicas ideais fornecidas pelo hospedeiro, o substrato para sua produção, ou seja, necessitam de esqueletos de carbono, disponibilidade de energia, simultâneo ao fornecimento de  $NH_3$  e peptídeos para que haja síntese microbiana (PEREIRA, et al., 2005). Em condições de alta disponibilidade de carboidratos de rápida degradação (CNE), as espécies degradadores de carboidratos não fibrosos apresentam alta taxa de crescimento, pois podem incorporar quantidades significativas de aminoácidos em suas proteínas, enquanto bactérias fibrolíticas não possuem habilidade de utilizar aminoácidos pré-formados (KOZLOSKI, 2016). Devido a diferença de capacidade de utilização das diferentes fontes proteicas, a predominância dos grupos de bactérias no rúmen varia de acordo com o tipo de substrato fornecido. Bactérias fibrolíticas necessitam de  $NH_3$  para síntese microbiana, em quanto bactérias amilolíticas podem utilizar aminoácidos, peptídeos e  $NH_3$ , desta forma, favorecendo seu desenvolvimento ruminal. Com a alta atividade das bactérias amilolíticas a tendência é um declínio da atividade celulolítica, pois na fermentação dos CNE, ocorre uma rápida produção de ácidos, dentre eles o lactato, e por consequência queda no pH, tornando o meio inadequado para a sobrevivência das bactérias celulolíticas, reduzindo a taxa de degradação da fibra (MILLEN et al., 2016).

O sincronismo de degradação ocorre com o fornecimento de proteínas degradáveis no rúmen (NNP e proteína verdadeira degradável no rúmen) e energia (carboidrato fermentável

no rúmen) (SEO et al., 2013). A ideia é fornecer carboidrato e proteína de forma que suas frações sejam degradadas simultaneamente, de forma que sempre tenha a fonte de energia e de nitrogênio disponível como substrato para realização da síntese de proteína microbiana. Em condições de presença de fonte de nitrogênio e ausência de energia, alguns microrganismos são capazes de utilizar as fontes nitrogenadas como fonte de energia, por possuírem capacidade desaminativa, sendo o caso das bactérias degradadoras de CNE citadas acima, no entanto poucos grupos possuem essa capacidade.

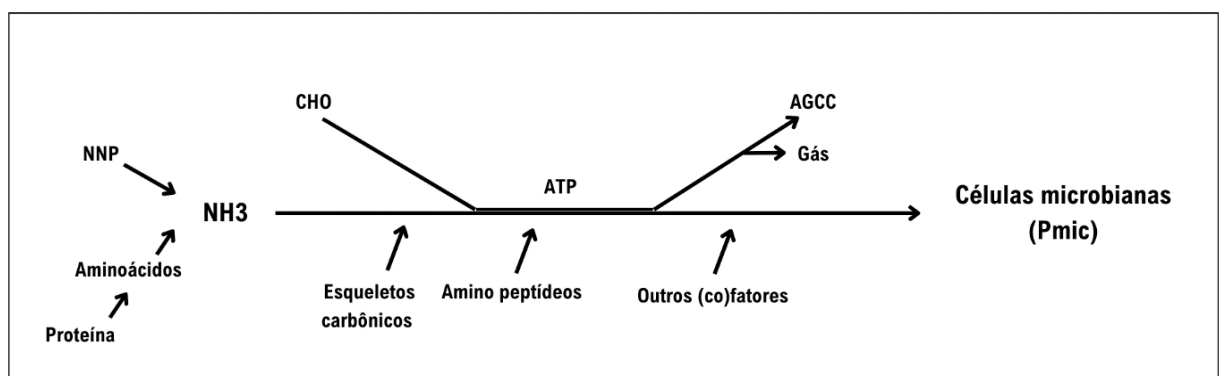


Figura 2. Fatores que afetam a síntese microbiana (adaptado de Santos e Pedroso, 2011)

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia e Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, ambos pertencentes à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, campus de Alegre/ES.

Para a coleta do inóculo destinado a incubação *in vitro*, foi utilizado o líquido ruminal de dois ovinos mestiços (Santa Inês x Dorper), machos não castrados e canulados no rúmen, com peso corporal médio de 40 kg, e aproximadamente dois anos de idade, alimentados a base de silagem de milho e concentrado padrão contendo milho moído, farelo de soja e sal mineral. Os procedimentos experimentais do projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre da UFES (CEUA - ALEGRE), sob protocolo número 005/2021 e se encontra dentro das normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

#### Tratamentos (Diets experimentais)

Ao todo 7 tratamentos foram utilizados, contendo diferentes relações volumoso concentrado, sendo 100v; 80v:20c; 60v:40c; 50v:50c; 40v:60c; 20v:80c e 100c. Todas as dietas foram formuladas a fim de atender as exigências nutricionais de manutenção para ovinos adultos de 40 kg (NRC 2007). Os ingredientes utilizados foram silagem de milho, farelo de soja, fubá de milho, ureia, calcário calcítico e fosfato bicálcico. Para incubação foi realizada a mistura e homogeneização de cada tratamento, obtendo sete dietas totais.

Tabela 2. Porcentagem de inclusão de ingredientes nas dietas experimentais

Ingredientes	Relação Volumoso:Concentrado (% na MS)						
	100:0	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	0:100
Silagem de milho	113,6	90,9	68,2	56,8	45,5	22,7	0,0
Fubá de milho	0,0	16,3	38,8	50,0	61,0	83,4	106,0
Farelo de soja	0,0	5,1	5,4	5,6	6,1	6,5	6,8
Ureia	0,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0,0
Calcário calcítico	0,0	0,1	0,3	0,4	0,5	0,7	0,8
Fosfato Bicálcico	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0

Tabela 3. Composição nutricional das dietas experimentais.

Nutrientes, %MS	Relação Volumoso:Concentrado (% na MS)						
	100:0	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	0:100
PB	7,18	11,37	11,37	11,37	11,37	11,37	11,38
EM	2,18	2,37	2,58	2,69	2,8	3,01	3,23
NDT	63,22	66,76	71,6	74,03	76,47	81,31	86,14
Ca	0,28	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
P	0,19	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,29
FDN	53,98	45,65	37,48	33,39	29,31	21,13	12,95

\*PB= proteína bruta, EM= energia metabólica, NDT= nutrientes digestíveis totais, Ca= cálcio, P= fósforo, FDN= fibra detergente neutro.

### **Incubação *in vitro***

As amostras de líquido ruminal foram coletadas com os animais em jejum, sendo então filtradas com “pano de queijo” e armazenadas em garrafas térmicas pré-ambientadas (39°C), e encaminhadas rapidamente ao laboratório. Ao chegar no laboratório (7:30am) foi realizada a incubação, onde foram utilizados frascos de penicilina de 50 mL, no qual em cada um foi adicionado 0,5 g da matéria seca da dieta experimental, 10 mL de fluido ruminal previamente coletado e 30 mL de solução tampão McDougall (1949) (9,8g de NaHCO<sub>3</sub>; 9,3g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O; 0,47g de NaCl; 0,57g de KCl; 0,04g de CaCl<sub>2</sub>; 0,06g de MgCl<sub>2</sub> anidro; H<sub>2</sub>O qsp 1000mL), sendo estes expurgados, vedados e encaminhados para a incubadora tipo Shaker.

Através da incubadora Shaker e dos frascos de penicilina foi possível fornecer as condições necessárias ao desenvolvimento dos microrganismos, de forma que as bactérias anaeróbias facultativas pudessem ser capazes de consumir o oxigênio presente sem que comprometesse a fermentação. A incubadora Shaker forneceu a temperatura ideal constante de 39,5°C, assim como simulou a motilidade do rúmen (80 movimentos por minuto). Foram utilizados 17 frascos por tratamento, totalizando 126 frascos.

### **Produção de gases *in vitro***

A produção de gases foi medida 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas após incubação, utilizando medidor de pressão digital acoplado a uma agulha.

A conversão da pressão em volume de gás foi realizada utilizando a fórmula:  $V_x = V_j \times P_{psi} \times 0,068$ , em que:  $V_x$  = volume de gás a 39°C, em mL;  $V_j$  = espaço entre a solução e a tampa de cada vial, em mL; e  $P_{psi}$  = pressão cumulativa.

### **Parâmetros de fermentação ruminal (pH e concentração de N-NH<sub>3</sub>)**

Após a leitura e abertura dos frascos, foram determinados o pH e a concentração de N-NH<sub>3</sub>. Para mensuração do pH foi utilizado pHmetro portátil com compensação automática de temperatura (K39-0014PA, Kasvi) e o conteúdo contido nos frascos, que haviam sido usados para avaliação dos gases e N-NH<sub>3</sub>, foi usado para medição do pH, para isso os frascos foram abertos logo após o procedimento de coleta dos gases, e então o pHmetro foi posicionado sobre o conteúdo e os valores de pH foram registrados.

A concentração de N-NH<sub>3</sub> foi obtida da fase líquida de acordo com o método INCT-CA N-007/1 (DETMANN, 2021). O método consiste em colocar as amostras em tubos de centrifugação [10 mL do líquido desincubado (mistura solução + líquido ruminal)] mais 1 mL de solução de ácido tricloroacético (100g/L), deixando em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, procedeu-se a centrifugação a 1000 x g por 10 minutos. Foram adicionados aos tubos de digestão 2 mL dos sobrenadantes do líquido centrifugado mais 10 mL de solução de KOH 2M. Posteriormente, o tubo foi acoplado ao destilador, a amônia foi recebida em erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de ácido bórico (4%). A destilação se encerrou quando o volume destilado atingiu 100mL e titulado em solução de HCl (0,005N).

### **Análise de protozoários**

A análise dos protozoários foi realizada 6, 24 e 48 horas após a incubação. Para tal, uma gota do conteúdo da incubação de cada frasco de penicilina foi disposta entre lâmina e lamínula e observada no microscópio, no qual era avaliado a proporção das populações, classificadas em pequenos, médio e grandes de protozoários na amostra, a intensidade da motilidade desses seres também foi avaliada, assim como a mortalidade. Para análise de mortalidade, foi criado um uma escala de 1 a 7, descrita no quadro 3.

Quadro 3. Escala para avaliação da mortalidade protozoários.

Escala	Critério
1	Todas as populações presentes, apresentando poucos mortos.
2	Todas as populações presentes apresentando maior quantidade de mortos.
3	Ausência de grandes protozoários, com alta presença de médios.
4	Ausência de grandes protozoários; com menor quantidade de médios.
5	Ausência de médios e grandes protozoários; alta presença de pequenos.
6	Ausência de médios e grandes protozoários; com poucos pequenos vivos.
7	Escassez de protozoários.



### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado para o ensaio *in vitro* foi inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo, sendo os frascos (n= 17) ou sacos de filtro (n= 20), considerados como unidades experimentais. Os dados foram testados para a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk, usando o procedimento PROC UNIVARIATE do SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). E para homogeneidade das variâncias foi usando o procedimento PROC TRANSREG "BOXCOX" (SAS 9.4). Os dados foram analisados pelo pacote PROC MIXED do programa estatístico SAS versão 9.4 com significância de 5%.

#### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Ao avaliar os parâmetros ruminais, pode-se observar que houve interação entre tempo de incubação x tratamentos para as variáveis concentração de N-NH<sub>3</sub> (Figura 4), e produção de gases (Figura 5) em mL/g ( $p < 0,05$ ), sendo assim avaliado a diferença de tratamentos dentro de cada tempo de incubação. Para a variável pH (Figura 3), não houve interação entre tempo de incubação x tratamentos ( $p > 0,05$ ), sendo avaliado somente a média de todos os tempos para cada tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros fermentativos ruminais *in vitro* de diferentes relações volumoso:concentrado em dietas para ovinos.

Item	Tratamentos							EPM	P, valor		
	100:0	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	0:100		TR	TP	TR x TP
pH	5,85a	5,93a	5,86a	5,84 a	5,75ab	5,86a	5,64b	0,079 4	0,005 5	<.000 1	0,086
N-NH <sub>3</sub> , mL/dL	20,9b	24,1a	23,9a	23,9 a	22,60a b	25,6a	21,6b	0,500 3	<.000 1	<.000 1	<.0001
Volum e gás, mL/g	62,40 b	60,42 b	64,17 b	67,3 a	68,2a	65,46a b	64,84a b	1,307 8	<.000 1	<.000 1	<.0001

Em relação ao pH ruminal (Tabela 4), pode-se observar que o tratamento com 100% de concentrado apresentou o menor valor de pH ruminal, diferindo dos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), exceto para o tratamento com 60% de concentrado, que não diferiu de nenhum dos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Esse menor valor de pH é esperado quando se usa dietas com alto concentrado, pois a alta taxa de fermentação tende a liberar mais ácidos, em especial o lactato, que por sua vez acidificam o meio, inviabilizando a permanência de bactérias celulolíticas, e desta forma tem-se uma proliferação cada vez maior das bactérias degradadoras de amido liberando cada vez lactato no meio além de reduzir o aproveitamento da fibra (FANTURI, 2006).

Avaliando o pH da incubação, pode-se observar diferença estatística na variação do pH em diferentes momentos da incubação, indicando uma redução linear ao longo do tempo de incubação (Figura 3). Esse resultado era esperado uma vez que os ácidos resultantes da fermentação/degradação do substrato tendem a se acumular nos frascos durante a

incubação, em contraste com o comportamento no rúmen. No ambiente ruminal, ocorre a absorção pelo epitélio ruminal e a utilização dos AGCC, conforme descrito por Ladeira (2002).

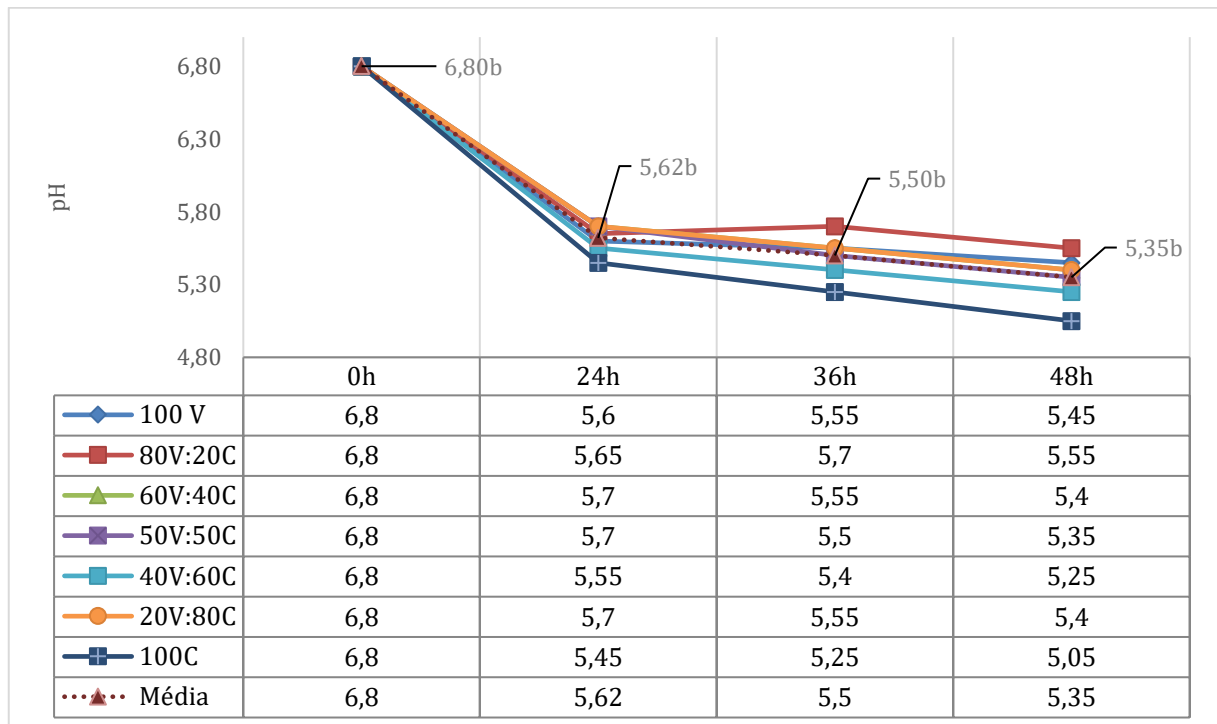


Figura 3. Valores médios de pH durante nos diferentes tempos de incubação.

Conforme indicado por Van Soest (1994), o pH ideal para a atividade ruminal, especialmente para as bactérias celulolíticas e protozoários, está próximo a 6,8, assim como observado no pH do inóculo utilizado (6,8; Figura 3). Em animais alimentados com base em silagem, nota-se uma propensão a apresentar um pH mais elevado, além de uma predominância de populações bacterianas que utilizam esse substrato, ou seja, as bactérias celulolíticas (OLIVEIRA, 2016). Contudo, a transição abrupta de substrato resultou em uma notável redução no pH para todos os tratamentos após 24 horas, passando de 6,8 para uma média de 5,62 (24h), e eventualmente atingindo 5,35 (48h).

Contudo, apesar de não serem observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, o tratamento com 100% de concentrado destacou-se ao exibir um pH inferior em todos os intervalos de tempo analisados.

O pH desempenha um papel crucial na regulação das populações de microrganismos no rúmen. Um pH inferior a 6,2 é considerado prejudicial para esses microrganismos, e valores abaixo de 5,5 têm o potencial de eliminar significativamente grande parte das populações. Nesse cenário, apenas os microrganismos ácido-tolerantes permaneceriam, caracterizados

por sua capacidade de degradar carboidratos solúveis e gerar ácido lático como produto metabólico (VALADARES, FILHO E PINA, 2011).

As menores concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram encontradas no tratamento contendo 100% volumoso e 100% concentrado (P<0,05; Tabela 4), exceto o tratamento com 60% de concentrado, que não diferiu de nenhum dos tratamentos (P>0,05). Estes resultados podem ser explicados devido ausência de sincronismo de degradação dos ingredientes, onde devido a falta dos substratos necessários (fonte proteica e energética simultaneamente) pode ter levado a uma menor síntese de proteína microbiana (ou menor proliferação dos microrganismos), fato que por consequência pode levar a uma redução na degradação da matéria seca, assim como menor degradação da proteína e liberação de NH<sub>3</sub> no meio ruminal (SALAZAR, 2018). As maiores concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram encontradas nos tratamentos contendo 20, 40, 50 e 80% de concentrado (P<0,05), indicando que esses tratamentos possuem maior capacidade de fornecer nitrogênio para microbiota ruminal, principalmente quando se trata das bactérias celulolíticas, que por sua vez dependem do nitrogênio como única fonte proteica (OLIVEIRA, 2016).

Avaliando o desdobramento da interação entre tratamento x tempo de incubação (TR x TP), pode-se observar que a concentração de N-NH<sub>3</sub> aumenta com o passar do tempo de incubação, sendo diferente em cada tempo analisado (P<0,05; Figura 4). Este fato se deve ao pico de produção de amônia que ocorre após a alimentação, o qual é dependente das fontes de N presentes na ração, que quando é fornecido na forma de NNP, ureia por exemplo, é esperado um pico entre 1 a 2 horas após a alimentação (SANTOS; PEDROSO, 2011). Contudo, quando se trata de proteína verdadeira (encontrada principalmente na soja e em menor quantidade no milho e na silagem), esse pico é esperado de 3 a 5 horas após a alimentação, o que está intimamente dependendo da degradabilidade do ingrediente (SANTOS; PEDROSO, 2011). No contexto do atual trabalho, trata-se de um experimento *in vitro*, onde não ocorre reciclagem de NH<sub>3</sub>, assim como não há o escape para o trato intestinal, e por isso não foi observado o consumo, ou a queda na concentração de N-NH<sub>3</sub> do meio.

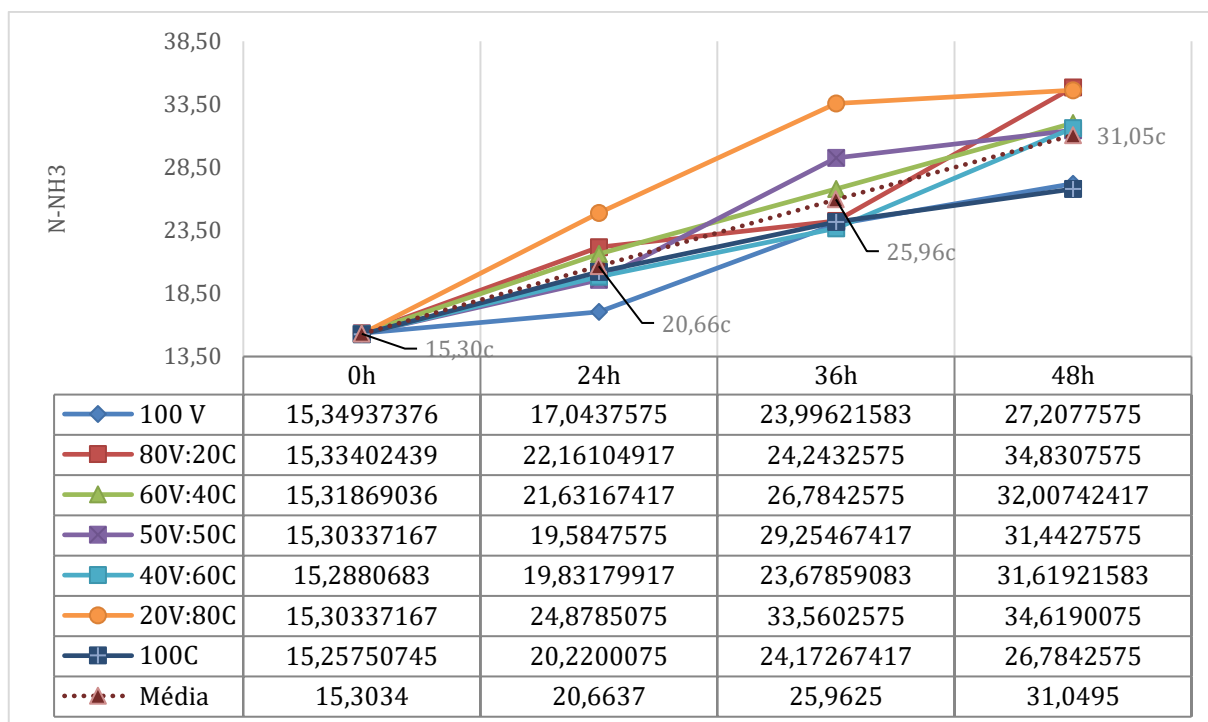


Figura 4. Concentrações médias de amônia (mg/dL) no líquido ruminal em diferentes tempos de incubação.

Nas dietas utilizadas, foi realizada a adição crescente de concentrado, o que configurou com a redução da proteína na forma de ureia (Tabela 2). A dieta contendo 100% volumoso foi a única desprovida desta fonte de proteína (NNP), ao passo que a partir da dieta contendo 80% de volumoso 20% de concentrado os níveis da mesma foi decrescendo, reduzindo a fonte de proteína mais prontamente disponível no rúmen.

O comportamento do  $N-NH_3$  assim como do pH, podem ser explicados pelo sincronismo de degradação ruminal relacionados a proporção das diferentes fontes de proteína em conjunto com a natureza do inóculo, já que os animais doadores do líquido ruminal estavam submetidos a dieta restrita a silagem de milho e sal mineral (onde subentende-se que há predominância de bactérias degradadoras de carboidratos estruturais).

Ao avaliar os tempos de incubação de forma separada (Figura 4), pode-se observar que no tempo 0 de incubação todos os tratamentos apresentara a mesma concentração de  $N-NH_3$  ( $P>0,05$ ). Contudo, após 24 horas de incubação foi observado que os tratamentos com 80, 60 e 20% de volumoso apresentaram as maiores concentrações de  $N-NH_3$ , diferindo dos demais tratamentos ( $P<0,05$ ). Indicando uma maior taxa de fermentação para os mesmos neste período. Ao mesmo tempo, o tratamento contendo 100% concentrado foi o que apresentou menor concentração de  $N-NH_3$ , porém não houve diferença estatística entre este

e os tratamentos contendo 100% volumoso, 50 e 60% de concentrado, que por sua vez apresentaram concentrações inferiores de N-NH<sub>3</sub>.

Ao passar de 36 horas de incubação, as maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos com 50 e 100% de concentrado, diferente do encontrada no período anterior, indicando aumento significativo na taxa fermentativa destes tratamentos ( $P < 0,05$ ). Já após 48 horas de incubação, as maiores concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram encontradas nos tratamentos intermediários (contendo 20, 40, 50, 60, e 80% de concentrado), enquanto as menores foram encontradas nos tratamentos contendo 100% volumoso e 100% concentrado, evidenciando o efeito do sincronismo de degradação, pois como afirmam Owens e Zinn (1998), as bactérias necessitam do esqueleto de carbono em conjunto com a fonte proteica para síntese de proteína microbiana.

Ao degradar proteína, liberam o nitrogênio que será utilizado como fonte proteica pelas mesmas. Na falta da fonte energética ou proteica, como ocorrido nesses tratamentos, há uma menor síntese de proteína microbiana, e por consequência haverá uma menor degradação da matéria seca, assim como, menor degradação da proteína e liberação de amônia. Segundo Lucci (1997), a necessidade de nitrogênio pelos microrganismos no rúmen está diretamente relacionada à quantidade de energia disponível. Isso se deve ao fato de que os protozoários e as bactérias requerem simultaneamente uma fonte de nitrogênio e energia para alcançar uma proliferação desejável.

Pode ser observado que os tratamentos com maior teor de fonte proteica (seja ela verdadeira ou NNP), tiveram maior liberação de N-NH<sub>3</sub>, evidenciado pelos tratamentos contendo 20% e 80% de concentrado ( $P < 0,05$ ), onde o 20% concentrado possuiu a maior concentração de ureia dentre os tratamentos.

Dentre os tratamentos, o 80% concentrado foi o que apresentou maior concentração de N-NH<sub>3</sub> ( $P < 0,05$ ), em todos os horários analisados, fato este que pode ser explicado pela alta (maior) disponibilidade de proteína verdadeira em conjunto, com o NNP, proveniente da ureia, que pode ter conferido a este tratamento, o “melhor” sincronismo de degradação, onde o NNP fornecido pode ter sido utilizado em conjunto ao carboidrato de mais fácil acesso fornecido pela forragem (que se encontrava em uma fração mais fina quando comparado a granulometria do concentrado) ao mesmo tempo que estaria ocorrendo o desenvolvimento de populações amilolíticas, que posteriormente ao seu estabelecimento no meio, houve um aumento na degradação e utilização dos nutrientes fornecidos pelo concentrado.

Diferente do esperado, o tratamento contendo 100% concentrado que obteve uma taxa de fermentação mais lenta que os outros tratamentos, que pode ser observada pela lenta e

posterior maior produção de gás dentre os tratamentos, assim como seu atraso na liberação de N-NH<sub>3</sub>.

Quanto maior a concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen pode significar menor aproveitamento da proteína degradada, seja pela ausência da fonte de energia ou pelo excesso de proteína no rúmen (DUTRA, 2004), porém como se trata de um experimento *in vitro*, onde esse N-NH<sub>3</sub> pode se acumular nos frascos, por não ser absorvido pelo epitélio ruminal ou passar para o trato intestinal, nos indica qual é o tratamento que pode proporcionar maior aporte de nitrogênio para a população bacteriana, em especial para as degradadoras de carboidratos fibrosos, denominadas celulolíticas, que consomem apenas o N-NH<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio.

No que diz respeito produção de gases, os tratamentos contendo 50 e 60% de concentrado (P<0,05) apresentaram maior produção de gases (mL/g), seguido dos tratamentos com 80 e 100% de concentrado, os quais não diferiram dos demais tratamentos (P>0,05, Tabela 4), podendo indicar maior fermentação do substrato, devido a relação direta entre produção de gases de degradação da matéria seca (NOGUEIRA et al., 2016). Dentre os mesmos, os tratamentos que apresentaram menor produção de gases foram os que possuíam menor proporção de concentrado, sendo eles 100% volumoso, 80:20 e 60:40 (P<0,05). Estes resultados indicam uma relação direta entre o aumento da proporção de concentrado da dieta e maior pressão de gases. Desses gases, estão inclusos dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrogênio (H<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>), além de AGCC e ácido láctico (MORGADO, 2013). Segundo MAGAÇO e DUARTE (2019), o AGCC mais produzido entre os ruminantes é o acetato, posteriormente propiônico e butírico, porém ocorre variação na proporção de produção destes, devido principalmente ao substrato fornecido na dieta.

A relação volumoso:concentrado nas dietas desempenham um papel fundamental na determinação da composição de AGCC. Quando essa relação é reduzida, ocorre uma redução na relação acetato:propionato. Desta forma, dietas contendo maior proporção de grãos, leva a uma maior produção de ácido propiônico, e dietas ricas em volumoso produzem mais ácido acético (SUTTON et al., 2003; ERNANDES, 2014).

Em situações de maior fornecimento de carboidratos estruturais ocorre maior produção de acetato. Na formação do acetato a partir do piruvato, ocorre a liberação de moléculas de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Archeas metanogênicas são responsáveis por utilizar este produto e formar CH<sub>4</sub> (VALADARES; FILHO; PINA, 2011). Segundo Demarchi et al. (2003) o processo de metanogênese pode consumir até 14% do total da energia digestível consumido por bovinos Nelore, gerando assim um desperdício de energia e prejuízo à produção animal, além do fator de impacto ambiental ocasionado pelo metano.

Já na formação do propionato a partir piruvato, não ocorre a liberação de  $H_2$  e  $CO_2$ , por consequência reduzindo a produção de  $CH_4$ , assim reduzindo a produção total de gases. Ou seja, dietas ricas em concentrado podem reduzir a emissão de  $CH_4$ , e além de reduzir impactos ambientais, podem melhorar o desempenho produtivo do ruminante.

A análise da produção de gases oferece uma perspectiva sobre o comportamento fermentativo de cada tratamento. A quantidade de gases produzidos está diretamente relacionada à taxa de fermentação, sugerindo que uma maior produção de gases está associada a uma maior degradação da matéria seca (MS) e, conseqüentemente, um aumento na produção dos produtos da fermentação, incluindo os principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), hidrogênio ( $H_2$ ) e metano ( $CH_4$ ).

O tratamento que registrou a maior produção de gases foi o contendo 100% concentrado, no entanto, diferente do esperado, apresentou uma taxa de fermentação mais lenta ( $P < 0,05$ ). Nas horas iniciais, esse tratamento exibiu uma produção de gases significativamente menor ( $P < 0,05$ ) em comparação com os outros tratamentos (Figura 5). Este comportamento inesperado pode ser atribuído à granulometria ou tamanho de partícula da silagem, que se mostrou mais fina em comparação ao concentrado. Isso significa que a silagem proporcionou uma maior superfície específica para a ação dos microrganismos, resultando em uma fermentação mais rápida para o tratamento contendo 100% volumoso, que apresentou uma produção inicial de gases mais elevada. Similarmente ao observado no pH, após a proliferação das populações degradadoras de amido, houve um aumento na produção de gases ( $P < 0,05$ ) após as 36 horas de incubação.



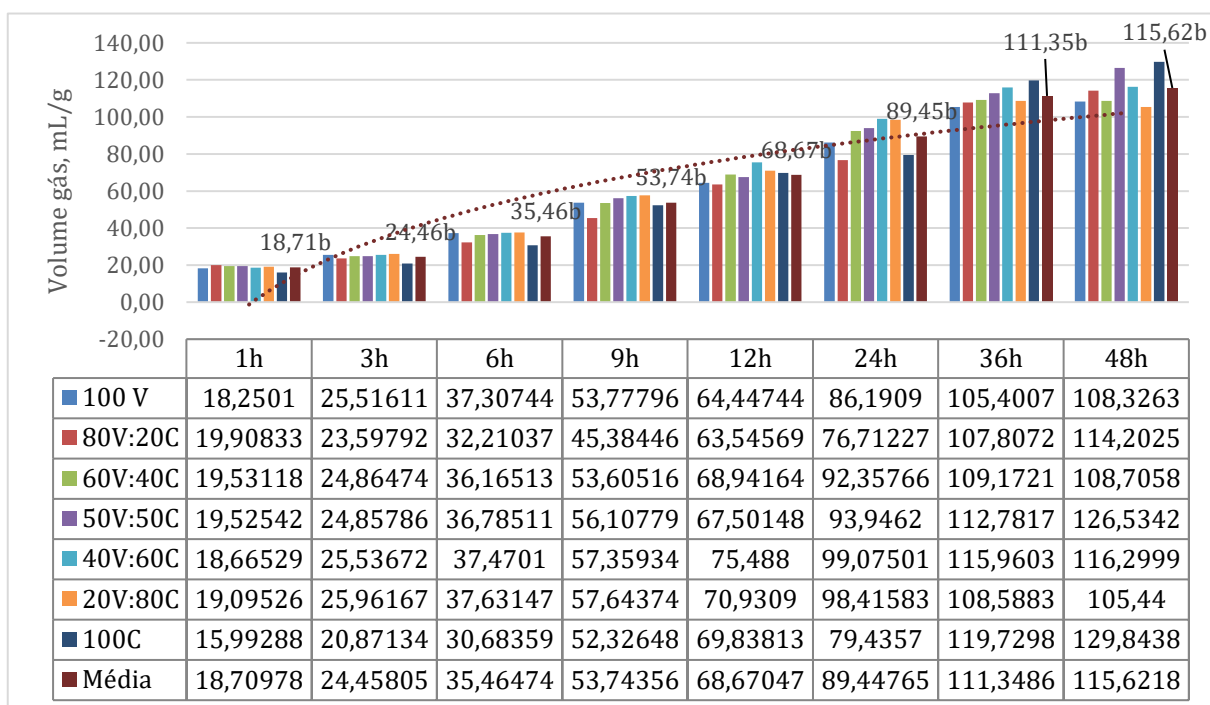


Figura 5. Volume de gás produzido (mL/g) nos diferentes tempos de incubação

Entre as 36 e 48 horas de incubação, foi observada uma redução na produção de gases no tratamento contendo 80% concentrado ( $P < 0,05$ ). Este declínio, juntamente com a redução na concentração de  $N-NH_3$  no mesmo período, sugere que o pico de fermentação foi alcançado entre 24 e 48 horas após o início da incubação. Esse padrão também foi observado nos tratamentos contendo 40 e 60% de concentrado.

Ao considerar a média total de produção de gases ao longo da incubação, observa-se que os tratamentos com níveis mais elevados de concentrado (50, 60, 80c e 100%) foram os que apresentaram uma produção total de gases mais elevada. Isso indica uma relação direta entre o aumento da proporção de concentrado na dieta e a maior produção acumulada de gases durante o período de incubação.

Ao avaliar o comportamento dos protozoários frente as dietas experimentais é possível observar que houve interação ( $P < 0,05$ ) entre tempo de incubação x tratamentos, para as variáveis mortalidade, motilidade total e motilidade de pequenos, assim como, pode-se observar diferença na variação dos mesmos em diferentes momentos da incubação, indicando uma redução linear ao longo do tempo de incubação ( $P < 0,05$ , Tabela 5).

Tabela 5. Comportamento dos protozoários frente a diferentes relações volumoso:concentrado em dietas para ovinos.

Item	Tratamentos							EPM	P, valor		
	100:0	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	0:100		TR	TP	TR x TP
Mortalidade	3,75ab	4,08a	4,33a	3,83a	3,41b	3,41b	4,24a	0,1371	0,0014	<.0001	<.0001
de											
Motilidade geral	2,41b	1,83c	1,91c	2,41b	3,08a	3,00a	2,08bc	0,1321	<.0001	<.0001	<.0001
Motilidade pequenos	3,75a	3,33a	2,83b	3,25a	3,75a	3,83a	3,41a	0,1209	0,0019	<.0001	<.0001

O índice mortalidade foi menor para as dietas contendo 60 e 80% de concentrado ( $P<0,05$ ), da mesma forma que apresentou maior motilidade geral, assim como de pequenos protozoários ( $P<0,05$ ; Tabela 5).

A motilidade geral foi maior nos tratamentos contendo 80 e 100% de concentrado ( $P<0,05$ ), que por sua vez podem fornecer maiores concentrações de nutrientes prontamente disponíveis, estimulando a alta atividade dos microrganismos ruminais, como, os protozoários (VAN SOETS, 1994). O tratamento contendo 80% concentrado obteve destaque positivo não só para o comportamento dos protozoários, mas também para maior concentração de  $N-NH_3$  e maior pH, além de maior produção de gases ( $P<0,05$ ).

Os tratamentos contendo menor proporção de concentrado, obtiveram desempenho significativamente inferior quando se trata do comportamento dos protozoários em relação a sua motilidade geral ( $P<0,05$ ), onde os tratamentos contendo 20 e 40% de concentrado apresentou motilidade geral inferior, seguidos do tratamento contendo 100% volumoso, assim como o tratamento contendo 100% concentrado não apresentou diferenças estatísticas quando comparado aos que apresentaram menor desempenho (com maior proporção de volumoso).

A motilidade de pequenos protozoários foi inferior apenas para o tratamento contendo 40% de concentrado, entretanto este resultado pode ser atribuído a um erro ocorrido durante a coleta de dados, pois revelaram uma divergência substancial em relação aos dados esperados, levantando questões sobre a precisão ou confiabilidade deste resultado.

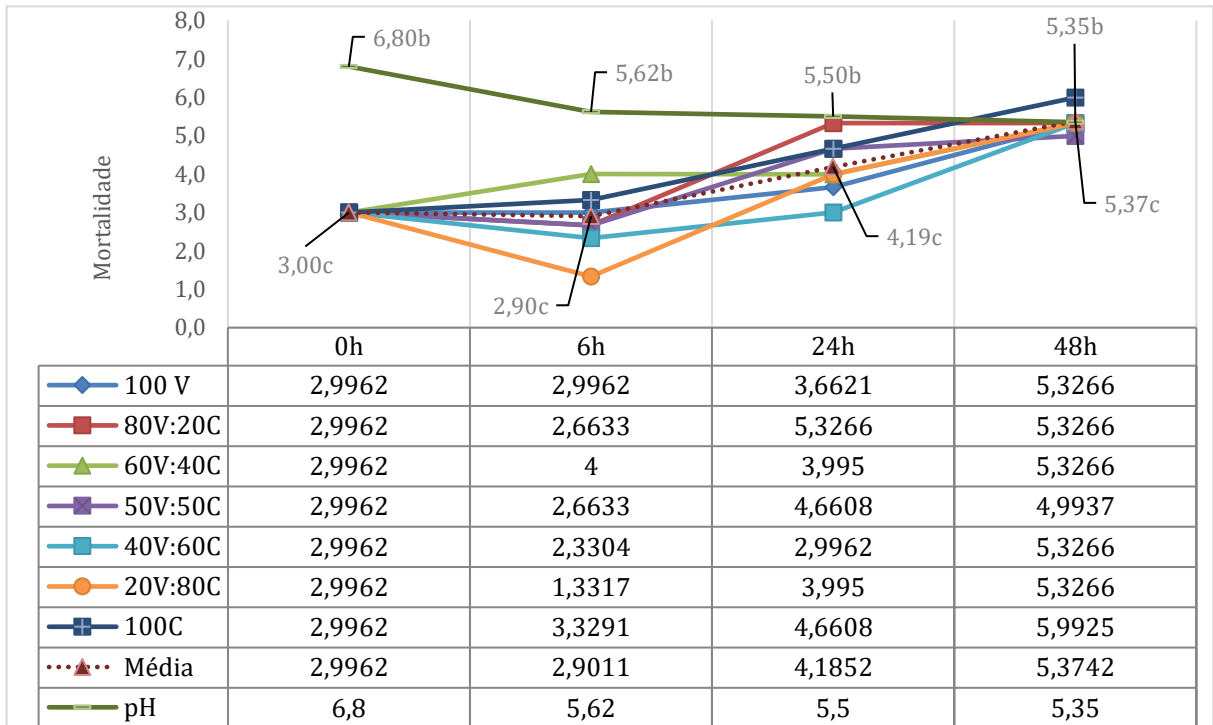


Figura 6. Mortalidade de protozoários em horas distintas de incubação.

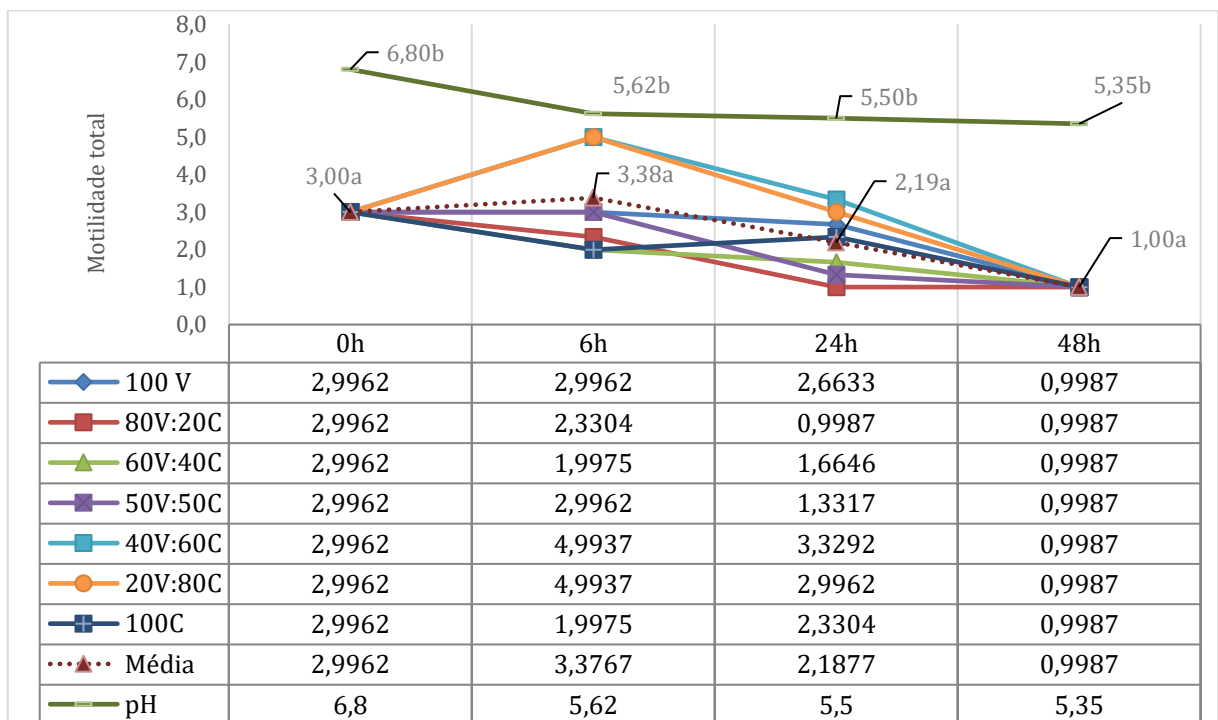


Figura 7. Motilidade de protozoários em horas distintas de incubação.

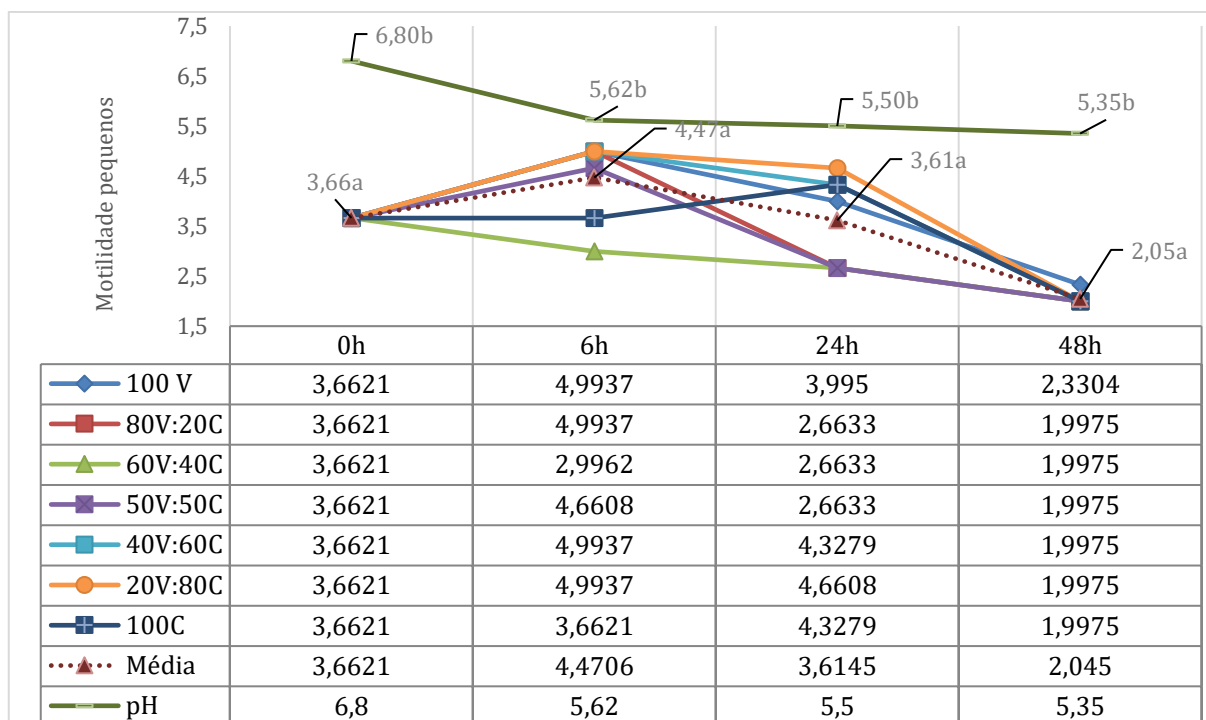


Figura 8. Motilidade de pequenos protozoários em horas distintas de incubação.

No início da incubação, uma análise dos protozoários foi conduzida na hora 0. Apesar do pH ser o ideal para a atividade desses microrganismos, observou-se uma mortalidade média entre eles. Essa ocorrência pode ser explicada pelas conturbações enfrentadas pelo inóculo durante o processo inicial de incubação.

Após o período de 6 horas, foi observada uma queda significativa no pH, atingindo uma média de 5,62 ( $P < 0,05$ ). Conforme destacado por Clarke (1977), os protozoários ruminais são sensíveis às flutuações no pH ruminal, sendo incapazes de sobreviver caso o pH ultrapasse 7,8 ou caia abaixo de 5,0. Além disso, Dehority (2005) relatou a morte de protozoários in vitro em valores de pH abaixo de 5,4. No presente estudo, foi constatada a mortalidade total dos protozoários em um pH de 5,35. Esses resultados reforçam a sensibilidade desses microrganismos às variações no ambiente ruminal, especialmente em relação aos níveis críticos de pH.

Ao longo do experimento, foi observado um aumento linear na taxa de mortalidade dos protozoários ( $P < 0,05$ ). Conforme explicado por Franzolin & Dehority (1996), além do baixo pH, outros fatores como a duração do período com pH reduzido, o tempo de geração dos protozoários e a taxa de saída ruminal também podem influenciar a sua sobrevivência. Owens et al. (1998) acrescentam que em dietas com elevado teor de concentrado, há uma tendência de redução na prevalência dos protozoários. Isso pode ser atribuído à falta de um tapete

fibroso flutuante no rúmen, que normalmente serviria como um ambiente favorável para a retenção dos ciliados, facilitando assim a sua multiplicação.

Foi observado que, apesar do aumento na mortalidade das populações de médios e grandes protozoários em momentos intermediários, os protozoários de tamanho pequeno demonstraram maior resistência, mantendo-se vigorosos e exibindo alta atividade motora. Assim, enquanto a mortalidade aumentava, somente após 48 horas foi observada uma diminuição na motilidade dos protozoários de tamanho pequeno, ao atingir pH médio de 5,35 ( $P < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSÃO

Maiores concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram encontrados em dietas contendo 20 e 80% concentrado. O pH apresentou uma redução linear com o passar do tempo de incubação, e assim como a produção de gases, apresentou uma relação direta com o nível de concentrado, onde quanto menor a relação volumoso concentrado menor pode ser o pH e maior a produção de gases.

Protozoários apresentaram uma nítida sensibilidade ao tempo de exposição em meio ácido, e apresentou mortalidade total em pH médio de 5,35.

Dentre os tratamentos, o que apresentou maior eficiência foi o que conteve 80% de concentrado, apresentando maior concentração de N-NH<sub>3</sub> (25,6 mL/dL), além de apresentar maiores valores de pH (5,86), assim como menor mortalidade e maior motilidade de protozoários ruminais, para volume de gás não se diferiu dos outros tratamentos.

Com o presente estudo, foi possível compreender o comportamento dos principais parâmetros fermentativos ruminais, com a alteração das relação volumoso:concentrado. Porém, para uma análise mais conclusiva, pode ser realizado um estudo do comportamento de toda microbiota ruminal, incluindo bactérias, protozoários e fungos.

## 6. REFERÊNCIAS

ARCURI, Pedro Braga *et al.* **Nutrição de ruminantes: Microbiologia do rúmen.** 2. ed. Jaboticabal-SP: FUNEP, 2011. 115-147 p.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, MD **Metabolismo do nitrogênio no rúmen.** *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. E9-E21, 2005.

CARVALHO, P.A. **Crescimento e composição da carcaça e dos cortes comerciais de cordeiros submetidos à restrição alimentar antes ou após o nascimento.** 2005. 198f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras.

CERDÀ, A. R. Fermentación ruminal, degradación protéica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo. 2003. 208 f. Tesis (Doctor en Veterinaria) – Programa de Producción Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2003.

CERDÀ, A. R. **Fermentación Ruminal, Degradación Protéica y Sincronización Energía-Proteína en Terneras en Cebo Intenso.** Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, 196 f., 2003

CLARKE, R. T. J. Protozoa in the rumen ecosystem. **Microbial ecology of the gut**, 1977.  
CLIMACO, Gilvania Correa. **Variação da população de protozoários, bactérias e fungos em bovinos submetidos à dieta de cana-de-açúcar suplementada com caroço de algodão.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CUNHA, José Diogo de Oliveira et al. **Acidose ruminal em caprinos.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

DA SILVA OLIVEIRA, Vinicius et al. CARBOIDRATOS FIBROSOS E NÃO FIBROSOS NA DIETA DE RUMINANTES E SEUS EFEITOS SOBRE A MICROBIOTA RUMINAL. 2016.  
DA SILVA, J.F; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes.** 3. ed. Viçosa- MG: LIVROCERES, 1979. 25-29 p.

DAI, Xiaoxia; FACIOLA, Antonio P. Avaliando estratégias para redução de protozoários ruminais e seus impactos na utilização de nutrientes e desempenho animal em ruminantes – uma meta-análise. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 10, p. 2648, 2019.

DE FIGUEIREDO NETO, Edson Ferreira. Análise microbiológica do líquido ruminal de bovinos criados no município de Parintins, AM: identificação, dinâmica e eficiência enzimática da microbiota. 2014.

DIAS, Helder Luis Chaves et al. Eficiência de síntese microbiana, pH e concentrações ruminais de amônia em novilhos F1 Limousin x Nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 555-563, 2000.

DOS SANTOS MAGAÇO, Fernando; DUARTE, Eduardo Robson. **Interação microbiana e metanogênese em ruminantes: uma revisão.** 2019.

ERNANDES, Mariane Ceschin. **Efeitos da uréia em dietas com duas proporções volumoso: concentrado no metabolismo ruminal e na produção de metano avaliados pela técnica de fermentação ruminal ex-situ (micro-rúmen) em búfalos e bovinos.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FATURI, Cristian et al. Fibra solúvel e amido como fontes de carboidratos para terminação de novilhos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2110-2117, 2006.

FRANZOLIN, Raul; DEHORITY, Burk A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2262-2267, 2010.

KAMRA, D. N. **Rumen Microbial Ecosystem.** Current Science, v. 89, p. 10-135, 2005.

KAMRA, Devki Nandan. **Ecossistema microbiano ruminal.** Ciência atual , pág. 124-135, 2005.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes.** 3. ed. Santa Maria- RS: UFSM, 2016. 15-35 p.

KRAUSE, D.O.; RUSSELL, J.B. **How many ruminal bacteria are there?** *Journal of Dairy Science*, 79:1467,1996.

LADEIRA, Márcio Machado et al. Balanço de nitrogênio, degradabilidade de aminoácidos e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen de ovinos alimentados com feno de *Stylosanthes guianensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2357-2363, 2002.

LIMA, Janaina Rosa de. Isolamento e caracterização de bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia. 2009.

LUCCI, C.S. **Nutrição e manejo de bovino leiteiro.** São Paulo: Manole, 1997. 169 p.

MAEDA, Emilyn Midori et al. Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes níveis de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 716-726, 2007.

MALAFIA, Pedro Antônio Muniz et al. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 370-380, 1998.

MILLEN, Danilo Domingues; ARRIGONI, Mario De Beni; PACHECO, Rodrigo Dias Lauritano (Ed.). **Rumenology.** Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2016.

MORGADO, Eliane da Silva et al. Potencial de produção de gás metano e dióxido de carbono in vitro dos ingredientes utilizados em dietas para ovinos. **Ciência animal brasileira**, v. 14, p. 413-417, 2013.

MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, C. J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, v.49, p.231- 253, 2000.

NIGRI, A. C. A. et al. População de protozoários ruminais em novilhos zebuínos alimentados com ou sem volumoso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1339-1345, 2017.



NOGUEIRA, Ú. T. et al. Predição da degradação da matéria seca pelo volume de gases utilizando a técnica in vitro semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 901-909, 2006.

NUSSIO, L.G; CAMPOS, F.P; LIMA, M.L. **Metabolismo de carboidratos estruturais**. In: NUTRIÇÃO de ruminantes. 2. ed. Jaboticabal- SP: FUNEP, 2011.

OLIVEIRA, V.; SANTANA, NETO JA; VALENÇA, R. L. Chemical and physiological characteristics of rumen fermentation in grazing cattle-Review. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1-21, 2013.

OWENS, F. N.; ZINN, R. **Metabolismo de la proteína en los ruminants**. In: CHURCH, C. D. El ruminante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Acribia, 1988. 641 p.

PAUL, S. S.; KAMRA, D. N.; SASTRY, V. R.B.; SAHU, N. P.; AGARWAL, N. **Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo**. Reproduction Nutrition Development, v. 44, n. 4, p. 313–319, 2004.

PAULA, Anderson Alves Garcia de et al. Ureia polímero e ureia pecuária como fontes de nitrogênio solúvel no rúmen: parâmetros ruminal e plasmático. 2009.

PAULA, Anderson Alves Garcia de et al. **Ureia polímero e ureia pecuária como fontes de nitrogênio solúvel no rúmen: parâmetros ruminal e plasmático**. 2009.

PEREIRA, Elzânia Sales et al. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 125-134, 2005.

REIS, Cândida Camila dos et al. **Protozoários ciliados no rúmen de bovinos Nelore e Cruzados Nelore x Europeu sob diferentes sistemas de alimentação**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

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

SALAZAR, Diego Reynaga; CORTINHAS, Cristina Simões; JR, José Esler Freitas.

Sincronismo energia-proteína: assimilação de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em ruminantes. **Pubvet, Universidade de São Paulo**, 2008.

SANTOS, F.A; PEDROSO, A. M. **Nutrição de ruminantes**: Metabolismo de proteínas. 2. ed. Jaboticabal- SP: FUNEP, 2011. 265-295 p.

SEO, J. K. et al. **Effects of synchronicity of carbohydrate and protein degradation on rumen fermentation characteristics and microbial protein synthesis**. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 26, n. 3, p. 358, 2013.

SCHUNK, Y.S. INCLUSÕES CRESCENTES DE *Tribulus terrestris* COMO ADITIVO EM DIETAS PARA OVINOS CONFINADOS. In: SCHUNK, Y.S. **INCLUSÕES CRESCENTES DE *Tribulus terrestris* COMO ADITIVO EM DIETAS PARA OVINOS CONFINADOS**. 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, [S. l.], 2023.

SOUZA, Johnny Maciel de. **Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUZA, Nedilse Helena de. **Efeitos de níveis crescentes de fibra em detergente neutro na dieta sobre a fermentação e digestão ruminal em bubalinos e bovinos**. 1999. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

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

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.

VALADARES FILHO, Sebastião de Campos; PINA, Douglas dos Santos. **Nutrição de ruminantes: Fermentação ruminal**. 2. ed. Jaboticabal- SP: FUNEP, 2011. 161-189 p.

VAN SOEST, P. J. Microbes in the Gut. In: **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Cornell University Press, v.2, p.253-281, 1994.

WEI, Xiao et al. **Variações dinâmicas nas características da fermentação ruminal e na composição da comunidade bacteriana durante a fermentação in vitro**. *Fermentação*, v. 8, n. 6, pág. 276, 2022.

WLODARSKI, Leticia et al. **Determinação e quantificação de protozoários ciliados e bactérias do rúmen de bovinos em pastagens temperadas e tropicais**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

WLODARSKI, Letícia et al. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 11, p. 1-20, 2017.