

ANTÓNIO MANUEL MOITINHO NOGUEIRA RODRIGUES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA E AZOTADA NA
DIGESTIBILIDADE E NA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE
ALIMENTOS FIBROSOS**



**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO OURO
VILA REAL, 2000**

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO OURO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA E AZOTADA NA
DIGESTIBILIDADE E NA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO*
DE ALIMENTOS FIBROSOS**

António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues

Dissertação original expressamente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal de acordo com o disposto no Decreto-Lei nº 216/92 de 13 de Outubro.

Vila Real, 2000

Este trabalho foi realizado no âmbito do PRODEP, medida 5, acção 5.2 - Formação Avançada no Ensino Superior

À Dadinha, ao Ricardo, à Catarina
e à Margarida

AGRADECIMENTOS

Ao finalizarmos este trabalho não queremos deixar de expressar o mais sincero reconhecimento a todos aqueles que, sendo pessoas ou instituições, contribuíram com a sua ajuda para que o mesmo fosse levado a bom termo.

À Direcção da Escola Superior Agrária de Castelo Branco e ao seu Conselho Científico pelas facilidades concedidas, determinantes para a concretização deste trabalho.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, Professor Doutor José Torres Pereira, pelos recursos humanos e materiais postos à disposição, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Sequeira, nosso orientador científico, pela preciosa ajuda, conhecimentos, sugestões e críticas que permitiram filtrar a informação de uma forma rigorosa. Agradecemos também a sua amizade, demonstrada inúmeras vezes ao longo do tempo em que decorreu o trabalho e que estamos certos, prevalecerá para além do mesmo.

Ao Professor Doutor Miguel Rodrigues, pelos conselhos, pela ajuda e pela amizade incondicional.

Ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro nas pessoas das Sras. Maria José Escaleira, Agelina Marques, Inês Pereira, Sofia Moura e Otília Coutinho, na realização das análises laboratoriais.

Aos Srs. Joaquim Brigas, Arlindo Reis e à Sra. Maria Teixeira, pelo trabalho prestado relativamente aos animais.

A todos os meus amigos pelo incentivo dado para a conclusão deste trabalho e por serem meus amigos.

Aos meus pais e irmã gostaria de expressar um agradecimento muito especial pelo carinho com que me receberam, pela amizade que demonstraram e pelo grande incentivo em todas as horas fáceis e difíceis.

Aos meus filhos pelo carinho que me manifestaram em todas as horas, mesmo naquelas que não lhes foram dedicadas.

À Dadinha pelo grande e incondicional apoio e por ter conseguido manter a família unida, mesmo nos momentos em que não estávamos todos juntos.

A todos quantos de uma forma ou de outra possam ter contribuído para a realização deste trabalho, expresso os meus sentidos agradecimentos.

ÍNDICE

Resumo	VIII
Abstract	X
Lista de Abreviaturas	XII
Índice de Figuras	XV
Índice de Quadros	XIX

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Particularidades da Alimentação dos Ruminantes	3
Capítulo 3 – Principais Constituintes da Parede Celular	9
3.1 - Celulose	12
3.2 - Hemiceluloses	15
3.3 – Pectinas	20
3.4 – Lenhina e Ácidos Fenólicos	23
3.5 – Proteínas da Parede Celular	28
Capítulo 4 – Degradação da Parede Vegetal	33
4.1 – Enzimas Necessárias para Degradar a Parede Vegetal	33
4.2 – Os Microrganismos do Rúmen Implicados na Digestão da Parede Celular	37
4.2.1 - Bactérias	37
4.2.2 - Protozoários	40
4.2.3 - Fungos	43
4.3 – Equipamento Enzimático dos Microrganismos do Rúmen	44
4.3.1 – Descrição do equipamento enzimático	45
4.3.2 – Organização dos sistemas enzimáticos	47
Capítulo 5 – Necessidades Azotadas e Metabolismo Azotado dos Microrganismos do Rúmen	51

5.1 – Degradação do Azoto Proteico	52
5.2 – Degradação de Outros Compostos Azotados	59
5.2.1 – Ácidos nucleicos	59
5.2.2 – Azoto não proteico	60
5.3 – Síntese dos Constituintes Microbianos Azotados	61
5.4 – Eficiência Microbiana e Crescimento	63
5.4.1 - Y_{glucose}	63
5.4.2 – Y_{ATP}	65

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

Capítulo 6 – Efeito da Suplementação com Ureia e Polpa de Citrinos na Cinética da Fermentação <i>in vitro</i> de Alimentos Fibrosos	75
6.1 – Introdução	75
6.2 – Material e Métodos	78
6.2.1 – Alimentos utilizados	78
6.2.2 – Composição química dos alimentos utilizados	79
6.2.3 – Fonte de inóculo de rúmen	80
6.2.4 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i>	80
6.2.5 – Modelo matemático	81
6.2.6 – Análise estatística	82
6.3 – Resultados	83
6.3.1 – Composição química dos alimentos utilizados	83
6.3.2 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i> obtida pelo método da produção de gás – feno de prado natural	84
6.3.3 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i> obtida pelo método da produção de gás – palha de trigo	91
6.3.4 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i> obtida pelo método da produção de gás – polpa de citrinos desidratada	99
6.4 – Discussão	102
6.5 – Considerações Finais	117
6.6 – Conclusões	119
Capítulo 7 – Digestibilidade <i>in vitro</i> e a Cinética de Fermentação pelo Método da Produção de Gás em Alimentos Fibrosos	121

7.1 – Introdução	121
7.2 – Material e métodos	124
7.2.1 - Digestibilidade <i>in vitro</i>	125
7.2.2 - Cinética de fermentação <i>in vitro</i>	126
7.3 - Resultados	126
7.3.1 - Composição química dos alimentos utilizados	126
7.3.2 – Digestibilidade <i>in vitro</i>	128
7.3.3 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i>	130
7.3.4 – Cinética de fermentação <i>in vitro</i> sem resíduo	136
7.4 - Discussão	139
7.4.1 – Digestibilidade <i>in vitro</i>	140
7.4.2 – Eficácia do modelo utilizado	146
7.4.3 – Efeito dos constituintes da parede celular nos parâmetros calculados após aplicação do modelo à cinética de fermentação	151
7.4.4 – Volume de gás produzido e substrato efectivamente degradado	156
7.5 – Considerações Finais	162
7.6 – Conclusões	166
Capítulo 8 – Bibliografia	169
ANEXO A	199
ANEXO B	207

RESUMO

Na primeira parte do trabalho efectuámos uma revisão bibliográfica abordando algumas particularidades da alimentação dos ruminantes, animais que desempenham um papel determinante na manutenção dos sistemas de agricultura sustentada (Capítulo 2).

No Capítulo 3 demos ênfase à caracterização da estrutura da parede celular e aos factores que afectam a sua digestibilidade.

Desenvolvemos depois (Capítulo 4) aspectos relacionados com os processos de degradação da parede celular. Os microrganismos presentes no rúmen, produzem uma multiplicidade de enzimas que conferem ao ecossistema ruminal particularidades específicas que permitem ao ruminante utilizar alimentos fibrosos.

No Capítulo 5, abordámos o metabolismo azotado da população microbiana do rúmen, referindo aspectos relacionados com a síntese dos seus constituintes azotados, com a degradação do azoto proteico e não proteico e com a eficiência microbiana e crescimento.

Na parte experimental do nosso trabalho analisámos os efeitos que diferentes níveis de suplementação de dois alimentos forrageiros, com uma fonte azotada (ureia) e uma fonte energética (polpa de citrinos desidratada), tiveram na cinética de fermentação *in vitro* e na digestibilidade *in vitro* daqueles alimentos fibrosos. Para o efeito usámos um feno de prado natural e uma palha de trigo que foram estudados individualmente ou em mistura com a polpa de citrinos desidratada e/ou ureia. A cinética de fermentação foi determinada utilizando o método da produção de gás, com as amostras a serem incubadas durante 96 horas com licor de rúmen mais uma solução nutritiva tampão. O modelo logístico de duas fases foi utilizado para descrever a cinética de fermentação *in vitro*.

Numa primeira fase (Capítulo 6), verificámos que a adição de ureia, entre valores que variaram de 1,43% a 3,91% da MS, provocou o aumento do tempo de latência e uma progressiva diminuição dos valores obtidos para o volume de gás produzido e para a taxa máxima de produção de gás das primeira e segunda fases de fermentação, e para o volume total de gás produzido durante as 96 horas de incubação. A adição de polpa de citrinos melhorou significativamente a produção de gás e a taxa máxima de produção de gás da primeira fase de fermentação e o volume total de gás produzido durante o período de incubação, reflectindo maior actividade microbiana no início da incubação do substrato. A ureia, como única fonte azotada suplementar de fenos e palhas, só deverá ser adicionada se também for usado um

suplemento energético. Com excepção dos substratos em que só foi utilizada polpa de citrinos+ureia, a produção de gás na segunda fase de fermentação foi significativamente maior do que na primeira fase.

No Capítulo 7, verificámos que os resultados médios obtidos para as digestibilidades *in vitro* da MS e do NDF, determinadas após 48 horas e 96 horas de incubação, foram idênticos. Analisando caso a caso, encontrámos diferenças significativas em 58,3% dos substratos. Verificámos que, os coeficientes de correlação e de determinação calculados entre a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF ao fim de 48 horas de incubação e os parâmetros que definem a cinética de fermentação e o conteúdo das amostras em NDF, ADF, hemicelulose e celulose, foram mais elevados do que quando se considerou digestibilidade *in vitro* após 96 horas de incubação. Concluimos que, enquanto não estiverem disponíveis maior número de resultados, a digestibilidade da MS e do NDF deve ser sempre calculada após 48 horas de incubação. Os coeficientes de determinação muito elevados entre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca após 48 horas de incubação e o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação, a taxa máxima de produção de gás na primeira fase e o volume total de gás durante o período de incubação permitiram calcular equações de regressão ($0,969 < r^2 > 0,852$), que poderão ser utilizadas para estimar, com rigor, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos alimentos a partir de alguns valores que definem a cinética de fermentação *in vitro*. A partir dos coeficientes de correlação negativos elevados, determinados entre a fracção ADL das amostras e a digestibilidade *in vitro* da MS ($r = -0,901$) e do NDF ($r = -0,622$), concluimos que a lenhina influenciou negativamente a digestibilidade dos substratos. O modelo logístico de duas fases permitiu estimar com precisão os parâmetros que definem a cinética da fermentação *in vitro* mesmo utilizando substratos com uma composição química muito diferente. Os coeficientes de determinação (r^2) calculados foram muito elevados variando entre 0,998 e 0,989. Determinámos coeficientes de correlação elevados ($0,797 < r > 0,614$) entre o tempo de latência e a quantidade de NDF, ADF, ADL, hemicelulose e celulose presente na amostra. Verificámos que a quantidade de substrato efectivamente degradado necessária para a produção de 1 ml de gás, diminuiu com o aumento da digestibilidade *in vitro* dos alimentos e determinámos uma correlação elevada entre a quantidade de substrato efectivamente degradado, e os volumes de gás produzidos na primeira fase de fermentação e durante todo o período de incubação.

ABSTRACT

In Part I of this work we have done a brief review about some particularities of the feeds for ruminants, animals that play an important role in the maintenance of the agricultural systems (Chapter 2).

In Chapter 3, we emphasise the characterisation of the structure of plant cell wall and the factors affecting cell wall digestibility.

We also analysed some aspects related with the process of degradation of plant cell wall. The rumen microorganisms are able to produce a multiplicity of enzymes that confers to the rumen ecosystem particularities that allow the ruminant to use feeds with high fibre contents (Chapter 4).

The Chapter 5 is a review of the nitrogen metabolism in the rumen microorganisms referring aspects related with microbial protein synthesis, with the degradation of protein and non-protein nitrogen and with the microbial efficiency and microbial growth.

In Part II of this work we analyse the effects of different levels of supplementation with urea and dried citrus pulp had on the *in vitro* fermentation kinetics and *in vitro* digestibility of different forages. We used natural grassland hay and a wheat straw that were studied individually or mixed with the dried citrus pulp and/or urea. The fermentation kinetics was determined using the *in vitro* gas production technique during 96 hours incubation with buffered rumen fluid. A dual-pool logistic model was used to describe *in vitro* fermentation kinetics.

In Chapter 6 we saw that the addition of 1,43% to 3,91% of urea caused the increase of initial lag time and the reduction of the amount of gas production in the first and second phase of fermentation, the maximum rate of gas production in the first and second phase and the total gas production during the feed samples incubation. The addition of dried citrus pulp improved the fermentation kinetics parameters at the first phase, as a consequence of a high microbial activity during the initial phase of the samples incubation. The urea, as a unique nitrogen supplement of hays and straws should only be added if an energy supplement is also used. With exception of the samples with only citrus pulp plus urea, the production of gas during the second phase of fermentation was significantly higher than during the first phase of the incubation period.

In Chapter 7, we verified that the average results from the *in vitro* DM and NDF digestibility, determined after 48 and 96 hours of incubation, had been identical. However when we analysed the results, feed by feed, we found significant differences

in 58,3% of samples. The r and r^2 data calculated between *in vitro* DM and NDF digestibility after 48 hours of incubation and the parameters that define fermentation kinetics and the NDF, ADF, hemicelluloses and cellulose of the samples was higher than with the *in vitro* DM and NDF digestibility gotten after 96 hours of incubation. We conclude that, while they will not be available greater number of data, the DM and NDF digestibility always must be calculated after 48 hours of incubation. The high r and r^2 coefficients between *in vitro* DM digestibility after a 48 hours incubation and the gas volume produced in the first phase of fermentation, the maximum rate of gas production in the first phase of fermentation and the total gas volume produced during all the incubation period had allowed us to calculate some equations ($0,969 < r^2 > 0,852$) that could be used to estimate the *in vitro* DM digestibility using some *in vitro* fermentation kinetics values. In this work we confirm the negative effect of the lignin content and the digestibility of substrate because we found a high negative correlation between the feeds ADL and the *in vitro* DM ($r = -0,901$) and NDF ($r = -0,622$) digestibility of the samples. The dual-pool logistic model allowed us to estimate with accuracy ($0,998 < r^2 > 0,989$) the data that define *in vitro* kinetics fermentation using different feed samples with very different chemical composition. We found a high correlation ($0,797 < r > 0,614$) between lag time and NDF, ADF, ADL, hemicelulose and cellulose concentration of the sample. The amount of truly degraded substrate necessary for the production of 1 ml of gas, diminished with the increase of the *in vitro* feed digestibility and we determined a high correlation between the amount of truly degraded substrate, and the gas production in the first phase of fermentation and the total gas production during a 96 hours incubatio.

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	tempo de latência
(μ)	taxa de crescimento microbiano
$(\mu_{m\acute{a}x})$	taxa de crescimento obtida sem energia gasta para manutenção
(μ_x)	verdadeiro crescimento
(a)	crescimento negativo constante
(ax)	crescimento negativo
(m)	quantidade de energia necessária para a manutenção celular microbiana
(m/μ)	energia para manutenção
μ_{mA}	taxa máxima de produção de gás da primeira fase
μ_{mA}/V_{FA}	taxa específica de digestão da primeira fase
μ_{mB}	taxa máxima de produção de gás da segunda fase
μ_{mB}/V_{FB}	taxa específica de digestão da segunda fase
(q)	taxa específica de utilização do substrato
$(x_{m\acute{a}x})$	produção de biomassa celular máxima
2FU	feno+ureia (16% PB)
2FUP	feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB)
2PaU.....	palha+ureia (16% PB)
2PaUP.....	palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB)
2UP.....	polpa de citrinos+ureia (16% PB)
A.....	arabinose
ADF.....	fibra de detergente ácido
ADL.....	lenhina de detergente ácido
AFRC.....	Agricultural and Food Research Council
AGV.....	ácidos gordos voláteis
AOAC.....	Association of Official Analytical Chemists
C.....	celobiose
Ca^{++}	cálcio
CH_4	metano
CMC.....	carboximetilcelulose
CO_2	dióxido de carbono
Da.....	Dalton
Dig48.....	digestibilidade após 48 horas de incubação
Dig96.....	digestibilidade após 96 horas de incubação
DLC.....	domínios de ligação à celulose
EDTA.....	etileno-diamida-tetracetato
EPM.....	erro padrão da média
F	feno de prado natural

Fr	frutose
FU	feno+ureia (12% PB)
FUP.....	feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB)
G.....	glucose
Ga.....	galactose
GR.....	gramínea
H	hidrogénio
h.....	hora
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HEC.....	hexa-etilcelulose
K ⁺	potássio
kDa.....	kDalton
KMnO ₄	permanganato de potássio
L.....	lactose
LG.....	leguminosas
M.....	maltose
MJ.....	megajoules
Mn.....	manose
MO.....	matéria orgânica
MS	matéria seca
ATP.....	adenosina trifosfato
ADP.....	adenosina difosfato
n.....	número da amostra
Na ⁺	sódio
NAD.....	nicotinamida adenina dinucleotido
NADP.....	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NDF.....	fibra de detergente neutro
NH ₃	amónia
NRC.....	National Research Council
Ø.....	diâmetro
P.....	probabilidade
Pa	palha de trigo
PaU.....	palha+ureia (12% PB)
PaUP.....	palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB)
PB.....	proteína bruta
PEP.....	fosfoenol piruvato
pH.....	concentração hidrogeniónica
R.....	ramnose
r.....	coeficiente de correlação
r ²	coeficiente de determinação

RG I.....	ramnogalacturona I
RG II.....	ramnogalacturona II
RNA.....	ácidos ribonucleicos
S.....	sacarose
S ₁	camada S ₁
S ₂	camada S ₂
S ₃	camada S ₃
t.....	tempo
UP.....	polpa de citrinos+ureia (12% PB)
UTAD.....	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
V.....	volume de gás produzido
V _{FA}	volume de gás produzido na primeira fase
V _{FB}	volume de gás produzido na segunda fase
x	matéria seca celular resultante do crescimento bacteriano
X.....	xilose
XILA.....	xilanase A
XINA	xilanase

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1 – Representação esquemática do metabolismo no rúmen, dos hidratos de carbono estruturais	4
Figura 2.2 - Modelo para a produção e utilização do hidrogénio metabólico na fermentação ruminal	5
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1 - Diagrama da estrutura da parede celular de uma célula vegetal tipo	10
Figura 3.2 – Representação esquemática da parede celular secundária.	11
Figura 3.3 - Distribuição das principais componentes estruturais da parede celular	12
Figura 3.4 – Representação esquemática da celobiose	13
Figura 3.5 – Estrutura de algumas oses incorporadas nas hemiceluloses.	16
Figura 3.6 - Estrutura química parcial de algumas hemiceluloses.	17
Figura 3.7 – Estrutura da ramnogalacturonana.	21
Figura 3.8 - Estrutura dos três álcoois constituintes da lenhina.	23
Figura 3.9 – Representação esquemática da estrutura complexa da lenhina do abeto.	24
Figura 3.10 – Representação esquemática da biossíntese dos monómeros precursores da lenhina	27
Figura 3.11 – Estrutura da parede primária da célula vegetal, com destaque para o posicionamento das proteínas parietais	30
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1 - Modelo mostrando a associação entre a celulose, as hemiceluloses e a lenhina na parede celular da madeira	34
Figura 4.2 – Representação esquemática da composição da parede primária de uma gramínea	35
Figura 4.3 – Representação esquemática da acção enzimática sobre as principais ligações químicas que se encontram na parede celular das plantas forrageiras	36

Figura 4.4 - Estrutura modular de três xilanases (XILA, XINB e XILD) de <i>Ruminococcus flavefaciens</i> 17	47
Figura 4.5 – Representação da organização de um complexo multi-enzimático à superfície da membrana bacteriana	48
CAPÍTULO 5	
Figura 5.1 - Degradação das proteínas no rúmen	52
Figura 5.2 -. Esquema representando a síntese de alguns aminoácidos por bactérias anaeróbicas do rúmen que utilizam o amoníaco (NH ₃) em baixas concentrações (Via 1) e em elevadas concentrações (Via 2)	62
Figura 5.3 – Representação esquemática da partição dos produtos resultantes da fermentação dos alimentos pelo microrganismos do rúmen	68
Figura 5.4 - Efeito do coeficiente de manutenção (m) na produção de biomassa bacteriana num meio com limitações energéticas	71
Figura 5.5 - Efeito do coeficiente de manutenção (m) na produção de biomassa bacteriana num meio com limitações energéticas.	73
CAPÍTULO 6	
Figura 6.1 - Curvas da cinética de fermentação do feno (F)	86
Figura 6.2 - Produção de gás da primeira fase de fermentação do feno (F)	88
Figura 6.3 - Produção de gás da segunda fase de fermentação do feno (F)	89
Figura 6.4 - Taxa de fermentação do feno (F)	90
Figura 6.5 - Curva da cinética de fermentação da palha (Pa)	92
Figura 6.6 - Produção de gás da primeira fase de fermentação da palha (Pa)	96
Figura 6.7 - Produção de gás da segunda fase de fermentação da palha (Pa)	97
Figura 6.8 - Taxa de fermentação da palha (Pa)	98
Figura 6.9 - Volume de gás produzido durante a primeira fase de fermentação, durante a segunda fase de fermentação e durante todo o período de incubação da polpa de citrinos	100
Figura 6.10 - Taxa de fermentação da polpa de citrinos	101
CAPÍTULO 7	
Figura 7.1 - Curvas da cinética de fermentação dos alimentos utilizados	132

Figura 7.2 - Curvas da produção de gás durante a primeira fase de fermentação dos alimentos utilizados	133
Figura 7.3 - Curvas da produção de gás durante a segunda fase de fermentação dos alimentos utilizados	134
Figura 7.4 - Taxas de fermentação dos alimentos utilizados	135
Figura 7.5 - Representação gráfica dos valores observados e dos valores estimados após aplicação do modelo logístico de duas fases aos resultados obtidos	148
Figura 7.6 – Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação	153
Figura 7.7 – Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o volume de gás produzido na segunda fase de fermentação	154
Figura 7.8 – Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o tempo de latência	155
Figura 7.9 – Representação gráfica da equação de regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado e o volume total de gás	158
Figura 7.10 – Representação gráfica da equação de regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado necessária para a produção de 1 ml de gás e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca	160

ÍNDICE DE QUADROS	PÁGINA
CAPÍTULO 3	
Quadro 3.1 - Principais glúcidos e outros monómeros componentes da parede celular vegetal	11
Quadro 3.2 - Constituintes da parede celular de algumas forragens	13
Quadro 3.3 - Digestibilidade da celulose em diferentes células vegetais	14
CAPÍTULO 4	
Quadro 4.1 - Utilização dos hidratos de carbono pelas bactérias ruminais, celulolíticas e não celulolíticas	39
Quadro 4.2 - Nível da digestão da parede celular das forragens e utilização dos produtos resultantes por culturas puras de diferentes estirpes bacterianas	40
Quadro 4.3 - Degradação (%) de substratos celulósicos por culturas puras de protozoários, durante 24 horas	41
Quadro 4.4 – Efeito do substrato sobre alguns géneros de protozoários do rúmen	42
Quadro 4.5 - Efeito dos protozoários ciliados do rúmen sobre a digestão dos constituintes da parede vegetal	42
Quadro 4.6 - Degradação de diversos substratos vegetais por diferentes espécies fúngicas, após incubação <i>in vitro</i> durante seis dias	44
CAPÍTULO 5	
Quadro 5.1 - Composição típica do gás ruminal	57
Quadro 5.2 - Produção de massa microbiana, obtida a partir de diferentes microrganismos, quando se utilizou a glucose como fonte energética.	64
Quadro 5.3 - Cálculo das necessidades de ATP para a formação de biomassa bacteriana	66
CAPÍTULO 6	
Quadro 6.1 - Composição química dos alimentos utilizados: feno de prado natural (F); palha de trigo (Pa); polpa de citrinos (P).	83
Quadro 6.2 - Composição química das misturas de alimentos utilizados	84

Quadro 6.3 - Efeito da utilização de dois níveis de proteína bruta (PB), com e sem polpa de citrinos, na variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação <i>in vitro</i> (F – feno...	87
Quadro 6.4 - Efeito da utilização de dois níveis de proteína bruta (PB) na variação dos parâmetros obtidos com a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação <i>in vitro</i> (Pa – palha...	93
Quadro 6.5 - Efeito da adição de ureia à polpa de citrinos, na variação dos parâmetros obtidos, após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética de fermentação <i>in vitro</i>	99
CAPÍTULO 7	
Quadro 7.1 - Composição química dos alimentos utilizados	127
Quadro 7.2 - Resultados da digestibilidade (%) <i>in vitro</i> da matéria seca (MS) e dos constituintes celulares (NDF) após 48 horas (Dig48) e 96 horas de incubação (Dig96)	129
Quadro 7.3 - Valores determinados para a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (Dig48 MS) e da fracção detergente neutra (Dig48 NDF) após 48 horas de incubação e para a digestibilidade após 96 horas de incubação (Dig96 MS) (Dig96NDF).	130
Quadro 7.4 - Variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação <i>in vitro</i> dos diferentes alimentos utilizados	131
Quadro 7.5 - Variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação <i>in vitro</i> do substrato efectivamente degradado	137
Quadro 7.6 - Valores médios dos diferentes parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação <i>in vitro</i> do substrato total (ST) e do substrato efectivamente degradado (SED)	138
Quadro 7.7 - Coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) (n=12) entre a digestibilidade <i>in vitro</i> da MS e do NDF das amostras (Dig) e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação <i>in vitro</i> .	141
Quadro 7.8 - Coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) (n=12) entre a digestibilidade <i>in vitro</i> da MS e do NDF das amostras ao fim de 96 horas de incubação (Dig96) e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação <i>in vitro</i> .	143
Quadro 7.9 – Coeficientes de correlação e de determinação entre os constituintes da parede celular e a digestibilidade da MS e do NDF ao fim de 48 (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	144

Quadro 7.10 - Coeficientes de determinação (r^2) obtidos por vários autores após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação <i>in vitro</i> de diferentes substratos.	149
Quadro 7.11 - Coeficientes de correlação e de determinação entre o NDF e o ADF da amostra e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação <i>in vitro</i>	151
Quadro 7.12 – Coeficientes de correlação e de determinação entre a hemicelulose e a celulose da amostra e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação <i>in vitro</i>	152
Quadro 7.13 – Substrato efectivamente degradado (mg.ml^{-1}) necessário para a produção de 1 ml de gás na primeira fase de fermentação (V_{FA}) na segunda fase de fermentação (V_{FB}) e no período total de 96 horas de incubação (V).	159
ANEXO A	
Quadro 1.A – Composição química dos alimentos utilizados (g.kg MS^{-1}) (MO - matéria orgânica; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL – lenhina de detergente ácido; Hemic - Hemiceluloses; Celul - celulose).	199
Quadro 2.A – Análise de variância da fracção MO dos alimentos utilizados.	200
Quadro 3.A – Análise de variância da fracção PB dos alimentos utilizados.	200
Quadro 4.A – Análise de variância da fracção NDF dos alimentos utilizados.	200
Quadro 5.A – Análise de variância da fracção ADF dos alimentos utilizados.	200
Quadro 6.A – Análise de variância da fracção ADL dos alimentos utilizados.	200
Quadro 7.A – Análise de variância da fracção hemicelulose dos alimentos utilizados.	200
Quadro 8.A – Análise de variância da fracção celulose dos alimentos utilizados.	200
Quadro 9.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	201
Quadro 10.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	201
Quadro 11.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	201
Quadro 12.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	201
Quadro 13.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202

Quadro 14.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202
Quadro 15.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202
Quadro 16.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202
Quadro 17.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202
Quadro 18.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.	202
Quadro 19.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	203
Quadro 20.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	203
Quadro 21.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	203
Quadro 22.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	203
Quadro 23.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 24.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 25.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 26.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 27.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 28.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.	204
Quadro 29.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	205
Quadro 30.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	205
Quadro 31.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de	

produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	205
Quadro 32.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	205
Quadro 33.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	205
Quadro 34.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	206
Quadro 35.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	206
Quadro 36.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	206
Quadro 37.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	206
Quadro 38.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.	206
ANEXO B	
Quadro 1.B – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos utilizados.	207
Quadro 2.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 3.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 4.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 5.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 6.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 7.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	208
Quadro 8.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	209
Quadro 9.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	209
Quadro 10.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.	209

Quadro 11.B – Variação da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e do NDF após 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação dos diferentes substratos.	210
Quadro 12.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 13.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 14.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento F ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 15.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 16.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 17.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento 2FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	211
Quadro 18.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento 2FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 19.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento Pa ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 20.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 21.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 22.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento 2PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 23.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento 2PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	212
Quadro 24.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213

Quadro 25.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do alimento 2UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213
Quadro 26.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento F ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213
Quadro 27.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213
Quadro 28.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213
Quadro 29.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento 2FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	213
Quadro 30.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento 2FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 31.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento Pa ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 32.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 33.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 34.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento 2PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 35.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento 2PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	214
Quadro 36.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	215
Quadro 37.B – Análise de variância da digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF do alimento 2UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.	215
Quadro 38.B – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado.	216
Quadro 39.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217
Quadro 40.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217
Quadro 41.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217

Quadro 42.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217
Quadro 43.B – Análise de variância do parâmetro na μ_{mB} cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217
Quadro 44.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	217
Quadro 45.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	218
Quadro 46.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	218
Quadro 47.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.	218
Quadro 48.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	218
Quadro 49.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	218
Quadro 50.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	218
Quadro 51.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 52.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 53.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 54.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 55.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 56.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção	

de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.	219
Quadro 57.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 58.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 59.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 60.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 61.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 62.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	220
Quadro 63.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 64.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 65.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 66.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 67.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 68.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	221
Quadro 69.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222

Quadro 70.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222
Quadro 71.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222
Quadro 72.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222
Quadro 73.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222
Quadro 74.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	222
Quadro 75.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 76.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 77.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 78.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 79.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 80.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	223
Quadro 81.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224
Quadro 82.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224
Quadro 83.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224

Quadro 84.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224
Quadro 85.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224
Quadro 86.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	224
Quadro 87.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 88.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 89.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 90.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 91.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 92.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	225
Quadro 93.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	226
Quadro 94.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	226
Quadro 95.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	226
Quadro 96.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	226
Quadro 97.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	226
Quadro 98.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de	

incubação (Dig48).	226
Quadro 99.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	227
Quadro 100.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	227
Quadro 101.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	227
Quadro 102.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	227
Quadro 103.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	227
Quadro 104.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	227
Quadro 105.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	228
Quadro 106.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	228
Quadro 107.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	228
Quadro 108.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	228
Quadro 109.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	228
Quadro 110.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).	228
Quadro 111.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	229
Quadro 112.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo	

em celulose da amostra e a digestibilidade <i>in vitro</i> do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).	229
Quadro 113.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o NDF da amostra.	229
Quadro 114.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o NDF da amostra.	229
Quadro 115.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o NDF da amostra.	229
Quadro 116.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o NDF da amostra.	229
Quadro 117.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o NDF da amostra.	230
Quadro 118.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o NDF da amostra.	230
Quadro 119.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o NDF da amostra.	230
Quadro 120.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o NDF da amostra.	230
Quadro 121.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o NDF da amostra.	230
Quadro 122.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o ADF da amostra.	230
Quadro 123.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o ADF da amostra.	231
Quadro 124.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o ADF da amostra.	231
Quadro 125.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o ADF da amostra.	231
Quadro 126.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o ADF da amostra.	231
Quadro 127.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o ADF da amostra.	231
Quadro 128.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o ADF da amostra.	231
Quadro 129.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o ADF da amostra.	232

Quadro 130.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o ADF da amostra.	232
Quadro 131.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	232
Quadro 132.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	232
Quadro 133.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	232
Quadro 134.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	232
Quadro 135.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	233
Quadro 136.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	233
Quadro 137.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	233
Quadro 138.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	233
Quadro 139.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o conteúdo em hemicelulose da amostra.	233
Quadro 140.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o conteúdo em celulose da amostra.	233
Quadro 141.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 142.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 143.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 144.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 145.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 146.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o conteúdo em celulose da amostra.	234
Quadro 147.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o conteúdo em celulose da amostra.	235

Quadro 148.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o conteúdo em celulose da amostra.	235
Quadro 149.B – Análise de variância da regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado (SED) e o parâmetro V (Figura 7.9).	235
Quadro 150.B – Análise de variância da regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado (SED) necessário para a produção de 1 ml de gás e a digestibilidade <i>in vitro</i> (Dig48) da matéria secam (Figura 7.10).	235

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

As espécies animais, durante o longo período de evolução, desenvolveram particularidades anatómicas directamente relacionadas com o tipo de alimentos a que dão preferência. O pescoço na girafa, os caninos e os dentes sectoriais nos carnívoros, o estômago nos ruminantes e o instinto de mamar nos mamíferos, constituirão alguns exemplos de uma evolução condicionada pela alimentação.

A associação com a população microbiana celulolítica, processo que os herbívoros adoptaram para beneficiarem de enzimas hidrolíticas dos constituintes celulares das paredes vegetais, ter-se-á manifestado vantajosa ao permitir explorar situações alimentares variadas. Como refere SEQUEIRA (1988), o intestino grosso, em especial nas regiões do ceco e do cólon oferece, na generalidade dos herbívoros, um ambiente quase ideal para o crescimento das bactérias anaeróbias mesofílicas. Existe controlo de temperatura e pH, renovação contínua do substrato e remoção da fracção indigestível bem como das substâncias inibidoras entretanto produzidas.

A parede celular das plantas constitui não só uma importante fonte de nutrientes como também um factor de saúde, fundamental para o tracto digestivo dos mamíferos. Mesmo para os humanos, que consomem as dietas típicas das sociedades industrializadas, os produtos da fermentação microbiana da fibra fornecem mais de 10% do total da energia ingerida

(CHESSON *et al.*, 1995). Esta percentagem é substancialmente maior em grande parte dos animais com interesse zootécnico, podendo atingir os 40% ou mais, em pequenos ruminantes em pastoreio, ovinos e caprinos, onde as forragens podem corresponder ao total da dieta. Mesmo em bovinos criados em sistemas de produção intensiva, como os novilhos de engorda em "feedlots" e as vacas leiteiras de elevada produção, que consomem elevadas quantidades de alimentos concentrados, a taxa e a extensão da degradação da parede celular dos alimentos forrageiros utilizados são factores importantes que influenciam a ingestão e o fornecimento de nutrientes necessários à produção (CHESSON *et al.*, 1995).

“No departamento metabólico, onde se processa o metabolismo intermediário e seu controlo, residirá a razão da deposição dos componentes do produto animal (carne e leite) a partir dos nutrientes absorvidos e transformados em metabolitos orgânicos, estes também com origem nos tecidos e órgãos do animal.”

A. Vaz Portugal, 1998

Capítulo 2 – PARTICULARIDADES DA ALIMENTAÇÃO DOS RUMINANTES

Os ruminantes, pela posição que ocupam na cadeia alimentar, desempenham papel relevante na manutenção de sistemas de agricultura sustentada. Alguns constituintes dos alimentos forrageiros como o azoto não proteico, as hemiceluloses e a celulose, o polímero glucosídico mais abundante nas plantas devido à sua maior participação na parede celular, não podem ser digeridos ou utilizados convenientemente pelos monogástricos. No entanto, os ruminantes convertem-nos em produtos como carne, leite, lã e trabalho, úteis para o Homem.

As características funcionais da dentadura do ruminante evoluíram no sentido de permitir o corte para a ingestão rápida dos alimentos e posterior mastigação minuciosa e metódica do conteúdo ruminal. O estômago secretor é precedido de três compartimentos um dos quais, o rúmen, está particularmente desenvolvido, podendo considerar-se uma verdadeira câmara de armazenamento e fermentação (JARRIGE *et al.*, 1995).

Os alimentos são previamente expostos à digestão microbiana no retículo/rúmen e só depois são sujeitos à acção das enzimas do próprio animal (VAN NEVEL e DEMEYER; 1996).

Como já foi referido, os glúcidos estruturais dos vegetais constituem a principal fonte de energia que os ruminantes podem indirectamente utilizar uma vez que, aqueles compostos, são refractários à acção das enzimas que os animais superiores são capazes de sintetizar no seu aparelho digestivo.

A hidrólise das substâncias passíveis de fermentação (a oligómeros e a monómeros), nomeadamente a celulose, é, como refere SEQUEIRA (1988), uma estratégia vulgar entre as bactérias para a obtenção de energia. Na realidade, a polimerização glucídica é baseada em ligações do tipo β -1,4 resistentes à hidrólise das enzimas do animal superior.

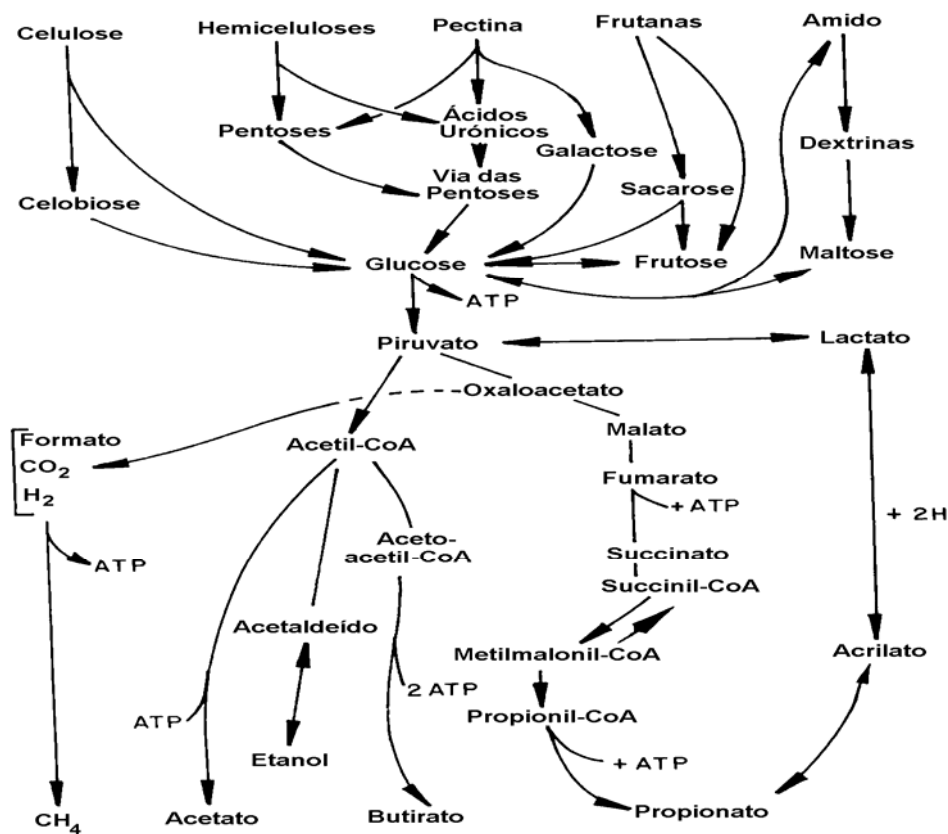


Figura 2.1 – Representação esquemática do metabolismo no rúmen, dos hidratos de carbono estruturais (adaptada de VAN SOEST, 1994).

Nos ruminantes o processo de digestão química dos alimentos é iniciado com a sua colonização intensa pela população microbiana existente ao nível do ecossistema ruminal. O processo fermentativo que ocorre a seguir condiciona a maior parte dos produtos finais da digestão, dá origem aos ácidos gordos voláteis, acético, propiónico e butírico, produtos de excreção do metabolismo

microbiano, que constituem a principal fonte de energia alimentar para o ruminante (Figura 2.1). Dá também origem aos ácidos gordos de cadeia ramificada, isobutírico, valérico e isovalérico, ao amoníaco, ao metano e ao dióxido de carbono.

Os processos fermentativos e de hidrólise levados a cabo pela população microbiana do rúmen, como as bactérias, os protozoários e os fungos, podem ser considerados na sua grande maioria como uma oxidação anaeróbia dos hidratos de carbono, das proteínas e do glicerol. Os produtos finais, cuja renovação maximiza as taxas de fermentação, resultam de reacções de transferência de electrões e de protões (VAN NEVEL e DEMEYER, 1996).

Como evidencia DEMEYER (1991), a produção de acetato é maximizada ocorrendo também máxima produção de energia em culturas de vários microrganismos anaeróbios associados com metanogénicos. A transferência de hidrogénio inter-espécies bacterianas traduz-se, quase exclusivamente, em dióxido de carbono, metano e ácidos gordos voláteis como o acético, o propiónico e o butírico, ácidos que são rapidamente absorvidos pela parede ruminal (Figura 2.2).

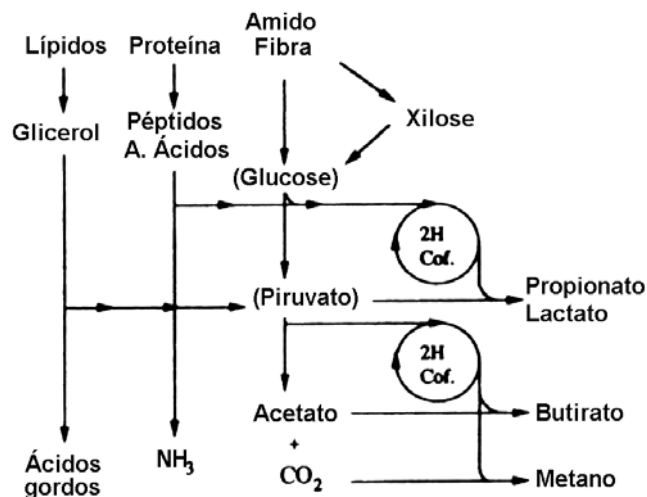


Figura 2.2 - Modelo para a produção e utilização do hidrogénio metabólico na fermentação ruminal (adaptada de DEMEYER, 1991).

A população microbiana do rúmen, digerida subsequentemente no abomaso e intestino delgado, é utilizada como fonte de proteína e de outros nutrientes. Esta possibilidade é particularmente vantajosa em deficientes

condições nutricionais onde a dieta tenha um elevado conteúdo em material celulósico e um baixo nível proteico. Nestes casos, a síntese dessa proteína de razoável valor biológico, beneficia da capacidade que os ruminantes exibem para reciclar o azoto até ao rúmen.

No entanto, para animais sujeitos a um plano nutricional elevado, a degradação do azoto proteico até amónia constitui um inconveniente em termos de eficiência de utilização da proteína alimentar. De acordo com WALLACE (1996), a actividade proteolítica ocorre em todas as três principais categorias de microrganismos (bactérias, protozoários e fungos). As bactérias são as principais responsáveis pela proteólise. Os protozoários ciliados são responsáveis não só pela destruição de pequenas partículas de proteína alimentar como também da própria proteína microbiana.

O mecanismo predominante de degradação dos péptidos é bifásico. Por acção da dipeptidil-aminopeptidase, os polipéptidos são hidrolisados a dipéptidos seguido-se a acção de dipeptidases que cindem os dipéptidos em aminoácidos. WALLACE (1996) refere que a actividade da dipeptidil-aminopeptidase ocorre apenas na *Prevotella ruminicola* enquanto que as dipeptidases ocorrem em muitas espécies bacterianas, incluindo a própria *Prevotella ruminicola*, e nos protozoários, onde são muito activas. A desaminação dos aminoácidos resulta da acção das desaminases que ocorrem em duas populações bacterianas distintas, uma em grande número mas com baixa actividade de desaminases, outra em menor número, mas com desaminases muito activas. O mesmo autor conclui que é extremamente importante conseguir suprimir a proliferação de espécies bacterianas com elevada actividade de desaminases, uma vez que a presença de uma pequena população destes microrganismos é condição necessária e suficiente para que haja uma maior eficiência de retenção de azoto pelo animal.

A fracção alimentar não degradada e os corpos microbianos são arrastados para os compartimentos posteriores ficando, finalmente, sujeitos à digestão pelas enzimas do animal hospedeiro. No abomaso, em meio ácido e por acção da pepsina, tem lugar uma hidrólise parcial de proteínas e polipéptidos. No intestino delgado, as enzimas dos sucos pancreático e

entérico permitem a obtenção de aminoácidos, monómeros glucídicos, ácidos gordos e glicerol.

Os nutrientes são absorvidos e a fracção alimentar ainda potencialmente digestível, ou que escapou à fermentação no rúmen e à hidrólise enzimática anterior, pode, por último, ser digerida no intestino grosso. No ceco e no cólon proximal, tem lugar nova fermentação microbiana cuja importância, pelo facto de já terem sido ultrapassados os locais principais de absorção, parece advir principalmente dos ácidos gordos voláteis absorvidos.

Os mecanismos de degradação dos constituintes alimentares que entram no rúmen apresentam-se sumarizados na Figura 2.1. Devido à fermentação ruminal dos hidratos de carbono, a glucose é um nutriente escasso. Os ruminantes conseguem superar esta dificuldade metabólica devido à capacidade que têm de utilizar os ácidos gordos voláteis como fonte de energia e devido também ao eficiente processo de neoglucogénese. Esta, apesar de ter por base o propionato e os aminoácidos neoglucogénicos, pode ser feita a partir de qualquer composto com número ímpar de átomos de carbono como o lactato, o valerato e o glicerol.

O acetato, após fosforilação a acetil-CoA e o propionato, depois de convertido em succinil-CoA, são metabolizados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O butirato é absorvido na forma cetónica e oxidado, à semelhança do acetato, via acetil-CoA.

A utilização digestiva de constituintes proteicos e não proteicos passa, em grande parte, pela incorporação de azoto pelos microrganismos do rúmen. Variável com a dieta e com a técnica adoptada, a estimativa da proteína de origem microbiana que chega ao duodeno tem oscilado entre os 30 e os 85%. Este facto, justifica a importância que tem sido dada aos factores que influenciam o crescimento e equilíbrio da população microbiana, a eficiência da utilização da digesta do rúmen, enquanto substrato de fermentação, e a proporção de proteína alimentar que escapa inalterada para o intestino delgado.

Um factor de importância reconhecida na disponibilidade da proteína de origem microbiana é a reciclagem do azoto no rúmen.

NOLAN e LENG (1972) estimaram em 30% a reciclagem de azoto microbiano em ovinos alimentados com luzerna (20 a 25% de proteína bruta). Posteriormente NOLAN e STACHIW (1979) aumentaram consideravelmente aquela estimativa, verificando uma reciclagem superior a 50%. Estes autores sugeriram a existência de elevado "turnover" do azoto microbiano no rúmen. A ocorrência de limitações a nível do substrato, dos organismos bacteriófagos que originam lise bacteriana, bem como da ingestão de bactérias pelos protozoários, constituem as determinantes principais das perdas em proteína para o ruminante (LENG, 1982).

Embora a digestão da celulose e das hemiceluloses no ceco e cólon possa variar, respectivamente entre 10 a 15% e 10 a 30% (VAZ PORTUGAL, 1978), o papel dos compartimentos posteriores do processo digestivo dos ruminantes tem sido subestimado.

Foi já comprovada a possibilidade da mucosa do ceco absorver ácidos gordos voláteis, aminoácidos, ácidos gordos de cadeia longa, vitaminas do complexo B e minerais. Os ácidos gordos voláteis são canalizados para a produção de energia e o amoníaco absorvido vai ser transformado em ureia no fígado, sendo assim reciclado para o rúmen com eventual incorporação na proteína bacteriana.

A quantificação da síntese proteica microbiana e a contribuição dos péptidos e aminoácidos absorvidos no intestino grosso para o metabolismo azotado do ruminante constituem, porém, questões por resolver.

“A grazing ruminant optimizes its utilization of cellulosic carbohydrates by virtue of the arrangement of its digestive tract, in which the fermentation chamber precedes the main site of digestion. In this way, the fermentation products receive the most efficient use ...”

P. J. Van Soest, 1994

Capítulo 3 – PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR

Tal como acontece nas células animais, as células vegetais têm o seu citoplasma rodeado por uma membrana plasmática.

A parede celular que reveste as células vegetais, exterior à membrana plasmática das células vivas, vai endurecendo, tornando-se cada vez mais espessa ao longo do crescimento da planta. É constituída principalmente por polissacáridos unidos, no seu conjunto, por uma camada central comum, a lamela média.

Na parede de células vegetais maduras podemos distinguir três camadas principais: a lamela média, a parede celular primária e a parede celular secundária (Figura 3.1).

A lamela média, mais externa, que é constituída principalmente por pectinas e por tecidos envelhecidos e lenhificados, contém também lenhina.

A parede celular primária, intermédia, é fina e constituída apenas por uma camada que se forma logo na fase inicial do crescimento da planta. Quando a célula é jovem, a parede celular primária é plástica e extensível contendo celulose, pectinas e hemiceluloses. À medida que a célula vai envelhecendo, vai-se tornando cada vez mais lenhificada sendo, por vezes, difícil distinguir a lamela média da parede celular primária.

A parede celular secundária, mais interna e constituída por celulose, hemiceluloses e lenhina, é formada por três camadas de espessura variável

(Figura 3.2), não extensíveis e que se desenvolvem após o crescimento vegetativo estar concluído, reduzindo a cavidade citoplásmica da célula. As suas características bioquímicas e estruturais dependem da função específica da célula que integram podendo ser considerada uma parede adicional com funções de suporte onde as microfibrilas de celulose estão rearranjadas em diferentes configurações aparecendo em camadas concêntricas paralelas à superfície da célula (GRENET e BESLE, 1991).

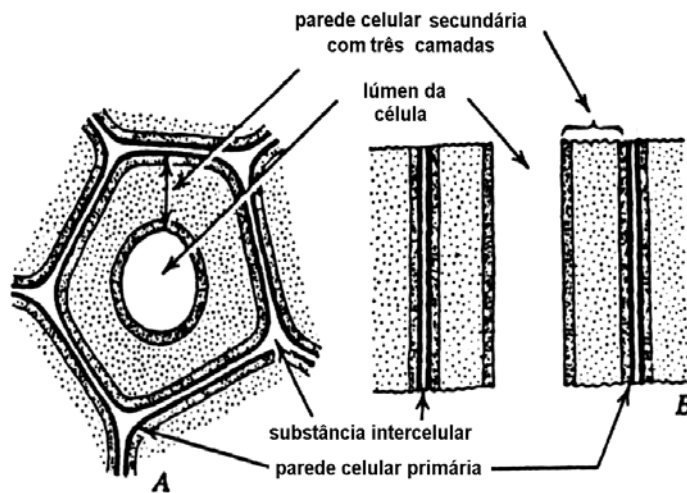


Figura 3.1 - Diagrama da estrutura da parede celular de uma célula vegetal tipo (A - corte longitudinal; B - corte transversal) (adaptada de ESAU, 1953, citado por GRENET e BESLE, 1991).

Na fase final do crescimento da célula vegetal as paredes celulares podem sofrer incrustações de substâncias adicionais que reforçam a estrutura. O principal exemplo é a lenhificação que pode originar a morte da célula com o desaparecimento dos conteúdos citoplasmáticos.

Embora de espessura muito variável, a estrutura das paredes celulares vegetais é pouco variável sendo formada por três principais categorias de constituintes: as microfibrilas de celulose, os políossidos amorfos não celulolíticos reforçados por glicoproteínas (constituintes de todas as paredes vegetais) e as substâncias não glucídicas como a lenhina e a cutina (Quadro 3.1).

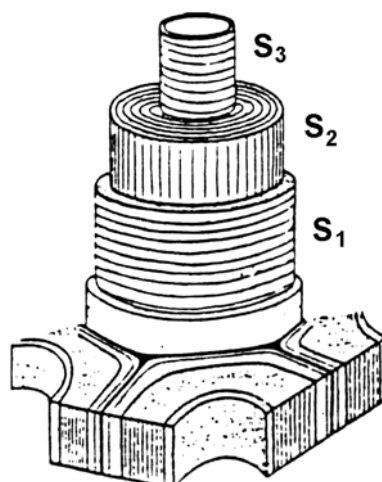


Figura 3.2 – Representação esquemática da parede celular secundária. É visível a orientação das microfibrilas de celulose nas camadas S1, S2 e S3 (adaptada de ROBERT e ROLAND, 1989).

Os poliósidos constituem 70 a 80% da matéria seca da parede vegetal, representando a água cerca de 60 a 80% das paredes primárias e somente 15% das paredes secundárias lenhificadas (JARRIGE *et al.*, 1995).

Quadro 3.1 - Principais glúcidos e outros monómeros componentes da parede celular vegetal (adaptado de JARRIGE 1981, citado por JARRIGE *et al.*, 1995).

	Nome	Unidades constituintes	Solventes
Fibras	Celulose	D-glucose (β -1,4)	Ácidos muito concentrados (H_2SO_4) a 72% p/p
	Substâncias pécicas	Ácido D-galacturónico (α -1,4) L-arabinose D-galactose L-ramnose	Água quente Oxalado de amónia EDTA
Poliósidos amorfos	Hemiceluloses	D-xilose (β -1,4) L-arabinose D-galactose D-manose D-glucose Ácido D-glucurónico Ácido 4-O-metilglucurónico	Substâncias alcalinas diluídas Ácidos diluídos a quente (H_2SO_4)
	Substâncias não glucídicas	Lenhina	Álcool cumarílico Álcool coniferílico Álcool sinapílico
Cutina		Álcoois e ácidos Ácidos gordos de cadeia longa	Éter de petróleo

SELVERDRAN (1983) refere que a matéria seca da parede das células em crescimento é constituída maioritariamente por α -celulose (30-60%),

substâncias pécnicas (15-45%), hemiceluloses (15-25%) e glicoproteínas (10-15%), embora o tecido parenquimatoso da parede celular contenha cerca de 5-10% de compostos fenólicos na forma de complexos polissacárido-proteína-polifenol.

3.1 - CELULOSE

De entre os polissacáridos estruturais, a celulose é o mais abundante existente à superfície da terra, constituindo entre 20 e 45% da matéria seca das plantas adultas. É a maior e mais variável porção da estrutura da parede celular, sendo a principal substância fibrosa (JARRIGE *et al.*, 1995; VAN SOEST, 1994). É um polímero de glucose (β -1,4) e o seu grau de polimerização é bastante elevado podendo ultrapassar as 10000 unidades em cadeias lineares orientadas e dispostas paralelamente (JARRIGE *et al.*, 1995; THEANDER, 1977).

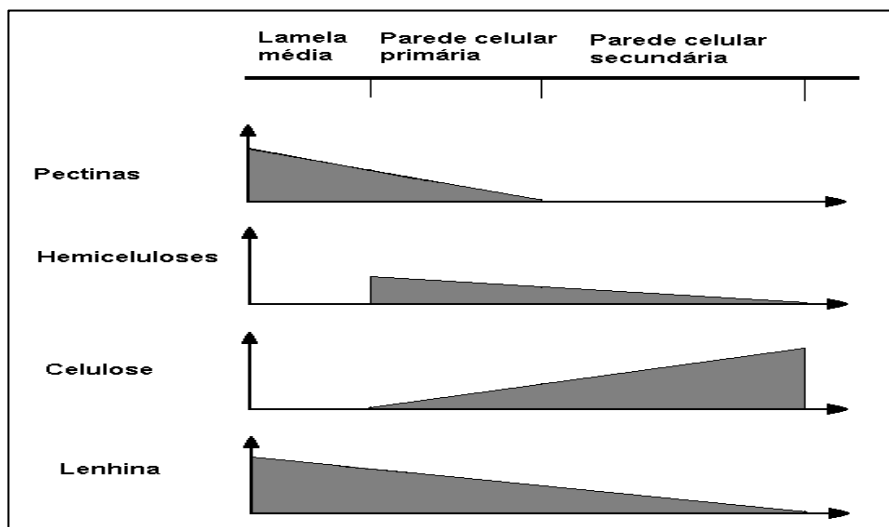


Figura 3.3 - Distribuição das principais componentes estruturais da parede celular (adaptada de INRAP, 1984).

Segundo GRENET e BESLE (1991), a celulose é sintetizada permanentemente nas células em crescimento, e o seu conteúdo aumenta da primeira para a segunda parede celular (Figura 3.3).

Os radicais hidroxilos livres permitem a formação de várias ligações por ponte de hidrogénio intra e inter-polímeros, dando resistência e coesão ao

arranjo celular molecular (SASSEN, 1992). As cadeias paralelas definem regiões cristalinas de baixa porosidade separadas por regiões amorfas (JARRIGE *et al.*, 1995; GRENET e BESLE, 1991). Estas regiões cristalinas ocorrem em zonas onde existem ligações mais regulares e em maior número. Tornam-se assim muito mais resistentes à acção dos agentes químicos e/ou enzimáticos do que as zonas amorfas que as separam (JARRIGE *et al.*, 1995).

Quadro 3.2 - Constituintes da parede celular de algumas forragens (em percentagem da matéria seca) (adaptado de GRENET e BESLE, 1991).

Forragem	Outros polissacarídeos							
	Parede celular (a)	Celulose (a)	Xilanas (a)	Arabanas (a)	Hexosanas (a)	Hemiceluloses totais (a)	Ácidos urónicos (b)	Lenhina
Azevém	46,2	20,0	12,5	3,0	4,0	19,5	3,0	0,3
Palha trigo	80,2	30,0	19,0	3,0	3,0	25,0	4,0	11,0
Luzerna	41,8	18,0	7,0	3,0	4,0	14,0	8,0	6,0
Trevo branco	27,2	13,0	4,0	2,5	4,5	11,0	-	4,0
Milho silagem (25-30% MS)	45,0	11,0	6,0	2,0	2,0	10,0	1,0	4,0

A celulose, devido à sua resistência e rigidez, contribui de forma determinante para o suporte da célula vegetal. O seu teor na planta é variável, embora as grandes diferenças ocorram em plantas geneticamente muito diferentes. Observando o Quadro 3.2 verificamos que, excluindo o milho silagem, as leguminosas apresentam um teor mais baixo de celulose.

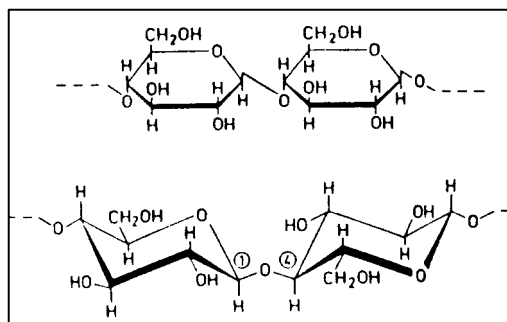


Figura 3.4 – Representação esquemática da celobiose. A polimerização de D-glucose dá origem à celulose (THEANDER e AMAN, 1977).

Morrison (1980) refere que a celulose contém, em adição às ligações β -1,4 glucosídicas, cerca de 15% de pentosanas, principalmente xilose, e alguma arabinose.

A unidade celular base da celulose, determinada por estudos de raio X realizados por MEYER e MISH (1936) citados por PRESTON (1986), é a celobiose que ocorre em unidades repetidas e rearranjadas em paralelo (Figura 3.4).

No entanto, segundo VAN SOEST (1994), considerar a celulose como uma substância pura constituída apenas por moléculas de D-glucose, não é a forma mais adequada para compreender as suas características biológicas. A celulose, associada na maior parte das vezes às hemiceluloses e à lenhina, apresenta na natureza características profundamente diferentes. De facto, a celulose pura no sentido de substância insolúvel e cristalinizada de moléculas de D-glucose, é uma raridade biológica que está confinada a algumas fibras. No algodão, por exemplo, a cristalinidade da celulose é de 70% (GRENET e BESLE, 1991).

Quadro 3.3 - Digestibilidade da celulose em diferentes células vegetais (adaptado de VAN SOEST, 1994).

Material	Digestibilidade (%) não ruminantes	Digestibilidade (%) ruminantes	Relação (a) Lenhina/celulose
Luzerna	20-30	40-60	0,18-0,30
Fornagem de clima temperado	0-20	48-90	0,08-0,20
Fornagem de clima tropical	0-20	30-60	0,11-0,24
Palhas	insignificante	40-60	0,10-0,26
Casca de soja	40	94	0-0,03
Casca de algodão	muito baixo	50	0,55
Casca de arroz	0	0	0,45
Papel de jornal	0	23-27	0,34-0,43
Madeira	0	0-40	0,30-0,60
Legumes	40-80	90-100	0-0,05

(a) O ADL (lenhina de detergente ácido) inclui a fracção de cutina e é expresso em relação à celulose. Uma relação elevada está associada a baixa digestibilidade.

Na parede celular dos vegetais, a celulose ocorre combinada em diferentes graus com a lenhina, a hemicelulose, a cutina e com sais minerais. Como se pode observar no Quadro 3.3, independentemente do material vegetal utilizado, os ruminantes digerem melhor a celulose do que os não ruminantes. Verifica-se também que a disponibilidade nutricional da celulose varia desde a total

indigestibilidade à quase completa digestibilidade. Esta variação depende largamente da lenhificação, ainda que existam outros factores limitantes como a silicificação, a cutinização e até propriedades intrínsecas da própria celulose (VAN SOEST, 1994).

Geralmente a deslenhificação da celulose aumenta a sua digestibilidade embora não deva generalizar-se este efeito à digestão e à extensão da digestão da matéria seca ou matéria orgânica. De facto, a celulose pode apresentar associações físico-químicas com a lenhina, sendo a digestibilidade condicionada pelos múltiplos factores envolvidos. A remoção da lenhina e das hemiceluloses permite que as cadeias de celulose se tornem mais alinhadas do que resulta uma maior cristalinidade. A fermentação de preparações com celuloses isoladas (RODRIGUES, 1999), tende a ter um maior tempo de latência seguido por uma digestão mais lenta, o que é normal ocorrer em forragens digestíveis, mesmo se a digestibilidade total dos tecidos deslenhificados for elevada.

3.2 - HEMICELULOSES

Segundo WALLACE (1989), o termo hemicelulose foi utilizado pela primeira vez por Schulze em 1891 para descrever polissacarídeos extraídos dos tecidos vegetais com solventes alcalinos. Inicialmente, as hemiceluloses foram aceites como compostos de baixo peso molecular, precursores da celulose. Embora tivesse sido demonstrada a incorrecção desta teoria, a denominação de hemiceluloses manteve-se para descrever aquele grupo de polissacarídeos estruturais.

De acordo com GIGER-REVERDIN (1995), as hemiceluloses constituem 10 a 25% da matéria seca das forragens e produtos agro-industriais e 2 a 12% da matéria seca das sementes e raízes, sendo a segunda fracção de glúcidos estruturais mais abundante.

São caracterizadas por apresentarem uma composição química heterogénea e uma estrutura complexa, amorfa ou para-cristalina pouco ramificada que dificulta a degradação enzimática (THOMAS, 1983).

A diversidade das hemiceluloses contrasta com a simplicidade da celulose. De um modo geral, as hemiceluloses possuem características estruturais que as impedem de formar agregados como acontece na celulose. No entanto podem ocorrer reacções de co-cristalização com cadeias de celulose através de pontes de hidrogénio, entre os grupos CH_2OH das cadeias de celulose e os oxigénios glicosídicos das hemiceluloses (COLL *et al.*, 1992).

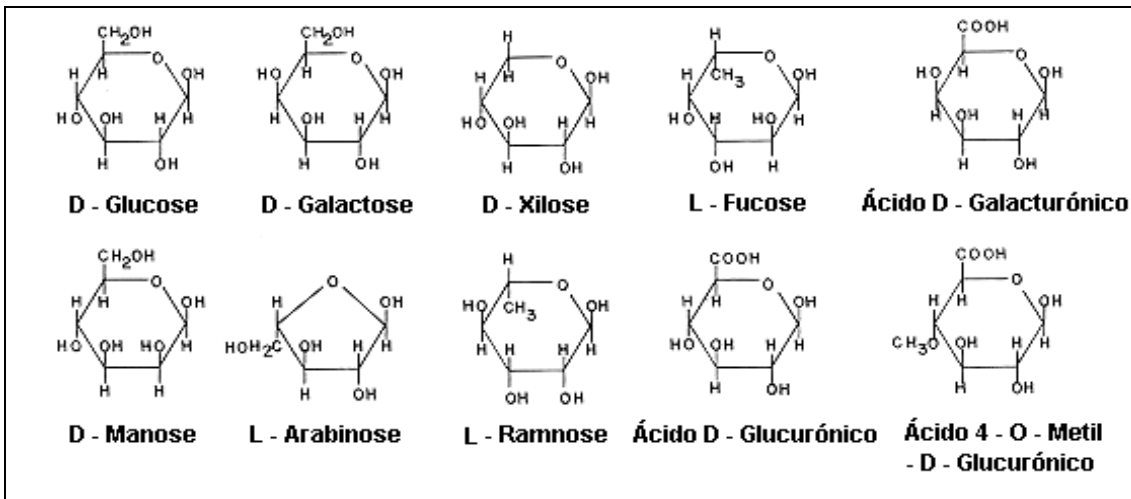


Figura 3.5 - Estrutura de algumas oses incorporadas nas hemiceluloses (adaptada de HALUK, 1994).

VAN SOEST (1994), refere que as hemiceluloses incluem um conjunto de polissacarídeos que não se identificam com a celulose nem com as substâncias pécticas, representando um grupo de glúcidos de baixo peso molecular solúvel em soluções alcalinas e ácidas.

As hemiceluloses são constituídas por compostos de heterogeneidade elevada (Figura 3.5), classificados de acordo com a sua constituição química, que incluem as xilanas, as mananas, as glucomananas, as galactanas e as arabananas em proporção variável. A L-ramnose, a L-fucose, o ácido D-glucurónico, o ácido D-galacturónico e vários açúcares neutros metilados são também considerados como constituintes das hemiceluloses (WALLACE, 1989).

Uma pequena quantidade de manose, geralmente presente nos hidrolisados da hemicelulose, provém das glucomananas que são cadeias lineares compostas por D-glucose e D-manose unidas através de ligações β -1,4, existentes em diversas hemiceluloses (JARRIGE *et al.*, 1995). Com base

nos açúcares adicionais que apresentam na sua constituição, as hemiceluloses podem ser classificadas em glucomananas, galactomananas, galactoglucomananas e arabogalactanas. Estas últimas exibem um grau elevado de ramificação podendo, por vezes, apresentar ligações com substâncias pécicas (THEANDER *et al.*, 1989).

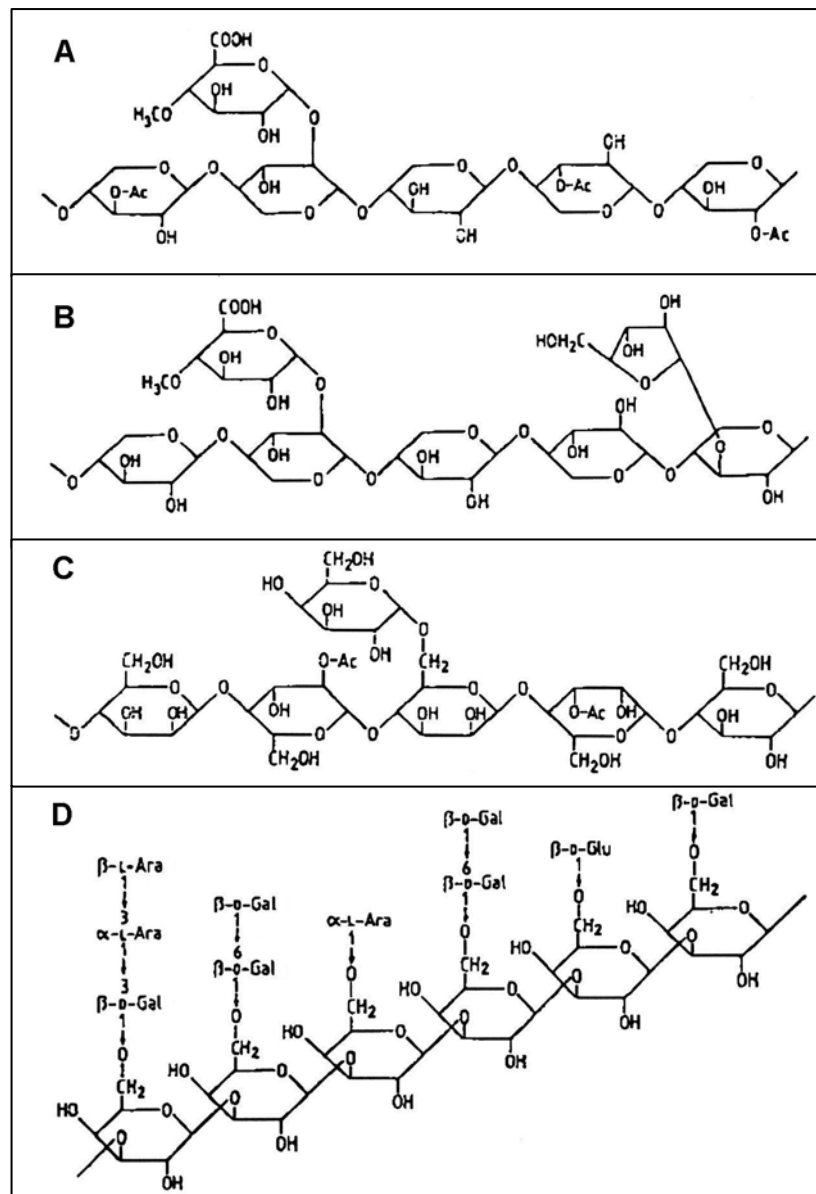


Figura 3.6 - Estrutura química parcial de algumas hemiceluloses (**A** O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana; **B** Arabino-4-O-metilglucuronoxilana; **C** O-acetil-galactoglucomanana; **D** Arabinogalactana (adaptada de HALUK, 1994).

A natureza das hemiceluloses varia consideravelmente (Figura 3.6), inclusivamente entre famílias e espécies botânicas. Encontram-se em

quantidades mais elevadas nas gramíneas do que nas leguminosas. Consta-se que as paredes celulares das monocotiledóneas jovens são essencialmente constituídas por arboxilanas, enquanto que as paredes primárias das dicotiledóneas contêm principalmente xiloglucanas (McDOUGALL *et al.*, 1996; THOMPSON, 1993).

As xilanas são o principal constituinte da hemicelulose na parede celular das gramíneas (WALLACE 1989). Segundo VARNER e LIN (1989), as xilanas podem corresponder a 15-20% da matéria seca total nas monocotiledóneas enquanto que nas dicotiledóneas não ultrapassam 2%.

Para JARRIGE *et al.* (1995), as hemiceluloses são uma família de polissacarídeos constituídos por cadeias lineares de β -1,4 D-xilose contendo um pequeno número de cadeias laterais que diferem segundo a família e o tecido vegetal. São de três tipos:

- uma única unidade de arabinose – arabinoxilas – que são as mais abundantes;
- uma única unidade de ácido glucurónico – glucuronoxilanas;
- várias unidades constituindo cadeias mais longas de arabinose + ácido glucurónico + xilose + galactose.

Segundo os mesmos autores, quanto mais ramificações tiverem as xilanas mais solúveis serão e menores possibilidades terão de estabelecer ligações com a celulose.

A estrutura básica das xilanas consiste num esqueleto com unidades de D-xilopiranosose unidas por ligações β -1,4, com uma grande variedade estrutural, nomeadamente no que diz respeito à natureza e número de monómeros presentes e ao modo de ligação das cadeias laterais (WALLACE, 1989). As cadeias laterais variam com a espécie e com o tecido vegetal.

As β -glucanas são polímeros lineares de elevado peso molecular constituídas por monómeros da D-glucose. São as principais hemiceluloses dos cereais, aparecendo também nas paredes primárias das zonas vegetativas das monocotiledóneas (ÅMAN, 1993; BECKER *et al.*, 1992). As unidades de β -D-glucanas têm sido identificadas apenas na parede celular de gramíneas parecendo que é um polissacarídeo específico deste grupo de plantas. Estes polissacarídeos são constituídos por cadeias de glucanas unidas por ligações

β -1,3 e β -1,4 à razão de 1 para 2,5 (WALLACE, 1989). A frequência das ligações β -1,4 parece variar com a idade do tecido, aumentando com o envelhecimento da planta (JARRIGE *et al.*, 1995).

Embora não seja evidente que os dois tipos de ligações se repitam segundo uma determinada sequência, na natureza verificam-se algumas repetições. PARRISH *et al.* (1960) citado por WALLACE (1989), verificaram que a cadeia de β -D-glucanas na cevada e na aveia, contém sequências de duas, três ou ocasionalmente dez ligações β -1,4 consecutivas, separadas por ligações β -1,3.

A estrutura base das xiloglucanas consiste num esqueleto de unidades repetidas de D-glucose através de ligações β -1,4 unidas lateralmente a moléculas de D-xilose que, através de ligações α , podem estar ligadas ao O-6 de alguns resíduos da glucose (WALLACE 1989). As xiloglucanas apresentam ainda uma forte tendência para estabelecerem ligações com a celulose e com as substâncias pécticas (ALBERSHEIM *et al.*, 1973).

As xiloglucanas estão presentes na parede celular das monocotiledóneas, embora em muito menor quantidade do que nas dicotiledóneas. Nas monocotiledóneas parecem apresentar um esqueleto polimérico de unidades de D-glucose com unidades residuais de D-xilose enquanto que nas dicotiledóneas apresentam uma constituição mais diversa contendo monómeros adicionais de galactose e frutose (HATFIELD, 1989).

Alguns autores consideram que a maior parte, se não a totalidade, deste polímero estrutural tem ligações por pontes de hidrogénio com a celulose. Esta opinião resulta da necessidade de utilização de tratamentos com substâncias alcalinas fortes, para a separação *in vitro* das xiloglucanas da celulose e da capacidade das xiloglucanas se ligarem rapidamente e fortemente com a celulose (MCNEIL *et al.*, 1984).

ALBERSHEIM *et al.* (1983), referem que as xiloglucanas desempenham um papel regulador no crescimento das dicotiledóneas embora EDELMANN e FRY (1992) sejam mais abrangentes, referindo mesmo que as xiloglucanas apresentam um papel importante no controlo hormonal do crescimento das células vegetais.

Nas leguminosas, as principais hemiceluloses são as xiloglucanas que representam 20-25% do peso da matéria seca (COLL *et al.*, 1992) e que se localizam maioritariamente na parede primária (DEY e BRINSON, 1985). As monocotiledóneas contêm menos de 2% de xiloglucanas (VARNER e LIN, 1989).

As xiloglucanas são cadeias lineares de β -1,4 glucose que possuem lateralmente algumas unidades de xilose em geral únicas, mas que podem ser prolongadas por moléculas de galactose ou de fucose. Podem estar ligadas à celulose tanto por pontes de hidrogénio como por ligações covalentes (JARRIGE *et al.*, 1995).

3.3 - PECTINAS

O termo pectinas ou substâncias pécticas abrange uma mistura complexa de polissacarídeos (Quadro 3.1) que se encontram principalmente na lamela média e, em menor grau, na parede primária da célula vegetal (Figura 3.3), sobretudo das dicotiledóneas (MCNEIL *et al.*, 1984). As substâncias pécticas têm um peso molecular relativamente baixo que varia entre 20000 e 360000 Daltons (GRENET e BESLE, 1991), e podem ser extraídas com água quente ou com soluções aquosas de agentes dissolventes como o etileno-diamida-tetracetato (EDTA) ou o oxalato de amónio (Quadro 3.1). Têm a particularidade de fixarem catiões (Ca^{++}) apresentando propriedades gelificantes (JARRIGE *et al.*, 1995).

Podem ser divididas numa fracção neutra, as arabogalactanas, e numa fracção ácida, onde o ácido D-galacturónico é o constituinte característico sob a forma de cadeias homogéneas (homogalacturonanas) ou interrompidas por unidades de ramnose (ramnogalacturonanas) (JARRIGE *et al.*, 1995; MCNEIL *et al.*, 1980, citado por WALLACE, 1989).

As ramnogalacturonanas (Figura 3.7) são as pectinas mais importantes e o seu esqueleto é constituído por ligações α -1,4 de ácido D-galacturónico com resíduos de ramnose, à razão de 1 molécula de ramnose para 2-12 moléculas de ácido D-galacturónico. Apresenta cadeias laterais de galactose, arabinose ou fucose (GRENET e BESLE, 1991; THIBAUT e COLONNA, 1986). Os

radicais ácidos podem estar mais ou menos metilados ou neutralizados por íons Ca^{++} , K^+ ou Na^+ o que determina propriedades de solubilização e gelificação interessantes (JARRIGE *et al.*, 1995). Podem ser divididas em ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II).

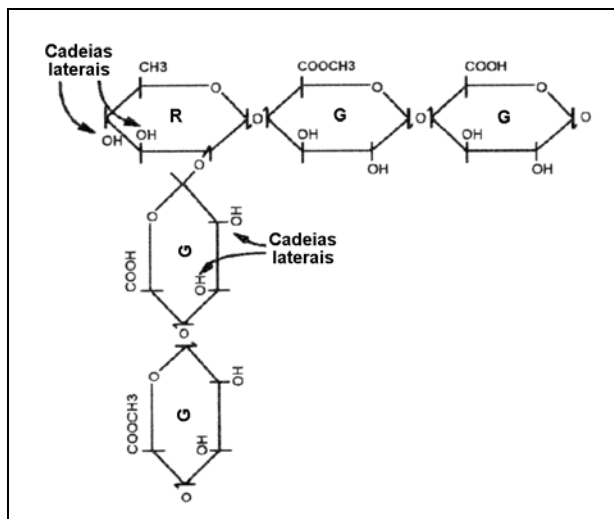


Figura 3.7 - Estrutura da ramnogalacturonana (G - ácido galacturônico; R - ramnose) (adaptada de THIBAUT e COLONNA, 1986).

A RG-I foi pela primeira vez isolada por extração com endo-poligalacturonase e consiste num esqueleto constituído por ligações alternadas da L-ramnose e resíduos do ácido D-galacturônico. Na RG-I, com um peso molecular de aproximadamente 2000 daltons, metade das unidades de ramnose estão ramificadas ao nível de O-4, tanto com a L-arabinose, como com a D-galactose, podendo ainda conter pequenas quantidades de L-fucose (WALLACE, 1989).

A RG-II é um polissacarídeo complexo, onde existem mais de vinte ligações glucosídicas. É composta por cerca de trinta resíduos glucosídicos contendo, pelo menos, doze glúcidos diferentes como por exemplo, o 2-O-metilfucose, o 2-O-metilxilose, o 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose e o ácido 3-deoxi-D-mano- α -octolusónico. A RG-II está presente em várias plantas angiospérmicas, em algumas gimnospérmicas e em monocotiledóneas como o arroz e a aveia (WALLACE, 1989).

As homogalacturonanas são grandes moléculas de resíduos de ácido galacturónico, unidos entre si por ligações glucosídicas α -1,4, apresentando na sua maioria os grupos carboxilo esterificados com grupos metilo (COLL *et al.*, 1992; VARNER e LIN, 1989). Existem na parede celular primária e, através de ligações covalentes, podem estar associadas a outros polímeros da parede celular (MCNEIL *et al.*, 1980 citado por WALLACE, 1989).

As arabogalactanas, menos importantes quantitativamente, são substâncias pécticas neutras que estão presentes na parede celular primária de numerosas monocotiledóneas (JARRIGE *et al.*, 1995). São, como o nome indica, polímeros da arabinose e da galactose. De acordo com WALLACE (1989), existem dois tipos de arabogalactanas. A mais comum, consiste numa cadeia linear de moléculas de galactose unidas por ligações β -1,4, onde aparecem, ocasionalmente, cadeias laterais de resíduos de arabinose ligadas ao esqueleto no O-3 da galactose (Tipo I). O Tipo II das arabogalactanas consiste numa sequência de unidades de galactose, unidas através de ligações β -1,3 e β -1,4 às quais estão ligadas, pontualmente, cadeias laterais de resíduos de arabinose.

As arabinanas, polímeros pouco importantes quantitativamente nas substâncias pécticas, são constituídas por cadeias de L-arabinofuranose, muito ramificadas. O padrão das suas ligações químicas é muito complexo o que torna difícil pormenorizar a sua estrutura. De acordo com WALLACE (1989), nunca foram identificadas nas monocotiledóneas e na parede celular primária.

Não tendo ligações covalentes com a lenhina, as pectinas estão completamente disponíveis para a fermentação microbiana sendo suficientemente solúveis ao ponto de poderem ser consideradas hidratos de carbono solúveis (CHESSON e MONRO, 1982 citados por JARRIGE *et al.*, 1995). Segundo os mesmos autores as leguminosas forrageiras contêm entre 6 e 8% de substâncias pécticas, por vezes 10%, enquanto que as gramíneas contêm apenas 1 a 3% sendo, no entanto, mais ricas em ácido galacturónico e em galactose.

VAN SOEST (1994) refere que as pectinas são muito mais abundantes nas dicotiledóneas do que nas monocotiledóneas podendo atingir, segundo DEY e BRINSON (1984), mais de 20% da matéria seca total. A polpa de citrinos e

a polpa de beterraba são dois sub-produtos muito ricos em substâncias pécnicas, contendo entre 20 e 30% de pectinas (PHATAK *et al.*, 1998; MITCHELL e TAYLOR, 1983).

3.4 – LENHINA E ÁCIDOS FENÓLICOS

A lenhina é um heteropolímero não glucosídico tridimensional formado por monómeros do tipo fenil-propano (Figura 3.8) que também impregna a parede celular secundária conferindo ao vegetal propriedades de impermeabilização e resistência ao ataque microbiano (MONTIES, 1991).

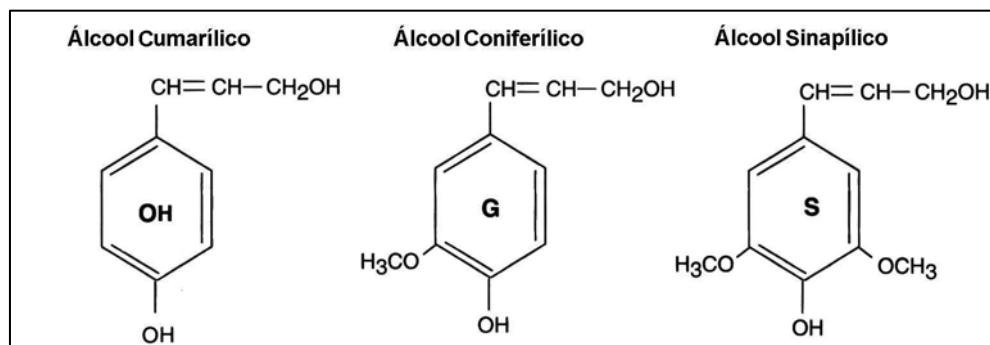


Figura 3.8 - Estrutura dos três álcoois constituintes da lenhina (ciclos OH – hidroxibenzilo; G – guaiacilo; S - siringilo (adaptada de JARRIGE *et al.*, 1995).

Segundo JARRIGE *et al.* (1995) e COLL *et al.* (1992), a lenhina é um polímero fenólico amorfo muito hidrófobo que incrusta a rede de microfibrilas da célula vegetal, constituindo a principal fracção não glucídica da parede celular. A sua importância na parede celular vai diminuindo da lamela média para a parede celular secundária (Figura 3.3), sendo responsável pela rigidez da planta. Fortalece os tecidos de suporte e desempenha um papel importante no transporte de água, nutrientes e metabolitos. Para além disto, a quantidade de lenhina, a sua localização e estrutura constituinte são muitas vezes consideradas factores determinantes que definem a capacidade de utilização das paredes celulares das plantas (OBST, 1993). RODRIGUES (1999) refere mesmo que as unidades fenólicas que constituem a lenhina devem ser

consideradas parte integrante do sistema de protecção das plantas contra os herbívoros.

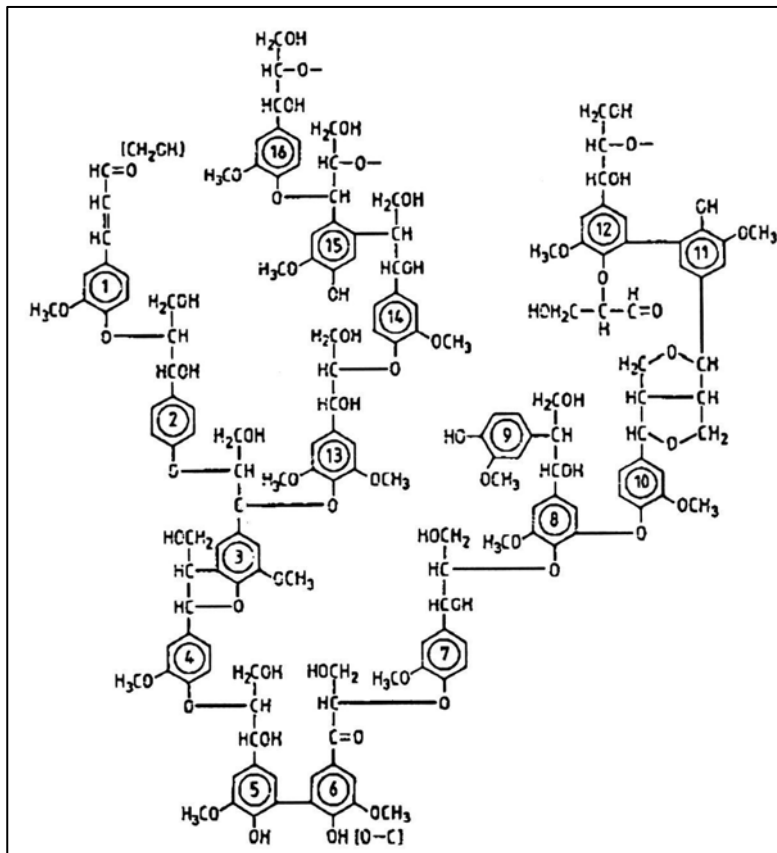


Figura 3.9 – Representação esquemática da estrutura complexa da lenhina do abeto (ALDER, 1977 citado por HALUK, 1994).

A quantidade de lenhina é mais elevada nos caules do que nas folhas, depositando-se nos tecidos que vão envelhecendo como acontece, por exemplo, durante a lenhificação generalizada das palhas. A lenhificação aumenta fortemente em determinados períodos de crescimento da planta de tal modo que, no trigo, o aumento é muito acentuado nas duas semanas que antecedem o espigamento (STONE *et al.*, 1951 citados por JARRIGE *et al.*, 1995). Segundo JARRIGE *et al.* (1995), a lenhina constitui entre 10 a 15% da matéria seca da parede celular.

A lenhina possui uma molécula tridimensional muito complexa (Figura 3.9), constituída por unidades fenilpropanoídicas amorfas (C_6-C_3) de elevado peso molecular que se integra nos compostos fenólicos poliméricos (SUSMEL e STEFANON, 1993).

Há três grupos principais de lenhinas, baseados nas unidades constituintes e nas ligações existentes. Segundo HIGUCHI (1981) citado por WALLACE (1989), os três grupos são:

- lenhina típica das gimnospérmicas, em que existe apenas uma unidade estrutural, o guaiacilo, um polímero resultante da desidrogenação do álcool coniferílico;

- lenhina típica das angiospérmicas, onde existem duas unidades estruturais, guaiacilo-siringilo, um polímero misto dos álcoois coniferílico e sinapílico;

- lenhina típica das forragens (monocotiledóneas), onde existem três unidades estruturais do tipo guaiacilo-siringilo-*p*-hidroxifenilo, um polímero misto dos álcoois coniferílico-sinapílico e *p*-hidroxifenílico.

WALLACE (1989), isolou do feno de azevém e da palha de aveia dois tipos de lenhina. Constatou que, um deles, era constituído por pequenas moléculas ricas em siringilo enquanto que o outro continha grandes moléculas também ricas em siringilo. A primeira existia na parede celular secundária e a segunda na parede celular primária o que confirma os resultados de BUXTON e RUSSEL (1988), que verificaram o enriquecimento da lenhina em unidades siringilo com o envelhecimento da planta.

A lenhina das leguminosas é menos condensada do que a lenhina das gramíneas (MONTIES, 1991) sendo, nas plantas maduras, mais rica em unidades guaiacilo e mais pobre em unidade siringilo (BUXTON e RUSSELL, 1988).

As lenhinas das gramíneas são constituídas por ácidos fenólicos de baixo peso molecular ligados aos polímeros parietais, podendo ser parcialmente separados por soluções alcalinas diluídas (HIGUCHI *et al.*, 1967 citado por JARRIGE *et al.*, 1995). Isto originou a distinção efectuada por alguns autores, entre uma matriz altamente polimerizada e condensada (*core lignin*) e os ácidos fenólicos, sobretudo ácidos ferúlico e *p*-cumárico (ácidos hidroxicinâmicos) aos quais correspondem alguns álcoois constituintes da lenhina; o álcool cumarílico e o álcool coniferílico (JUNG, 1989).

Na Figura 3.10 está representada a biossíntese das substâncias fenólicas nas plantas superiores, que resultam de um processo complexo de polimerização oxidativa (JARRIGE *et al.* 1995; VAN SOEST, 1994).

A utilização dos termos “*core lignin*” e “*noncore lignin*”, que pretendem definir diferentes tipos de lenhina, tem gerado alguma controvérsia.

GORDON e NEUDOERFFER (1973), definiram “*core lignin*” como sendo a fracção constituída pela matriz fenilpropanoídica que se supunha estar ligada aos hidratos de carbono estruturais da parede celular através de ligações éster. A fracção “*noncore lignin*” corresponderia ao conjunto de ácidos fenólicos esterificados, ferúlico e *p*-cumárico que, devido à existência de dois grupos funcionais hidroxilo e carboxilo, poderiam actuar como ligações entre a “*core lignin*” e os hidratos de carbono estruturais (JUNG, 1989).

Segundo LAPIERRE (1993), as lenhinas são classificadas em “*core lignin*” e “*noncore lignin*” com base na sua relativa susceptibilidade para os processos de hidrólise. Como já foi dito, a fracção “*core lignin*” seria representada por compostos altamente condensados, constituindo o resíduo após a hidrólise. A fracção “*noncore lignin*” seria representada pelo conjunto de ácidos hidroxicinâmicos de reduzido peso molecular e hidrolisáveis. Esta designação foi utilizada, apenas, para alguns ácidos hidroxicinâmicos que se encontram unidos aos polímeros da parede celular através de ligações covalentes. No entanto, RALPH e HELM (1993), consideram que não é possível distinguir, efectivamente, os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram ligados à lenhina e os que estão ligados aos hidratos de carbono estruturais. Acerca disto VAN SOEST (1994), refere que a aplicação do conceito “*noncore lignin*” acaba por implicar também a inexistência da fracção “*core lignin*”. Os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, envolvidos no processo como possíveis pontos de partida para a lenhificação (JUNG e DEETZ, 1993), não devem ser incluídos na lenhina total, uma vez que podem existir como compostos monométricos individuais das paredes celulares vegetais (VAN SOEST, 1993).

Os ácidos hidroxicinâmicos estão unidos à lenhina e às hemiceluloses através de ligações éster e éter. HARTLEY (1990), constatou a presença de dímeros constituídos unicamente por ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico ou pelos dois ácidos. Estes dímeros estão, sobretudo, presentes nas gramíneas,

existindo também nas leguminosas, representando cerca de um décimo dos monómeros encontrados em todas as forragens estudadas (ERASO e HARTLEY, 1990).

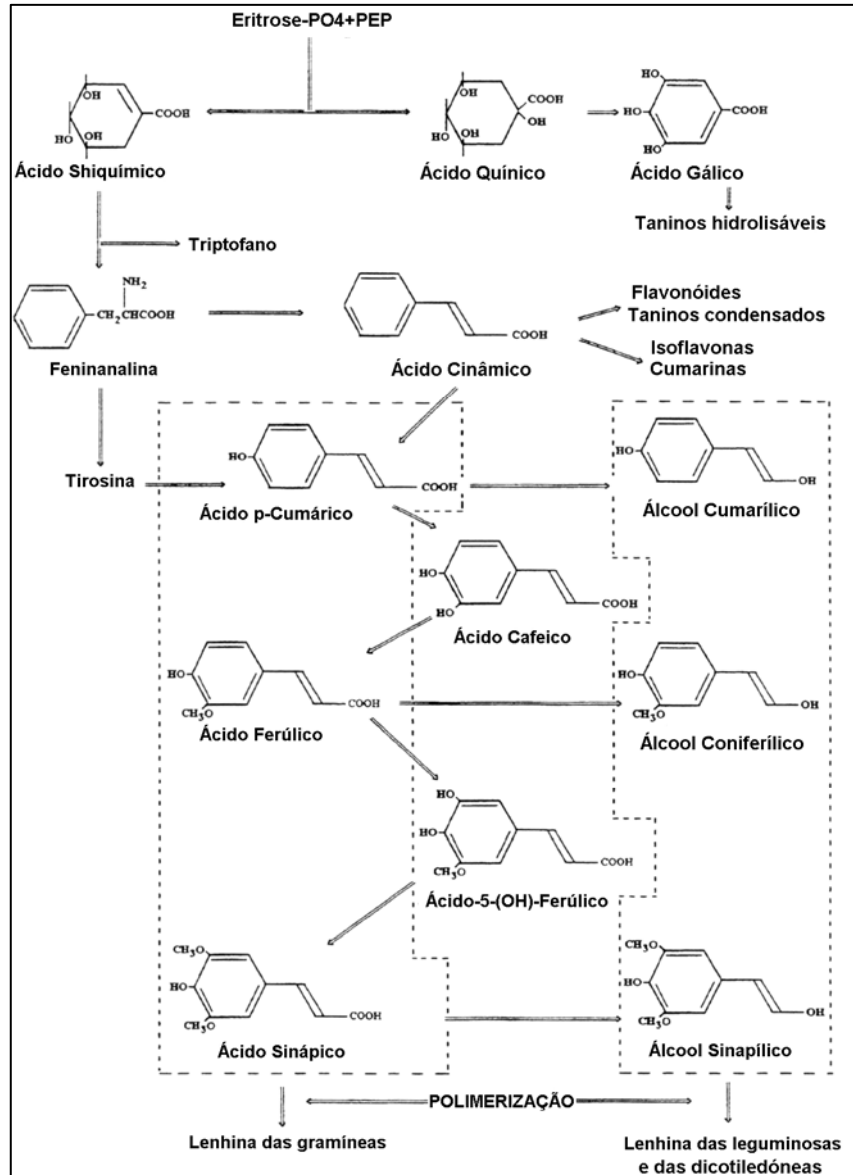


Figura 3.10 – Representação esquemática da biossíntese dos monómeros precursores da lenhina (adaptada de VAN SOEST, 1994).

Na parede celular das monocotiledóneas, o ácido ferúlico é muito mais importante do que o ácido *p*-cumárico. A sua concentração varia pouco na parede secundária representando cerca de 0,3% das paredes celulares dos limbos e 0,5% das paredes celulares dos caules das gramíneas temperadas. O ácido *p*-cumárico raramente detectado nas paredes celulares primárias, é

dominante nas paredes celulares secundárias e nos caules. A sua importância nas paredes celulares aumenta com a idade, tal como acontece com a lenhina, atingindo valores da ordem dos 0,5% nas gramíneas forrageiras temperadas. No entanto, nos caules do milho e do sorgo o ácido *p*-cumárico pode ultrapassar valores da ordem dos 1,4% (ERASO e HARTLEY, 1990; CHERNEY *et al.*, 1989).

Nas gramíneas, os ácidos fenólicos esterificados representam entre 10 e 15% da lenhina total existente enquanto que as leguminosas contêm apenas ¼ dos ácidos hidroxicinâmicos existentes nas gramíneas (JARRIGE *et al.*, 1995). Além disto, a lenhina das monocotiledóneas apresenta o ácido *p*-cumárico esterificado a grupos hidroxilos terminais das cadeias laterais da lenhina e ácidos *p*-cumárico e ferúlico unidos por ligações éter (SCALBERT *et al.*, 1985).

Segundo VAN SOEST (1994), a diferença fundamental na composição da lenhina das gramíneas e das leguminosas está na variável solubilização por substâncias alcalinas. A lenhina das gramíneas é solubilizada em maior extensão pelos alcális, do que a lenhina das leguminosas o que poderá ser consequência de um maior número de ligações éster ou de menor teor de grupos metoxilo.

3.5 – PROTEÍNAS DA PAREDE CELULAR

A maior parte dos casos em que a proteína da parede celular foi avaliada, resultou de trabalhos realizados com dicotiledóneas, onde a percentagem de proteína da parede celular é apreciável (5-10%) (WALLACE, 1989). Segundo HEREDIA *et al.* (1993) as proteínas (enzimas, toxinas e proteínas envolvidas na resistência aos microrganismos patogénicos), constituem cerca de 3 a 6% das paredes celulares das plantas. No entanto, a composição desta proteína apresenta, muitas vezes, grandes variações na sequência repetitiva dos aminoácidos que a constituem. Com base nisso, SHOWALTER (1993) dividiu a proteína da parede celular em três classes:

- glicoproteínas ricas em hidroxiprolina de que fazem parte as extensinas, as proteínas das arabogalactanas e as lecitinas;

- proteínas ricas em glicina;
- proteínas ricas em prolina.

As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina têm importância fundamental devido às funções biológicas que desempenham. Segundo VARNER e LIN (1989), caracterizam-se por possuírem um elevado teor em lisina, serem ricas em unidades de hidroxiprolina glicolisadas com unidades de arabinose e por apresentarem estruturas repetitivas.

As dificuldades que existem para a extração deste tipo de proteína sugerem que, grande parte dela é uma proteína estrutural, designada por extensina (LAMPART, 1965 citado por JARRIGE *et al.*, 1995). A extensina é sem dúvida a proteína mais importante. Tem na sua composição mais de 20% de hidroxiprolina, o aminoácido característico do colagénio (JARRIGE *et al.*, 1995). Por esta razão pensa-se que está envolvida no controlo da extensibilidade da parede celular e na resistência da célula vegetal à invasão por agentes patogénicos (BROWNLEADER *et al.*, 1994; HATFIELD, 1989).

MCNEIL *et al.* (1984), admitem a possibilidade de ocorrerem ligações covalentes entre as extensinas e as hemiceluloses e substâncias pécticas uma vez que o papel que a proteína tem na célula vegetal implica o seu envolvimento físico com outros polímeros da parede celular.

Na Figura 3.11, pretende-se representar a estrutura da parede primária de uma célula vegetal (KEEGSTRA *et al.*, 1973 citado por COLONNA *et al.*, 1995). No esquema, as fibrilas de celulose formam uma armadura onde as xiloglucanas estão unidas por ligações de pontes de hidrogénio. Os grupos de fibrilas sucessivas são intercalados por substâncias pécticas que estão ligadas às xiloglucanas de um lado e às glicoproteínas parietais de outro. Entre as proteínas da parede celular e as substâncias pécticas, existem cadeias laterais de arabogalactanas.

A hidroxiprolina existe em elevada concentração nas leguminosas (20%) (LAMPART, 1965 citado por WALLACE, 1989) onde as extensinas também são particularmente abundantes (HOOD, 1992).

Uma percentagem elevada de unidades de hidroxiprolina são β -O-glicolisadas com cadeias lineares de uma a quatro unidades de arabinose. Algumas das unidades de serina são α -O-glicolisadas com um resíduo de

galactose (BROWNLEADER *et al.*, 1994). Nas cadeias laterais de L-arabinofuranose, as unidades estruturais encontram-se associadas através de ligações glicosídicas β -1,2. No caso das cadeias de tetrarabinose, o resíduo terminal apresenta ligações glicosídicas α -1,3 (FRY, 1991). O mesmo autor refere que as cadeias de hidratos de carbono representam entre 50 e 60% da massa total da molécula de extensina que, nas dicotiledóneas, apresenta em solução uma estrutura helicoidal relativamente rígida denominada Poliprolina II.

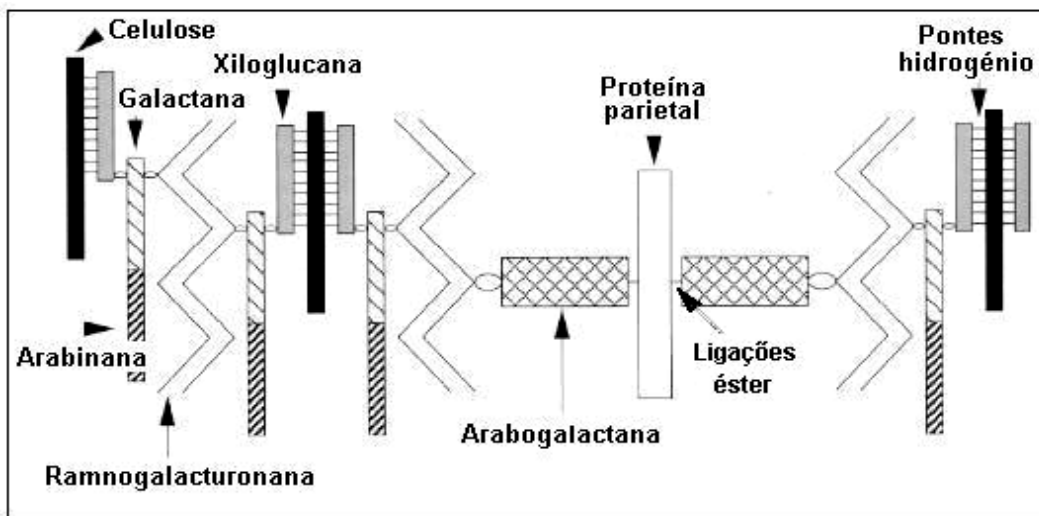


Figura 3.11 – Estrutura da parede primária da célula vegetal, com destaque para o posicionamento das proteínas parietais (adaptada de KEEGSTRA *et al.*, 1973 citado por COLONNA *et al.*, 1995).

A extensina das monocotiledóneas é caracterizada por possuir um baixo grau de glicosilação nas unidades de hidroxiprolina onde 76% dos resíduos não apresentam ramificações (FRY, 1991). No milho foram já caracterizadas duas extensinas, uma rica em hidroxiprolina, lisina, prolina, serina e treonina com conformação aleatória em hélice e outra rica em hidroxiprolina, histidina e alanina (CARPITA, 1996; SHOWALTER, 1993).

Além da hidroxiprolina, as extensinas têm na sua constituição outros aminoácidos como a histidina, a lisina, a serina, a tirosina e a valina sendo pobre em aspartato e glutamato (CASSAB e VARNER, 1988).

Um outro grupo de proteínas ricas em hidroxiprolina é o das proteínas das arabogalactanas, com um grau de polimerização superior ao das extensinas. São compostos hidrossolúveis com elevado grau de acidificação

(FRY, 1991). São constituídos por dois hidratos de carbono, a L-arabinose e a D-galactose, constituindo-se em cadeias polissacarídicas de β -1,3 galactose ramificadas lateralmente com β -1,6 galactose. As cadeias laterais têm por vezes, ramificações com arabinose e outros monossacarídeos menos abundantes (FINCHER *et al.*, 1983).

Outro grupo de proteínas ricas em hidroxiprolina são as lecitinas. Segundo VARNER e LIN (1989), as lecitina, para além da hidroxiprolina, têm na sua constituição serina à razão de 4:1, contendo também alanina, cisteína, e glicina. As cadeias glucídicas são compostas por três a quatro unidades de arabinose ligadas à hidroxiprolina e alguns monómeros de galactose ligados à serina (SHOWALTER, 1993). Tal como as extensinas, as lecitinas têm localização extracelular, são ricas em arabinose, hidroxiprolina, serina e têm ligações semelhantes entre os hidratos de carbono e os aminoácidos constituintes.

As outras duas classes são as proteínas ricas em glicina e as proteínas ricas em prolina. Estas estão menos estudadas tanto em relação à sua estrutura como em relação às funções que desempenham na parede celular.

SHOWALTER (1993) refere que as proteínas ricas em glicina são caracterizadas pela sua estrutura primária repetitiva sob a forma de pequenas unidades sequenciais de aminoácidos, contendo 70% de glicina. O mesmo autor refere a existência de dois tipos de proteínas ricas em glicina, um característico da parede celular e outro existente no citoplasma de célula vegetal.

Em relação às proteínas ricas em prolina também se considera a existência dois tipos. Num deles, a proteína faz parte da parede celular e no outro a proteína rica em prolina é produzida em resposta às infecções provocadas na planta pelas bactérias que fixam o azoto (SHOWALTER, 1993).

A partir dos dados quantitativos existentes, podemos concluir que as glicoproteínas representam uma pequena quantidade do azoto total existente nas plantas forrageiras inteiras. As matérias azotadas presentes nos resíduos da parede celular, tanto na parede celular total (NDF) como na fracção ADF, são essencialmente proteínas intracelulares insolúveis (JARRIGE *et al.*, 1995) com uma composição idêntica à proteína dos conteúdos citoplásmicos, embora com maior quantidade de hidroxiprolina (GORDON *et al.*, 1985).

“...also lignocellulosic feeds of better quality can be used in such a way. To obtain most profit from such feeds under these circumstances, attention should be paid to way of feeding as well as type of the better-quality feed.”

A. J. H. Van Es, 1985

Capítulo 4 – DEGRADAÇÃO DA PAREDE VEGETAL

No rúmen, a degradação dos polissacarídeos constituintes das paredes vegetais é realizada por um conjunto três populações microbianas presentes neste ecossistema: as bactérias, os protozoários e os fungos. Dentro de cada classe destes microrganismos, diferentes espécies actuam nesta degradação e, ao nível celular, diferentes enzimas são sintetizadas. Esta diversidade do ponto de vista enzimático, de espécies e de populações, representa, sem dúvida, uma vantagem ecológica para o ruminante, permitindo-lhe assegurar, de maneira extremamente eficaz, a degradação dos constituintes citoplásmicos e parietais das células vegetais.

4.1 – ENZIMAS NECESSÁRIAS PARA DEGRADAR A PAREDE VEGETAL

A diversidade de enzimas produzidas por um microrganismo reflecte a diversidade das moléculas que constituem as paredes vegetais e a diversidade de ligações químicas existentes entre os polissacarídeos. Com efeito, as paredes vegetais são essencialmente compostas de microfibrilas de celulose incluídas numa matriz composta por numerosos outros polissacarídeos, as hemiceluloses e as pectinas, e a lenhina (Figura 4.1) (JARRIGE *et al.*, 1995; ÅMAN, 1993).

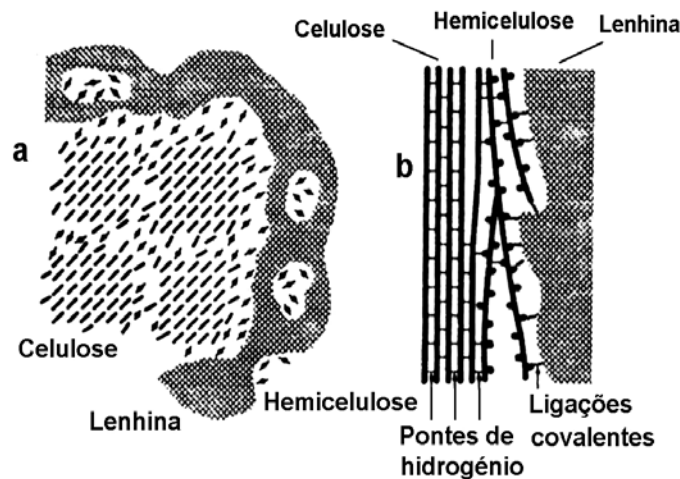


Figura 4.1 - Modelo mostrando a associação entre a celulose, as hemiceluloses e a lenhina na parede celular da madeira (a - corte transversal; b - corte longitudinal) (adaptada de FENGEL e WEGENER, 1984 citados por GRENET e BESLE, 1991).

Como já foi referido, a celulose é um composto estrutural das paredes celulares dos vegetais superiores. É um homopolímero formado por longas cadeias lineares de unidades de D-glucose ligadas entre si por ligações β -1,4. Também se estabelecem algumas ligações de hidrogénio intermoleculares e intramoleculares (Figura 4.1), definindo zonas muito organizadas ou cristalinas, separadas por regiões amorfas. A associação das cadeias de celulose forma microfibrilas que se organizam em fibras (TOMME *et al.*, 1995). Os outros polissacarídeos estruturais podem ser de composição muito diversa e são essencialmente heteropolímeros de estrutura complexa. Encontramos xilanas, compostos maiores dos polissacarídeos não celulósicos, glucanas, xiloglucanas, ramnogalacturananas, arabinanas, arabinogalactanas, mananas e glucuronomananas (ÅMAN, 1993). As paredes vegetais podem ser mais ou menos lenhificadas e a sua composição em celulose e polissacarídeos não celulósicos, assim como a sua proporção relativa, varia segundo a natureza do vegetal (mono ou dicotiledónea), o tecido considerado (parede primária ou parede secundária) e a idade da planta, entre outros factores. Os diferentes componentes estão ligados entre si por ligações covalentes, iónicas ou do tipo hidrogénio, formando uma rede compacta que confere à parede vegetal rigidez e resistência à degradação pela população microbiana do rúmen (JARRIGE *et al.*, 1995; TOMME *et al.*, 1995; ÅMAN, 1993; HATFIELD, 1993).

Na Figura 4.2 é possível ver um modelo de organização da parede primária de uma gramínea. A celulose está ligada aos outros polímeros, principalmente às glucanas, xilanas, xiloglucanas por ligações de hidrogénio. Algumas ligações do tipo éster são estabelecidas, por exemplo, entre os ácidos poligalacturónicos e as arabinogalactanas e do tipo éter entre os resíduos de arabinose das xiloglucanas e os ácidos fenólicos da lenhina. A presença da lenhina está muitas vezes correlacionada com uma diminuição da digestibilidade dos vegetais e o tipo e o grau de ligações entre a lenhina e os outros constituintes parietais parece ser o factor limitante (FORANO, 1998).

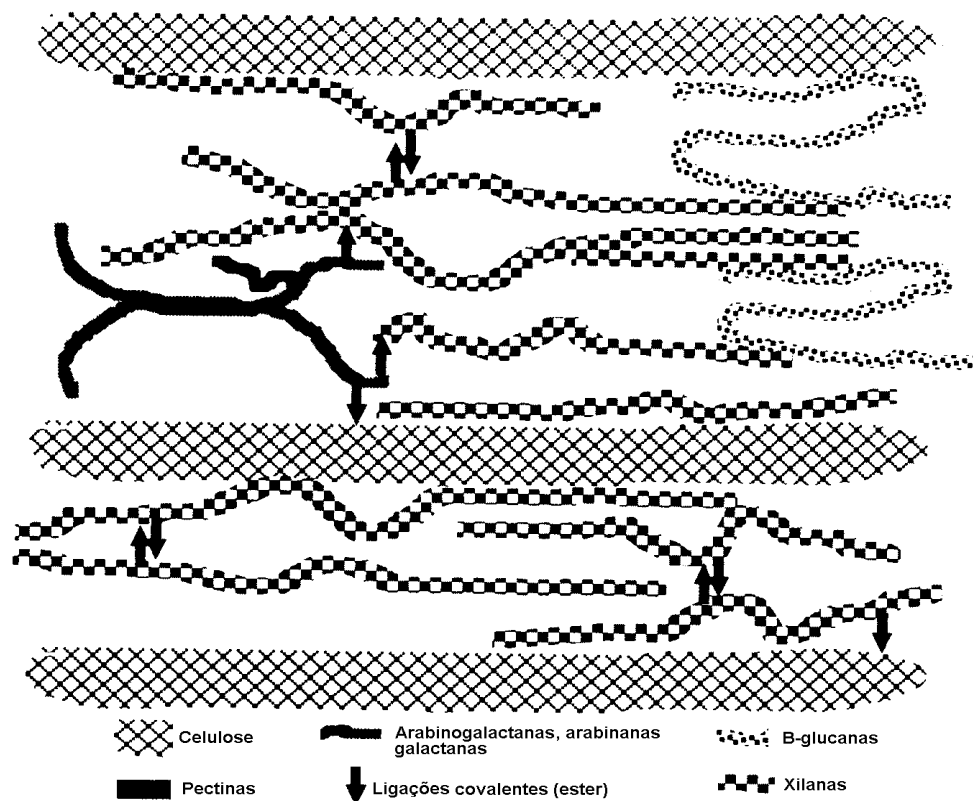


Figura 4.2 – Representação esquemática da composição da parede primária de uma gramínea (adaptada de HATFIELD, 1993)

A degradação dos diferentes polímeros em compostos simples, utilizáveis como fonte de energia pelos microrganismos do rúmen, necessita de uma multiplicidade de enzimas (Figura 4.3).

Com efeito, as enzimas hidrolisam as cadeias de polímeros, mas também são necessárias enzimas para degradar as ligações entre polímeros (FORANO, 1998).

A hidrólise completa da celulose em monómeros, requer a acção sinérgica das endoglucanases, enzimas que hidrolizam aleatoriamente as ligações situadas no interior das cadeias, e das exoglucanases ou celobiohidrolases, enzimas que libertam unidades de celobiose, dímero de glucose, a partir da extremidade da cadeia. No final, a presença de uma β -glucosidase ou celobiase, enzima que quebra a ligação β -1,4 da celobiose origina duas moléculas de glucose (TOMME *et al.*, 1995).

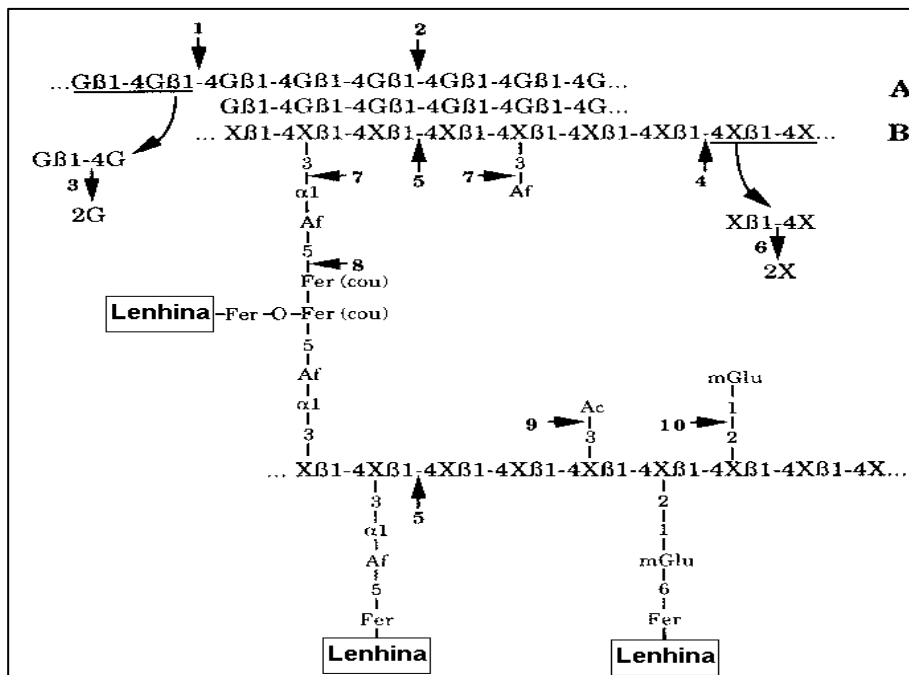


Figura 4.3 – Representação esquemática da acção enzimática sobre as principais ligações químicas que se encontram na parede celular das plantas forrageiras (adaptada de FONTY *et al.*, 1995). (A-celulose; B-xilana; Af-arabinose; Fer-ácido ferúlico; Cou-ácido cumárico; G-glucose; mGlu-ácido 4-0-metil-glucurónico; X-xilose; Ac-acetato; 1-exoglucanase; 2-endoglucanase; 3-celobiase; 4-exoxilanase; 5-endoxilanase; 6-xilosidase; 7- α -L-arabinofuranosidase; 8-ácido ferúlico ou cumárico esterase; 9-0-acetil xilanase esterase; 10- α -glucuronidase).

Também para a hidrólise das xilanas, a população microbiana do rúmen necessita de produzir enzimas endoxilanases, exoxilanases e xilosidasas sendo também necessárias, neste caso, enzimas desmembrantes do tipo esterases (Figura 4.3) (SELINGER *et al.*, 1997). A acção das esterases é particularmente importante, já que estas enzimas permitem a ruptura de ligações entre lenhinas e xilanas, tornando estas últimas acessíveis às xilanasas, o que vai aumentar a digestibilidade da parede vegetal (FORANO, 1998).

Os microrganismos do rúmen estudados até ao momento, possuem equipamento enzimático que lhes permite hidrolisar a quase totalidade das ligações químicas presentes nos compostos parietais excepto a lenhina, cuja degradação necessita da presença de oxigénio, não podendo ter lugar no rúmen (CHESSON e FORSBERG, 1997; FONTY *et al.*, 1995).

4.2 - OS MICRORGANISMOS DO RÚMEN IMPLICADOS NA DIGESTÃO DA PAREDE CELULAR

4.2.1 - BACTÉRIAS

Apesar do papel importante que as populações de protozoários e fungos do rúmen têm na digestão da parede celular vegetal, são as bactérias os microrganismos mais activamente implicados neste processo. As bactérias são importantes qualitativamente, pela sua alta actividade enzimática, e quantitativamente, pela amplitude da sua repercussão devido à sua elevada concentração no rúmen.

Tendo em conta o número (10^9 células.ml⁻¹) e a aptidão para hidrolisar a celulose, as três espécies bacterianas celulolíticas predominantes no rúmen são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* (FONDEVILA, 1998; CHESSON e FORSBERG, 1997; STEWART *et al.*, 1997; FONTY *et al.*, 1995). Têm características peculiares que as diferenciam de outras espécies que podem estar também implicadas na degradação da parede celular. As bactérias celulolíticas secundárias como *Butyrivibrio fibrisolvens*, dos quais só algumas estirpes são celulolíticas, *Clostridium longisporum*, *Clostridium locheadii* e *Eubacterium cellulosolvens*, têm uma importância reduzida na digestão da parede celular (STEWART *et al.*, 1997; DEHORITY, 1993). Nas três últimas espécies referidas, a pouca importância resulta da sua escassa concentração no rúmen e tanto as estirpes *Butyrivibrio fibrisolvens* (AKIN e RIGSBY, 1985) como *Clostridium longisporum* (VAREL *et al.*, 1995) não possuem estruturas de adesão em relação à celulose, o que limita a sua capacidade de acção para a digestão deste substrato.

É necessário considerar ainda outras espécies de bactérias não celulolíticas que, utilizando produtos resultantes da hidrólise da parede vegetal, podem contribuir de forma determinante para evitar efeitos de retro-inibição enzimática por acumulação de produtos resultantes do catabolismo. Ao mesmo tempo, fornecem ao meio ruminal nutrientes essenciais como o amoníaco e os ácidos gordos ramificados, para serem utilizados pelas bactérias mais activamente implicadas no processo de digestão da parede celular (FONDEVILA, 1998).

Embora as bactérias celulolíticas se caracterizem pela sua alta especialização, no Quadro 4.1 é possível constatar que a maioria das bactérias que fermentam os hidratos de carbono podem utilizar uma grande diversidade de monossacarídeos e dissacarídeos como nutrientes, incluindo aqueles derivados da fermentação dos polissacarídeos estruturais.

Outros autores (FORANO, 1998, CHESSON e FORSBERG, 1997; STEWART *et al.*, 1997; FONTY *et al.*, 1995) referem que as principais espécies celulolíticas degradam igualmente, de forma muito eficaz, os outros polissacarídeos da parede vegetal ainda que sejam incapazes de os utilizar. Por exemplo, a espécie *Fibrobacter succinogenes* utiliza exclusivamente a glucose e a celobiose como fonte de carbono e de energia, o que mostra a sua grande especialização na função celulolítica. Por seu lado, as espécies bacterianas secundárias como *Butyrivibrio fibrisolvens* e a não celulolítica *Prevotella ruminicola*, degradam eficazmente as xilanas. A bactéria *Prevotella ruminicola* é incapaz de degradar a celulose, mesmo podendo utilizar as celodextrinas como fonte de energia.

Ou seja, as bactérias celulolíticas utilizam unicamente a celulose e os seus produtos como nutrientes pelo que se vêm obrigadas a especializarem-se na hidrólise daquele polímero e dos seus produtos (celodextrinas). A hidrólise ocorre num meio líquido que favorece a competição entre uma grande variedade de microrganismos e onde a composição química e a estrutura das forragens ingeridas apresenta grande diversidade e complexidade. Para o conseguirem, as bactérias têm que sintetizar grande quantidade e variedade de enzimas garantindo a sua acção perante uma ampla diversidade de substratos (FONDEVILA, 1998).

De acordo com WEIMER (1996), as celulases localizam-se principalmente na superfície das bactérias para favorecer o contacto com o substrato. No mesmo sentido, as bactérias celulolíticas desenvolveram diversos mecanismos muito especializados de aderência íntima aos substratos. Estes mecanismos evitam a degradação das celulases pelas proteases ruminais, protegem as bactérias da acção predadora dos protozoários e evitam a saída do rúmen. Também favorecem a captação preferencial dos produtos resultantes da hidrólise em relação a outras espécies bacterianas.

Quadro 4.1 - Utilização dos hidratos de carbono pelas bactérias ruminais, celulolíticas e não celulolíticas (adaptado de WEIMER, 1996 citando HUNGATE, 1966 e RUSSELL, 1985).

Espécies bacterianas	Polissacarídeos	Mono e Dissacarídeos
Celulolíticas		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	celulose, celodextrinas	G, C
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	celulose, xilanose, pectina, celodextrinas	C
<i>Ruminococcus albus</i>	celulose, xilanose, celodextrinas	G, C, X, A
Celulolíticas secundárias		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	celulose, xilanose, dextrina, pectina, celodextrina	G, Ga, Mn, Fr, M, X, L, C
<i>Clostridium longisporum</i>	celulose	G, Ga, Fr, C, M, L, S
<i>Clostridium locheadii</i>	celulose, dextrina	G, M, S
Não celulolíticas		
<i>Prevotella ruminicola</i>	pectina, amido, dextrina, celodextrinas	G, Ga, Fr, L, C, X, A, R, M
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	amido	M
<i>Selenomonas ruminantium</i>	amido, dextrina, celodextrinas	G, Ga, Fr, X, A, C, M, L, S
<i>Streptococcus bovis</i>	amido, celodextrinas	G, Ga, Fr, Mn, C, M, L, S
<i>Succinomonas amylolytica</i>	amido, dextrina	
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	dextrina, pectina	G, Ga, Mn, X, M, A, Fr, S

A-arabinose; C-celobiose; Fr-frutose; G-glucose; Ga-galactose; L-lactose; M-maltose; Mn-manose; R-ramnose; S-sacarose; X-xilana

DEHORITY (1993), comparado as espécies em relação às suas capacidades para degradar os substratos fibrosos, obteve resultados muito diferentes devido, basicamente, à variedade dos substratos e às estirpes bacterianas utilizadas. Refere que algumas das espécies bacterianas mais abundantes no rúmen como *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Prevotella ruminicola* são capazes de hidrolisar, além da celulose, da pectina e das hemiceluloses, outros polissacarídeos em menor grau, podendo mesmo utilizar as pentoses e os ácidos urónicos resultantes.

No Quadro 4.2 é possível verificar que as três espécies celulolíticas mais importantes também têm despolimerases com capacidade para “rasgar” as cadeias de hemiceluloses e, em menor amplitude, das pectinas das forragens. Isto resulta da maior especificidade das glucanases pelo tipo de ligações existentes nas hemiceluloses, ainda que *Fibrobacter succinogenes* não seja capaz de utilizar os produtos resultantes da hidrólise e *Ruminococcus flavefaciens* o faça de forma reduzida. (FONDEVILA e DEHORITY, 1994).

Quadro 4.2 - Nível da digestão da parede celular das forragens e utilização dos produtos resultantes por culturas puras de diferentes estirpes bacterianas (g.Kg⁻¹) (adaptado de DEHORITY, 1993).

	Digestão celulose		Digestão hemiceluloses		Utilização hemicelulose		Digestão pectina		Utilização pectina	
	GR	LG	GR	LG	GR	LG	GR	LG	GR	LG
<i>F. succinogenes</i>										
A3c	794	616	540	603	21	51	-	-	-	-
S85	810	642	773	621	30	0	-	-	-	-
<i>R. flavefaciens</i>										
B1a	581	252	566	446	230	101	-	-	-	-
B34b	563	541	778	563	0	21	713	705	298	304
C1a	488	478	-	-	0	85	-	-	-	-
<i>R. albus</i>										
7	573	534	609	501	460	269	-	-	-	-
<i>B. fibrisolvens</i>										
H10b	149	59	519	354	413	341	-	-	-	-
D16f	-	-	-	-	-	-	550	367	526	366
<i>P. ruminicola</i>										
H8a	7	19	47	336	61	339	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	550	367	526	366

GR – gramínea (*Bromus inermis*); LG – leguminosa (*Medicago sativa*)

4.2.2 - PROTOZOÁRIOS

O efeito dos protozoários sobre a digestão da fibra depende do papel e da importância relativa dos distintos géneros e espécies no ecossistema ruminal (JOUANY e USHIDA, 1994; WILLIAMS e COLEMAN, 1988). Em geral, a presença de protozoários aumenta, directa ou indirectamente, a digestão ruminal da celulose e da hemicelulose quando comparados com animais cujo licor de rúmen está desprovido de protozoários (JOUANY e USHIDA, 1994).

Ainda que a actividade das enzimas implicadas na hidrólise da celulose como as endoglucanases, as β -celobiosidas e as β -glucosidas por um lado, e outras enzimas como as hemicelulases e as xilanases por outro, tenham sido encontradas nos protozoários do rúmen (WILLIAMS *et al.*, 1984), alguns autores continuam a especular sobre se a sua acção também não será devida, pelo menos em parte, às enzimas das bactérias que são fagocitadas (DEHORITY, 1993).

Quadro 4.3 - Degradação (%) de substratos celulósicos por culturas puras de protozoários, durante 24 horas (HEC – hexa-etilcelulose; CMC – carboximetilcelulose) (JOUANY e USHIDA, 1994).

	Celulose cristalina	HEC	CMC
<i>Eudiplodinium</i>	24,9 \pm 7,8	62,0 \pm 3,8	62,8 \pm 0,7
<i>Polyplastron</i>	30,6 \pm 2,9	55,2 \pm 5,5	60,3 \pm 1,3
<i>Epidinium</i>	10,0 \pm 2,7	62,3 \pm 0,9	63,7 \pm 2,6
<i>Entodinium</i>	vestígios	28,7 \pm 1,7	22,7 \pm 1,1
<i>Isotricha</i>	5,4 \pm 1,7	54,1 \pm 0,8	42,3 \pm 3,9

A partir de estudos com protozoários cultivados *in vitro*, tratados com antibióticos para eliminar a possível contaminação bacteriana (Quadro 4.3), observou-se que 30% de uma celulose cristalina foi degradada por protozoários dos géneros *Eudiplodinium* e *Polyplastron*, e cerca de 10% por protozoários do género *Epidinium* (JOUANY e USHIDA, 1994). Os mesmos autores verificaram, também, que a capacidade para degradar substitutos da celulose (hexa-etilcelulose e carboximetilcelulose) foi maior para todos os protozoários sendo, no entanto, mais limitada para os géneros *Entodinium* e *Isotricha*. No entanto, o crescimento em meios que incluam polissacarídeos estruturais como única fonte de energia, comparativamente com um meio onde não exista substrato algum (Quadro 4.4), é muito variável e somente os protozoários dos géneros *Eudiplodinium* e *Epidinium* respondem positivamente à adição de uma fonte de celulose e de xilana.

Entre os protozoários *Ophryoscolecidae*, os que pertencem aos géneros *Eudiplodinium*, *Polyplastron* e *Epidinium* degradam activamente as xilanas, utilizando os produtos finais como fonte de nutrientes. Degradam também os substitutos da celulose com baixo grau de cristalinidade, ainda que não sejam capazes de utilizar os produtos finais da hidrólise. Somente os protozoários dos

gêneros *Eudiplodinium* e *Polyplastron* são capazes de digerir e utilizar a celulose cristalina.

Quadro 4.4 – Efeito do substrato sobre alguns gêneros de protozoários do rúmen. Os valores referem-se à variação percentual da população protozoária após 24 horas de incubação (CMC – carboximetilcelulose) (JOUANY e USHIDA, 1994).

	Controlo	Amido	Celulose cristalina	Xilana	CMC
<i>Eudiplodinium</i>	<5	401	147	200	<5
<i>Polyplastron</i>	34	85	58	60	15
<i>Epidinium</i>	6	12	9	100	<5
<i>Entodinium</i>	<5	<5	<5	<5	<5
<i>Isotricha</i>	95	181	89	77	103

Os protozoários do género *Entodinium* não são capazes de actuar sobre aqueles tipos de substratos, ainda que os do género *Isotricha* tenham certa actividade β -glucanase não utilizando, no entanto, os produtos da hidrólise da celulose para o seu crescimento (JOUANY e USHIDA, 1994; WILLIAMS *et al.*, 1984).

Quadro 4.5 - Efeito dos protozoários ciliados do rúmen na digestão dos constituintes da parede vegetal (%) (adaptado de USHIDA *et al.*, 1990).

	Carneiros		Desfaunados		Refaunados	
	Alimento	Palha	Palha+milho	Palha	Palha+milho	
Digestibilidade no rúmen						
Matéria orgânica		43,9	39,2	45,5		50,0
NDF		58,8	40,9	63,9		59,2
ADF		58,0	45,5	59,6		59,7
Hemiceluloses						
Arabanas		72,5	61,1	79,2		69,9
Xilanas		62,5	42,6	69,7		64,7
Mananas+galactanas		73,9	38,9	81,5		62,9

NDF - Fibra de detergente neutro; ADF - Fibra de detergente ácido.

A capacidade de despolimerizar as pectinas está presente em algumas espécies de protozoários. No entanto, segundo ORPIN (1984), a possibilidade daqueles protozoários utilizarem os produtos finais como fonte de energia é mínima. A capacidade dos protozoários para aderirem às partículas vegetais é reduzida, excepto no caso dos holótricos (protozoários ciliados cuja ciliatura

uniforme reveste todo o corpo) estimulados, provavelmente, por quimiotactismo para com os açúcares solúveis (BAUCHOP, 1989).

Embora alguns autores tenham verificado uma diminuição na degradação da parede celular no rúmen de carneiros desfaunados (Quadro 4.5) com um correspondente aumento da digestão intestinal da fibra, não suficiente para compensar o descréscimo da digestão no rúmen, (USHIDA *et al.*, 1990), podemos considerar que a actividade fibrolítica dos protozoários é muito reduzida (FONDEVILA, 1998).

4.2.3 - FUNGOS

ORPIN ao identificar em 1975 os zoósporos de fungos do ecossistema ruminal revelou a existência daqueles microrganismos, até aí classificados como protozoários flagelados, direccionado estudos de microscopia electrónica à colonização fúngica dos fragmentos vegetais.

A população de fungos anaeróbicos do rúmen está directamente relacionada com o conteúdo em alimentos fibrosos da dieta do ruminante. A sua proporção diminui em dietas ricas em amido ou açúcares solúveis (GRENET *et al.*, 1989). Os fungos ruminais têm capacidade enzimática para hidrolisar a celulose e a xilanose. Parece, no entanto, que não têm a mesma capacidade para hidrolisar as pectinas (FONTY e JOBLIN, 1991).

A sua actividade enzimática face aos diferentes substratos é variável dependendo da sua origem filogenética, em especial da sua estrutura rizoidal. Segundo BERNALIER *et al.* (1992) e BORNEMAN e AKIN (1990), os fungos de algumas espécies *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces comunis* e *Orpinomyces joyonii* são tanto ou mais eficientes na degradação dos polissacarídeos estruturais do que as bactérias celulolíticas mais activas.

A contribuição dos fungos para a digestão ruminal (Quadro 4.6) e a sua acção sobre a parede vegetal parece estar relacionada com a intensidade da sua colonização.

Utilizando microscopia electrónica, BAUCHOP (1989), verificou que os zoósporos aderem aos tecidos vegetais não lenhificados, degradando-os rapidamente. Aderem de forma ainda mais rápida às partículas vegetais,

preferencialmente aos estomas e às zonas de corte dos tecidos lenhificados (esclerenquima e xilema) (GRENET *et al.*, 1989), sendo particularmente activos em presença de substratos muito lenhificados (JOBLIN e NAYLOR 1989 citados por FONDEVILA, 1998).

Quadro 4.6 - Degradação de diversos substratos vegetais (% de desaparecimento de matéria seca) por diferentes espécies fúngicas, após incubação *in vitro* durante seis dias (adaptado de FONTY e GOUET, 1994).

	Palha de Trigo	Azevém	Canas de milho
<i>Neocallimastrix frontalis</i>	35,1	30,0	59,8
<i>Piromyces comunis</i>	26,5	37,5	60,0
<i>Orpinomyces joyonii</i>	33,5	35,2	58,7
<i>Caecomyces comunis</i>	4,8	11,0	58,0

De facto, está ainda por evidenciar claramente a capacidade dos fungos utilizarem a lenhina como fonte de nutrientes. No entanto, a espécie *Neocallimastrix frontalis* pode solubilizar pequenas quantidades de lenhina da parede celular vegetal, provavelmente devido à solubilização dos compostos fenólicos de forma mais eficiente do que as bactérias, aumentando assim a facilidade de acesso da população bacteriana aos polissacarídeos estruturais (BORNEMAN e AKIN, 1990). Por outro lado, a acção mecânica dos fungos ruminais sobre a parede celular vegetal diminui a rigidez estrutural das forragens favorecendo a ruptura das partículas forrageiras e aumentando a superfície acessível à acção das bactérias (BORNEMAN e AKIN, 1990; ORPIN, 1984).

Ainda não está totalmente quantificada a contribuição dos fungos para a digestão *in vivo* da parede celular vegetal. No entanto, FONDEVILA (1998) refere que os trabalhos de FONTY *et al.* (1992) evidenciaram o efeito sinérgico dos fungos no desaparecimento da matéria seca ou na concentração de ácidos gordos voláteis.

4.3 – EQUIPAMENTO ENZIMÁTICO DOS MICRORGANISMOS DO RÚMEN

Diversos estudos bioquímicos têm mostrado que os microrganismos do rúmen produzem numerosas enzimas celulolíticas, muitas vezes associadas a

complexos de elevado peso molecular, o que torna o seu isolamento muito difícil.

4.3.1 DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO ENZIMÁTICO

Mais de oitenta genes foram isolados, a sua sequência de nucleótidos foi determinada e as proteínas por eles codificadas foram caracterizadas. Por exemplo, dezanove genes de glicosil-hidrolases foram clonados a partir de quatro estirpes diferentes de *Fibrobacter succinogenes* dos quais treze codões para as celulases, um para uma liquenase e cinco para xilanases (FORANO, 1998). As celulases e as xilanases foram igualmente purificadas por via bioquímica a partir de culturas *Fibrobacter succinogenes* e mais de vinte enzimas implicadas na degradação das paredes vegetais podem ser produzidas pela estirpe S85 daquela espécie bacteriana (MALBURG *et al.*, 1997; IYO e FORSBERG, 1996). Uma grande multiplicidade de enzimas em particular de celulases, das quais algumas apresentam propriedades semelhantes, podem ser produzidas por *Fibrobacter succinogenes*. No entanto, o papel que cada uma tem em relação à degradação da parede vegetal não é ainda bem conhecido.

Oito genes de celulases e um gene de xilanase foram isolados de cinco estirpes de *Ruminococcus albus*, e oito genes de endoglucanases e três de xilanases foram clonados a partir de três estirpes de *Ruminococcus flavefaciens* (SELINGER *et al.*, 1997; FORANO *et al.*, 1996). Em cinco estirpes diferentes de *Butyrivibrio fibrisolvens*, os mesmos autores, identificaram quatro genes de celulases e isolaram seis codões para xilanases e esterases. Um gene de celulase foi isolado no *Clostridium longisporum* e genes de endoglucanases e de xilanases foram igualmente clonados a partir da espécie bacteriana *Prevotella ruminicola*.

Também foram isolados genes de celulases e de hemicelulases nos fungos existentes no ecossistema ruminal. Quatro genes de celulases e oito genes de xilanases e esterases foram clonados a partir de *Neocallimastix frontalis*, quatro codões para as xilanases ou manases a partir de *Piromyces communis*, seis genes de celulases, um de liquenase e um de xilanase a partir de

Orpinomyces joyonii (FORANO, 1998; SELINGER *et al.*, 1997; FORANO *et al.*, 1996).

Dois genes de celulases e dois genes de xilanases foram isolados dos protozoários *Epidinium caudatum* e *Polyplastron multivesiculatum*, não estando, no entanto, ainda caracterizados (SELINGER *et al.*, 1997).

Numerosos genes de hidrolases de microrganismos do rúmen têm sido caracterizado nestes últimos anos. A análise da sequência de nucleótidos de genes clonados mostra que um grande número destas enzimas estão organizadas em diferentes módulos ou domínios, estruturalmente e funcionalmente independentes. Assim, encontramos, para um mesmo polipéptido, um ou mais domínios catalíticos que podem ter a mesma especificidade ou especificidades diferentes, os domínios de ligação à celulose, ou outros domínios cuja função não é ainda bem conhecida. Estes diferentes domínios estão muitas vezes separados por sequências de junções ricas em prolina, treonina e serina, conferindo uma flexibilidade da enzima a este nível (TOMME *et al.*, 1995).

A organização em multidomínios das enzimas é ilustrada na Figura 4.4 que representa a estrutura primária de três xilanases de *Ruminococcus flavefaciens*. A Xilanase A (XILA) possui um domínio catalítico xilanase (A) pertencente à família 11 das glicosil-hidrolases (TOMME *et al.*, 1995), e um outro domínio de especificidade diferente, respectivamente esterase e liquenase. Estas duas enzimas compreendem, igualmente, um domínio de função desconhecida (B) que apresenta semelhanças com os domínios presentes em certas xilanases de microrganismos termófilos tais como *Thermotoga maritima* (WINTERHALTER *et al.*, 1995). Neste caso, ao ser isolado um segmento do DNA de *Thermotoga maritima*, verificou-se a existência de uma endo-1,4- β -D-xilanase, tendo sido determinada a sequência de nucleótidos do gene da xilanase designada por XINA, uma das xilanases conhecidas mais resistentes à temperatura.

A presença destes domínios nas enzimas de microrganismos mesófilos, como as bactérias do rúmen, ainda não foi explicada. A organização em multidomínios das xilanases dos microrganismos do rúmen sugere que estas proteínas evoluíram a partir de uma reserva ancestral de genes (codões para

polipéptidos do tamanho de um domínio) que, duplicados e combinado em ordens diferentes, originaram numerosas enzimas diferentes.

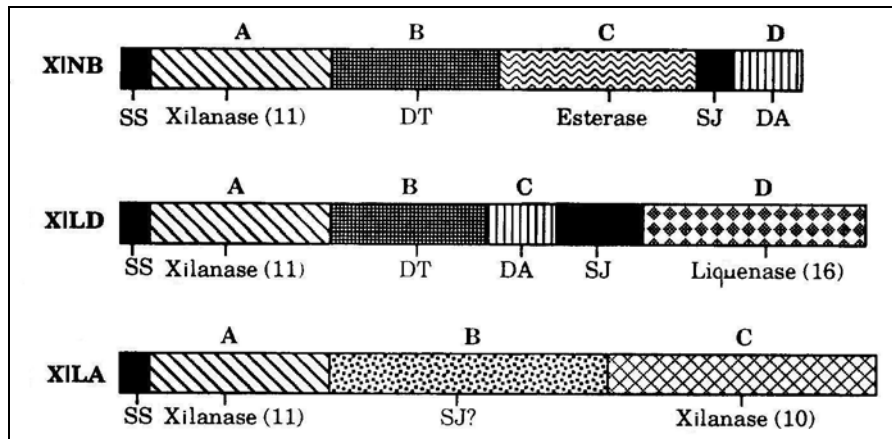


Figura 4.4 - Estrutura modular de três xilanases (XILA, XINB e XILD) de *Ruminococcus flavefaciens* 17 (adaptada de MALBURG *et al.*, 1996 citados por FORANO, 1998).

A estrutura complexa destas xilanases reflecte, sem dúvida, a complexidade das paredes vegetais e as relações estreitas estabelecidas entre os diferentes polissacarídeos constituintes daquelas paredes. A presença de muitos domínios catalíticos numa mesma proteína permite uma melhor eficácia da acção da enzima na medida em que, os produtos resultantes da actividade de um domínio catalítico, podem ser directamente influenciados pelo domínio adjacente (FORANO, 1998).

4.3.2. ORGANIZAÇÃO DOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Estudos bioquímicos demonstraram que as espécies bacterianas *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e os fungos, produzem complexos multi-enzimáticos do tipo celulasas e/ou xilanases que se fixam à celulose (CHESSON e FORSBERG, 1997; WHITE *et al.*, 1993). Complexos de elevado peso molecular e com actividade celulásica, foram igualmente encontrados em *Fibrobacter succinogenes*. Das enzimas produzidas pela população microbiana do rúmen caracterizadas até ao momento, poucas possuem um domínio de ligação à celulose ainda que tais domínios sejam frequentes nas enzimas produzidas pelas bactérias

celulolíticas anaeróbias estritas existentes noutros ecossistemas (TOMME *et al.*, 1998; TOMME *et al.*, 1996; TOMME *et al.*, 1995).

Segundo TOMME *et al.* (1998), os domínios de ligação à celulose são discretos módulos proteicos encontrados em grande número de carbohidrolases e em algumas proteínas não hidrolíticas. Para os mesmos autores, já foram classificadas cerca de 200 sequências com diferentes propriedades, em 13 famílias microbianas diferentes, variando em tamanho de 4 a 20 kDa e ocorrendo internamente nos polipéptidos ou nas posições N-terminal e C-terminal.

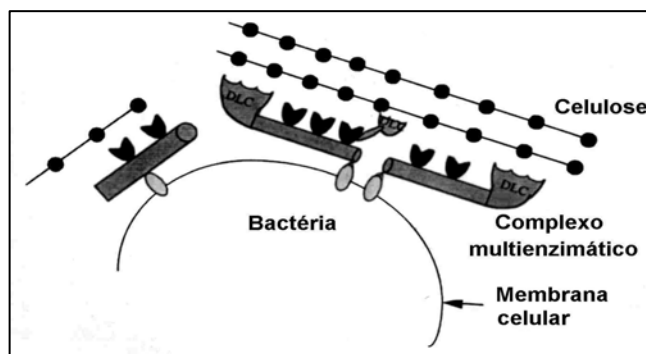


Figura 4.5 – Representação da organização de um complexo multi-enzimático à superfície da membrana bacteriana. As enzimas são fixadas a uma proteína que pode transportar domínios de ligação à celulose (DLC), permitindo a adesão da bactéria à celulose (adaptada de FORANO, 1998).

A ligação ao substrato, no caso da população microbiana do ecossistema ruminal, parece ser mediada por proteínas específicas desprovidas de actividade catalítica e presentes nos complexos multi-enzimáticos referidos anteriormente (CHESSON e FORSBERG, 1997; WHITE *et al.*, 1993).

Certas enzimas de *Ruminococcus sp.* ou de fungos anaeróbios possuem um domínio composto de sequências repetidas (Figura 4.3) que permite a sua fixação a uma proteína de junção. Esta proteína de junção poderá associar as suas enzimas aos constituintes de complexo multi-enzimático existentes à superfície celular, como acontece na bactéria termófila *Clostridium thermocellum* (TOMME *et al.*, 1995), em *Ruminococcus flavefaciens* (KIRB *et al.*, 1997) e nos fungos anaeróbios *Piromyces comunis* e *Neocallimastix frontalis* (FANUTTI *et al.*, 1995), conferindo alguma sinergia ao sistema (Figura 4.5).

De acordo com FORANO (1998), a organização das enzimas da espécie bacteriana celulolítica *Fibrobacter succinogenes* ainda não é conhecida, mas a presença de um sistema multi-enzimático à superfície do microrganismo é igualmente provável.

Em conclusão, podemos dizer que cada microrganismo estudado produz uma gama variada de mais de vinte enzimas, com muitas proteínas semelhantes ao nível da sua estrutura molecular e das suas propriedades enzimáticas. A multiplicidade e a complexidade encontradas, tanto ao nível da estrutura das enzimas como da sua organização em sistema multi-enzimático, confere ao ecossistema ruminal a sua grande eficácia para degradar a parede celular vegetal.

“The nitrogenous components of the diet support the protein metabolism of the rumen organisms and their host, but the interactions of the diet, microbes, and animal host that determine the net supply of protein to the host are complex.”

P. J. Van Soest, 1994.

Capítulo 5 – NECESSIDADES AZOTADAS E METABOLISMO AZOTADO DOS MICRORGANISMOS DO RÚMEN

Os ruminantes são animais que podem cobrir as suas necessidades proteicas vitais através da ingestão de forragens pobres em proteína e deficientes em aminoácidos essenciais. Esta capacidade, única entre os mamíferos, está directamente ligada à actividade dos microrganismos do rúmen. Uma fracção importante desta população microbiana tem capacidade para degradar os constituintes azotados dos alimentos e das células endógenas resultantes da descamação da parede interna do rúmen. Também consegue utilizar a ureia que passa do sangue para o interior do rúmen, por difusão, através da parede ruminal, ou que chega ao rúmen através da saliva. O azoto fica disponível para a síntese de proteína microbiana, principalmente sob a forma de amoníaco, aminoácidos e pequenos péptidos.

A passagem da proteína alimentar não degradada e da massa microbiana produzida no rúmen, através do omaso, abomaso até chegar ao intestino, constitui a verdadeira forma de fornecimento de aminoácidos nos ruminantes.

O metabolismo das substâncias azotadas que ocorre no rúmen, pode ser dividido em dois grandes processos. O primeiro corresponde à degradação da proteína alimentar resultante da actividade proteolítica da população microbiana. O segundo corresponde à síntese de proteína microbiana que

beneficia da energia que fica disponível no rúmen após a fermentação dos glúcidos.

5.1 - DEGRADAÇÃO DO AZOTO PROTEICO

O processo de degradação da proteína alimentar depende da taxa de hidrólise e do tempo que o alimento permanece no rúmen. Envolve duas fases. Primeiro as cadeias proteicas são fraccionadas, por hidrólises das ligações peptídicas (proteólise), originando péptidos e aminoácidos que, seguidamente, sofrem desaminação (Figura 5.1).

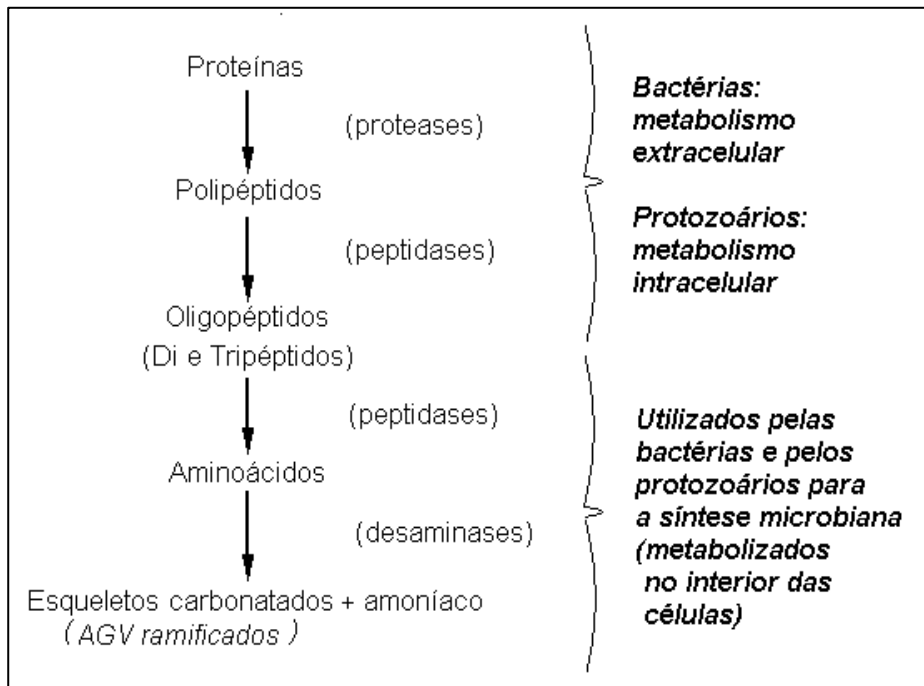


Figura 5.1 – Degradação das proteínas no rúmen (adaptada de JOUANY *et al.*, 1995).

DEMEYER (1976), citado por TAMMINGA (1979), baseado no aumento do nível de aminoácidos livres que aparecem no rúmen logo após a ingestão de alimentos, considerou que o factor limitante da degradação proteica no rúmen era a quantidade disponível de aminoácidos livres. No entanto, NUGENT e MANGAN (1978) consideraram ser a proteólise o principal factor limitante à degradação da proteína no rúmen. Por sua vez, WALLACE *et al.* (1990b),

concluíram que era a quantidade de péptidos existentes no rúmen que controlava a taxa de degradação da proteína alimentar. Os péptidos são fraccionados no fluído ruminal, quase exclusivamente por acção de aminopeptidases.

Utilizando diferentes substratos DEPARDON *et al.* (1995) e WALLACE *et al.* (1990a), concluíram que a dipeptidil-aminopeptidase tipo I e a exo-aminopeptidase tinham um papel predominante na hidrólise dos péptidos.

Numerosos estudos sobre o metabolismo dos péptidos pelos microrganismos do rúmen, demonstraram o efeito do tamanho dos péptidos e da hidrofobicidade dos aminoácidos que os compõem no catabolismo dos péptidos. A hidrofobicidade foi inicialmente estudada por CHEN *et al.* (1987) usando a triptona, uma enzima pancreática que hidrolisa a caseína. Os mesmos autores, ao realizarem estudos *in vitro*, verificaram que as bactérias do rúmen têm a mesma afinidade pelos péptidos hidrófilos e hidrófobos embora degradem os primeiros duas vezes mais depressa do que os segundos.

Outros autores (DEPARDON *et al.*, 1996; DEPARDON *et al.*, 1995), ao trabalharem com a triptona e com péptidos da proteína da soja, respectivamente, verificaram que apenas 33% e 75% dos péptidos tinham sido hidrolisados após 5 horas de incubação. Verificaram também que a população microbiana do rúmen nas condições em que o estudo foi feito, não degrada os aminoácidos hidrófilos significativamente mais depressa do que os aminoácidos hidrófobos.

WRIGHT (1967) citado por DEPARDON *et al.*, (1996), demonstrou que os pequenos péptidos e os aminoácidos eram convertidos em ácidos gordos voláteis mais rapidamente do que os péptidos de maior peso molecular (>2 kDa) que, por sua vez, eram incorporados preferencialmente na proteína microbiana, demonstrando a relação que o peso molecular dos péptidos tem com o seu metabolismo pelas bactérias do rúmen.

DEPARDON *et al.* (1996) e DEPARDON *et al.* (1995), observaram uma intensa conversão de péptidos de elevado peso molecular (4 a 2 kDa), em péptidos de menor tamanho (1 a 0,5 kDa). Verificaram também que a fracção de pequenos péptidos (>0,5 kDa) correspondia a 60% do total de péptidos encontrados no meio, ao fim de 5 horas de incubação.

Segundo WESTLAKE e MACKIE (1990), as bactérias do rúmen apenas podem assimilar péptidos com um peso molecular inferior a 750 Da. No entanto, nos trabalhos de DEPARDON *et al.* (1996), a proporção de péptidos com aquele peso molecular aumentou, indicando que a produção de pequenos péptidos foi maior do que a sua utilização pela população bacteriana.

Embora seja geralmente aceite que a proteólise e a desaminação estão condicionadas pelo pH do meio ruminal, vários trabalhos publicados sobre este assunto não são coincidentes, podendo-se concluir que há degradação da proteína alimentar sob os mais diversos valores de pH ruminal. Segundo LEWIS e EMERY (1962) citados por TAMMINGA (1979), o pH óptimo para a proteólise e para a desaminação deverá estar situado entre 6 e 7. Experiências *in vitro* mostraram que os limites, máximo e mínimo, de pH ruminal para a desaminação e conseqüente produção de amoníaco, se situam entre 4,5 e 7,7 (CHALMERS, 1969 e LEWIS e EMERY, 1962 citados por TAMMINGA, 1979). Há, no entanto, espécies bacterianas mais resistentes às variações do pH ruminal, suportando a espécie *Prevotella ruminicola* valores de pH 4 (MARTIN, 1992; RUSSELL e DOMBROWSKI, 1980).

A actividade proteolítica ao nível do ecossistema ruminal é devida, principalmente, à população bacteriana. As enzimas implicadas estão localizadas na face externa da membrana bacteriana (WESTLAKE e MACKIE, 1990). As proteases estariam presentes no periplasma, onde têm sido muitas vezes caracterizadas como sendo serino-proteases. Segundo WALLACE e COTTA (1988), as bactérias proteolíticas correspondem a 30-50% de toda a população bacteriana. A maior parte delas são também amilolíticas o que permite explicar a degradação muito mais activa das proteínas num regime alimentar rico em cereais, quando comparado com um regime onde predominam as forragens secas (USHIDA *et al.*, 1990).

As espécies bacterianas preponderantes mais frequentes são *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides amylophilus* e *Streptococcus bovis*. De referir que as bactérias anaeróbias facultativas colonizam a parede do rúmen onde têm uma forte actividade proteolítica (JOUANY *et al.*, 1995).

As bactérias degradam, principalmente, as proteínas solúveis. Os protozoários contribuem mais para a degradação das proteínas insolúveis, fagocitando bactérias e partículas de alimentos com tamanho apropriado (KAYOULI *et al.*, 1988; USHIDA e JOUANY, 1986). No entanto, USHIDA *et al.* (1990) referem que a eliminação dos protozoários aumenta a eficiência na síntese proteica do rúmen, ocorrendo um aumento na quantidade de proteína microbiana e uma diminuição na quantidade de proteína alimentar que chega ao duodeno.

Os protozoários holótricos são muito activos, assim como muitos do género *Entodinium* (*Entodinium caudatum* e *Entodinium simplex*). Ainda que as espécies *Entodinium medium* e *Ophryoscolex* spp. sejam proteolíticos, têm uma actividade proteolítica muito fraca (JOUANY *et al.*, 1995).

O fungo *Neocallimastix frontalis*, também foi reconhecido por WALLACE e JOBLIN (1985) como proteolítico.

O comportamento predador dos protozoários aumenta consideravelmente a taxa de renovação da proteína bacteriana que ocorre no rúmen. Varia de 0,003 a 0,27 h⁻¹ no caso de animais sem protozoários e é de 0,024 a 0,37 h⁻¹ nos animais com protozoários (WALLACE e MCPHERSON, 1987).

A velocidade da hidrólise ruminal das proteínas alimentares depende de características físico-químicas específicas da proteína tais como, a solubilidade, as estruturas primárias (aminoácidos terminais da ovalbumina), as estruturas secundárias e as estruturas terciárias (presença de 16 pontes dissulfúricas na albumina do soro bovino), mas também dos tratamentos que, eventualmente, sejam aplicados aos alimentos (aquecimentos, tratamento com aldeído fórmico). Segundo CHENG *et al.* (1981), a hidrólise das proteínas favorece a digestão dos grânulos de amido libertando-os do seu invólucro proteico.

O catabolismo dos péptidos no rúmen é mal conhecido. Os seus principais agentes são as bactérias *Prevotella ruminicola* e em menor escala *Butyrivibrio fibrisolvens*. Os protozoários apenas têm forte actividade especificamente sobre os dipéptidos. Os péptidos são rapidamente hidrolisados, mas a velocidade da hidrólise depende do tipo de proteína. Por exemplo, a degradação da caseína é suficientemente rápida para provocar a

sua acumulação. Acerca deste aspecto, WALLACE (1991) refere que a caseína é, muitas vezes, utilizada como substrato experimental sendo, no entanto, uma proteína atípica e por consequência pouco adequada para ser utilizada como modelo. A sua degradação é muito mais rápida do que a maioria das proteínas solúveis. Por exemplo, as albuminas de origem animal e vegetal são hidrolisadas de forma muito mais lenta (WALLACE, 1983).

No rúmen, a peptidólise mais frequente resulta da acção das dipeptidil-aminopeptidases dos tipos I a IV (WALLACE e MCKAIN, 1991).

Como as proteases, as peptidases extracelulares estão ligadas à membrana bacteriana. Os péptidos de grandes dimensões são submetidos a hidrólise extracelular produzindo oligopéptidos, tripéptidos, dipéptidos e ácidos aminados que são, de seguida, absorvidos pelas bactérias. Muitas bactérias são capazes de assimilar os pequenos péptidos e degradá-los em ácidos aminados no interior da célula. A acumulação intracelular dos péptidos depende do seu tamanho, mas também da sua hidrofobicidade (JOUANY *et al.*, 1995). De acordo com BRODERICK *et al.* (1988), a natureza das cadeias laterais não parece influenciar muito a velocidade de degradação dos péptidos neutros.

RUSSEL e HINO (1985) determinaram a transaminação e a descarboxilação da leucina em isovalerato, ligado à conversão de 2-oxo-glutarato em ácido glutâmico que é de seguida desaminado. Esta reacção, assim como a fermentação de aminoácidos como a alanina, a isoleucina e a valina, envolve a intervenção de co-factores redutores como o NAD. Estes, são regenerados por uma hidrogenase logo que a pressão parcial do hidrogénio seja muito baixa, como consequência da transferência do hidrogénio para as bactérias metanogénicas (JOUANY *et al.*, 1995).

A função do rúmen como uma grande cuba de fermentação e a presença de certas bactérias no fluído ruminal, promove a produção de gases. Os gases acumulam-se na parte superior do rúmen sendo parcialmente eructados pelo animal. No Quadro 5.1 é possível constatar que os principais gases ruminais são o dióxido de carbono e o metano, produtos finais do metabolismo bacteriano redutivo (CORREIA e CORREIA, 1985). A proporção daqueles gases está dependente da ecologia do rúmen e do balanço da fermentação. Ainda que uma grande parte do dióxido de carbono seja reduzida

a metano, a proporção do primeiro gás é duas a três vezes superior ao segundo.

Quadro 5.1 - Composição típica do gás ruminal.

Gás constituinte	%
Hidrogénio	0,2
Oxigénio	0,6
Azoto	7,0
Metano	27,0
Dióxido de carbono	65,0

CORREIA e CORREIA (1985).

As bactérias metanogénicas constituem um grupo especial de microrganismos responsáveis pela regulação do processo de fermentação no rúmen. São as principais responsáveis pela remoção do hidrogénio, reduzindo o dióxido de carbono com o hidrogénio para formar metano. A produção de metano mantém a concentração de hidrogénio a níveis muito baixos o que permite o crescimento de outras espécies bacterianas tornando o processo fermentativo mais eficiente. A remoção efectiva do hidrogénio pelas espécies metanogénicas leva a um aumento da actividade metabólica das espécies bacterianas produtoras de hidrogénio, havendo uma maior síntese de proteína microbiana e, conseqüentemente, um acréscimo de proteína disponível para o ruminante.

ASANUMA *et al.* (1999), estudando o efeito da adição de fumarato sobre a produção de metano pela população bacteriana do rúmen, verificaram que várias espécies amilolíticas e celulolíticas oxidavam o hidrogénio, utilizando o fumarato como aceitador final de electrões. Isto sugere que aquelas estirpes bacterianas competem com as bactérias metanogénicas pelo hidrogénio, embora a afinidade destas últimas para com aquele gás seja muito maior.

A fermentação dos aminoácidos e a produção de metano são dois processos que estão intimamente relacionados. As substâncias inibidoras da metanogénese diminuem também a produção de amoníaco e de ácidos gordos ramificados resultantes da degradação dos prótidos (JOUANY *et al.* 1995). EL-SHAZLY (1952), citado por JOUANY *et al.* (1995), ao estudar a degradação *in vitro* da prolina e da alanina, verificou que a degradação anaeróbia de

aminoácidos podia ocorrer através de reacções de Stickland (degradação associada de aminoácidos oxidados e de aminoácidos reduzidos com troca de electrões). Embora este tipo de reacções tenha sido detectado em diferentes microrganismos (KENKLIES *et al.*, 1999; MOUNE *et al.*, 1999; ANDREESEN, 1994, CHEN e RUSSELL, 1988), JOUANY *et al.* (1995), referem que este fenómeno ainda não foi claramente observado *in vivo* com a população microbiana do rúmen.

Os aminoácidos são, sobretudo, assimilados pela população microbiana do rúmen, sob a forma de dipéptidos ou tripéptidos existindo no suco ruminal, na forma de aminoácidos livres, em muito pequena quantidade. A capacidade para utilizar um determinado aminoácido varia segundo a espécie bacteriana.

Até há pouco tempo a espécie *Prevotella ruminicola* parecia ser a principal bactéria produtora de amoníaco. Outras espécies importantes seriam *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* e algumas estirpes de *Butyrivibrio*. Mais bactérias foram entretanto isoladas e, segundo alguns autores (CHEN e RUSSELL, 1991; CHEN e RUSSELL, 1989; CHEN e RUSSELL, 1988), algumas bactérias Gram+ sensíveis aos antibióticos ionóforos, são as responsáveis pela maior parte do amoníaco produzido no rúmen. Os resultados indicam que a utilização do monensina tem um efeito mínimo na degradação da proteína alimentar causando, no entanto, um acentuado decréscimo na produção de amoníaco. Por causa do antibiótico ionóforo, uma grande quantidade de péptidos não é degradada pela população microbiana do rúmen, o que vai permitir aumentar a quantidade de péptidos alimentares que passam para os compartimentos posteriores do aparelho digestivo.

Os protozoários, que utilizam maioritariamente a população bacteriana como fonte de proteína, parecem ser um factor estabilizador dos produtos finais da fermentação. Muitas espécies possuem proteases intracelulares tendo uma actividade específica de desaminação muito intensa. A actividade específica da proteinase bacteriana é seis a dez vezes superior à dos protozoários (BROCK *et al.*, 1982). No entanto, alguns autores constataram que os protozoários tinham uma actividade específica de produção de amoníaco pelo menos três vezes superior às bactérias ruminais (RUSSEL e HINO, 1985) e que uma significativa degradação dos péptidos resultava da acção dos protozoários ciliados (WALLACE *et al.*, 1997).

Em *Isotricha* spp., o perfil da protease é bastante diferente do perfil da protease de *Dasytricha ruminantium* e os protozoários de outros quatro géneros têm também diferentes padrões de proteases. A protease de *Entodinium* spp parece ter a maior actividade (COLEMAN, 1983 citado por WALLACE, 1991). No entanto, JOUANY *et al.* (1992), demonstraram que a presença no rúmen de um só protozoário ciliado, *Isotricha* spp, provocava uma diminuição significativa na produção de amoníaco a partir de proteínas insolúveis.

Logo que a produção de amoníaco ultrapassa a sua capacidade de utilização pelos microrganismos do rúmen, este composto azotado é absorvido para o sangue através da parede ruminal e, depois de metabolizado em ureia no fígado, é excretado ou é reciclado parcialmente, voltando a entrar no rúmen.

O processo de utilização da proteína alimentar pelo ruminante implica uma diminuição de eficácia na utilização do azoto proteico ingerido.

Os outros produtos de fermentação dos aminoácidos são os ácidos gordos, em particular ácidos gordos ramificados. A sua presença no suco ruminal favorece o crescimento bacteriano uma vez que são utilizados como precursores na síntese da leucina, da isoleucina e da valina (JOUANY *et al.*, 1995).

5.2 – DEGRADAÇÃO DE OUTROS COMPOSTOS AZOTADOS

5.2.1 – ÁCIDOS NUCLEICOS

Segundo SMITH e MCALLEN (1970) citados por JOUANY *et al.* (1995), os ácidos nucleicos dos alimentos destinados aos ruminantes representam entre 5 e 10% do azoto total ingerido. Estas macromoléculas provêm também de fragmentos de células resultantes da descamação da parede interna do rúmen e de microrganismos que sofreram lise celular. Os ácidos nucleicos são rapidamente transformados no rúmen em nucleótidos, nucleósidos e bases. Os ácidos ribonucleicos (RNA), ou os seus nucleósidos constituintes, e a ribose podem ser utilizados pelas bactérias como fonte de energia ou de azoto, como

acontece com certas estirpes de *Selenomonas ruminantium* (JOUANY *et al.*, 1995).

Os protozoários ciliados fixam uma parte dos ácidos nucleicos bacterianos aos seus próprios ácidos nucleicos. As espécies *Entodinium caudatum*, *Entodinium magii* e *Polyplastron multivesiculatum* podem metabolizar os ácidos bacterianos transformando, por exemplo, a adenina e a guanina em xantina e hipoxantina (WILLIAMS e COLEMAN, 1991).

5.2.2 – AZOTO NÃO PROTEICO

Como já foi referido, a ureia endógena sintetizada no fígado a partir do amoníaco formado no rúmen, é parcialmente reciclada para o rúmen pela saliva ou por difusão através da parede ruminal. A ureia que retorna ao rúmen via saliva está dependente da concentração de ureia no plasma e da taxa de secreção de saliva. A quantidade de ureia que retorna ao rúmen através da parede ruminal é influenciada pela composição da dieta, particularmente pela relação proteína/energia alimentar, variando em função da concentração de amoníaco e da tensão do dióxido de carbono existente no rúmen (RÉMOND *et al.*, 1996; RÉMOND *et al.*, 1993a; RÉMOND *et al.*, 1993b). Em regimes alimentares pobres em azoto, a reciclagem da ureia é considerada essencial para o bom funcionamento do rúmen. A ureia pode, igualmente, ser adicionada aos alimentos como fonte de azoto não proteico, uma vez que constitui um suplemento eficaz e pouco dispendioso.

As principais espécies bacterianas ureolíticas são *Selenomonas* spp., *Succinivibrios dextrinosolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio* spp e *Treponema* spp. (CHURCH, 1988). As ureases de origem microbiana hidrolisam muito rapidamente a ureia em carbamato de amónia que se transforma, em amoníaco e em di-hidrogenocarbonato. As enzimas implicadas neste processo provêm principalmente de bactérias anaeróbias facultativas, fixadas sobre o epitélio do rúmen (JOUANY *et al.*, 1995). De acordo com os mesmos autores, a existência de actividade ureásica no conteúdo do rúmen resulta da presença de fragmentos de descamação do epitélio ruminal,

ainda colonizado por estas populações bacterianas. Referem também que os factores de regulação da actividade das ureases no rúmen não são ainda bem conhecidos, pelo que a manutenção destas reacções químicas deverá ser considerada no futuro.

Em relação à utilização dos nitratos pela população microbiana do rúmen JOUANY *et al.* (1995), referem que aqueles compostos são reduzidos a nitritos e depois a amoníaco. Quando são abundantes no regime alimentar, os nitritos podem-se acumular no conteúdo do rúmen, passar para o sangue e atingir concentrações tóxicas para o ruminante.

5.3 – SÍNTESE DOS CONSTITUINTES MICROBIANOS AZOTADOS

Apenas uma pequena fracção dos aminoácidos provenientes da proteólise é directamente incorporada na proteína microbiana. A maior parte dos aminoácidos é sintetizada a partir do amoníaco e das cadeias carbonatadas, provenientes da fermentação dos alimentos ingeridos.

O crescimento das bactérias celulolíticas depende da actividade de espécies bacterianas proteolíticas, para que sejam cobertas as suas necessidades em amoníaco e em esqueletos carbonatados. Existem numerosas interdependências nutricionais que regulam o funcionamento do ecossistema ruminal.

O amoníaco atravessa a membrana citoplásmica, por difusão passiva, quando se encontra na fase lipossolúvel, e por transporte activo, quando está na forma ionizada. A última situação é de longe a mais frequente, aos níveis fisiológicos do pH ruminal. Depois, é incorporado nos ácidos aminados segundo as diversas vias enzimáticas que diferem pela sua afinidade para com o amoníaco e pelo seu consumo de ATP.

Como se pode ver na Figura 5.2, a via da glutamina sintetase - glutamato sintetase começa pela formação de glutamina a partir do glutamato, com a hidrólise de ATP, sendo o grupo ainda transferido para uma molécula de 2-oxo-glutarato, formando-se duas moléculas de glutamato. A glutamina sintetase e a glutamato sintetase (1,8 mM), têm grande afinidade

pelo amoníaco mas, como esta via consome ATP, ela só é vantajosa quando as concentrações de amoníaco no rúmen são baixas (JOUANY *et al.*, 1995). Em concentrações normais, a via mais frequente, a glutamato desidrogenase acoplada ao NAD^+ ou ao NADP^+ , torna-se activa. Por exemplo, a alanina desidrogenase (70mM) exige concentrações de amoníaco elevadas.

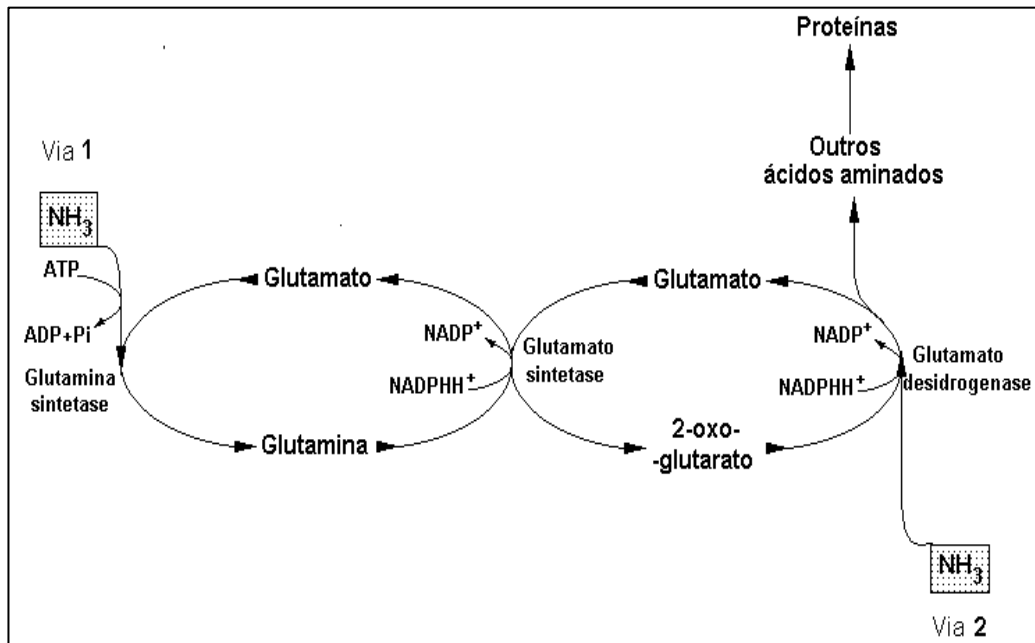


Figura 5.2 -. Esquema representando a síntese de alguns aminoácidos por bactérias anaeróbicas do rúmen que utilizam o amoníaco (NH_3) em baixas concentrações (Via 1) e em elevadas concentrações (Via 2) (adaptada de LENG e NOLAN, 1984).

Os microrganismos presentes no rúmen capazes de utilizar o amoníaco compreendem uma série de espécies de bactérias, de protozoários e de fungos. Alguns desses fungos não são funcionais e a sua existência no rúmen resulta da presença casual nos alimentos. Segundo WALLACE e JOBLIN (1985), o fungo *Neocallimastix frontalis* também é capaz de utilizar o amoníaco para a síntese proteica.

5.4 – EFICIÊNCIA MICROBIANA E CRESCIMENTO

5.4.1 – Y_{GLUCOSE}

Nos ruminantes, durante a fermentação anaeróbia que ocorre no rúmen, verifica-se uma conversão do substrato em células microbianas e produtos químicos. Na realidade, a fermentação da matéria orgânica conduz à produção de ácidos gordos voláteis, de gás, de calor e de ATP cuja quantidade vai depender da natureza das vias metabólicas utilizadas durante a fermentação do substrato (JOUANY *et al.*, 1995).

A eficiência microbiana, que é definida como a proporção de energia do substrato que é utilizada pelos microrganismos do rúmen, está inversamente correlacionada com a produção de ácidos gordos voláteis. No entanto, a eficiência microbiana não está necessariamente relacionada com a eficiência do animal hospedeiro, desde que os ácidos gordos voláteis, resultantes da fermentação, fiquem disponíveis para serem utilizados. O crescimento microbiano determina a quantidade de proteína microbiana que fica disponível para o animal hospedeiro. A proteína metabolizável, aquela que chega ao abomaso do ruminante, corresponde à soma da proteína microbiana digestível e da proteína alimentar que escapa à degradação ruminal (VAN SOEST, 1994). A produção microbiana é calculada em gramas de células por mole de glucose ou por 100 g de alimento fermentado. Este pode ser convertido, por cálculo, numa estimativa de unidades de glucose (WOLIN, 1960 citado por VAN SOEST, 1994). A quantidade de matéria seca de células bacterianas produzidas por mole de glucose é designada por Y_{glucose} (VAN SOEST, 1994).

Quando as bactérias do rúmen são comparadas com outras bactérias capazes de fermentar anaerobiamente os açúcares, o crescimento da população bacteriana do rúmen parece ser anormalmente elevado. Por exemplo, a *Escherichia coli* tem um Y_{glucose} anaeróbico de 26 g.mole⁻¹ (STOUTHAMER, 1979) e um Y_{glucose} aeróbico de 83 g.mole⁻¹ (SHILOACH e BAUER, 1975). No entanto, RUSSELL e WALLACE (1997) ao analisarem os resultados obtidos por vários autores para culturas puras de diferentes populações de bactérias, verificaram que o Y_{glucose} apresenta grandes variações. Assim,

quando a glucose foi a fonte energética utilizada, a bactéria *Selenomonas ruminantium* apresentou um Y_{glucose} mínimo de 29 g.mole^{-1} (DAWSON *et al.*, 1979) e um máximo de 100 g.mole^{-1} (RUSSEL e BALDWIN, 1979) (Quadro 5.2). Tendo em conta a produção microbiana observada em culturas puras de bactérias do rúmen, os mesmos autores concluíram que o Y_{glucose} pode ser igual ou mesmo superior às produções observadas em organismos aeróbios.

RUSSELL e WALLACE (1997), verificaram ainda que a média de produção bacteriana de culturas puras foi de 57 g.mole^{-1} de glucose, tendo concluído que a síntese de ATP não podia resultar apenas de reacções que ocorressem no citoplasma das bactérias. Por outro lado, culturas mistas *in vitro* de bactérias do rúmen originam produções microbianas próximo do limite superior da variação encontrada para culturas puras, mesmo que as condições de crescimento não sejam as mais favoráveis e mesmo que algumas das bactérias sejam fagocitadas pelos protozoários existentes (CZERKAWSKI, 1978).

Quadro 5.2 - Produção de massa microbiana (g.mole^{-1}), obtida a partir de diferentes microrganismos, quando se utilizou a glucose como fonte energética.

Microrganismo	Y_{glucose}	Y_{ATP}	Referência
<i>Prevotella ruminicola</i>	88	15	(a)
	82	21	(b)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	64	15	(a)
	42	-	(c)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	62	15	(a)
	72	-	(b)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	73	-	(b)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	29	13	(d)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	29	14	(a)
	100	25	(b)
	30	10	(c)
<i>Streptococcus bovis</i>	57	-	(b)
	25	13	(c)

(a) DAWSON *et al.*, 1979; (b) RUSSELL e BALDWIN, 1979; (c) MAROUNEK e WALLACE, 1984 e (d) HOPGOOD e WALKER, 1967 citados por RUSSELL e WALLACE, 1997

Segundo DAWSON *et al.* (1979), à semelhança do que acontece com as bactérias aeróbicas, as espécies bacterianas anaeróbicas do rúmen com

elevado Y_{glucose} também possuem transportadores de electrões localizados no interior da membrana mitocondrial. Os mesmos autores referem que, nestes casos, a produção de massa bacteriana é diminuída por acção de substâncias inibidoras de transportadores de electrões, o que não acontece com bactérias com menor Y_{glucose} .

Muitas espécies bacterianas produtoras de propionato e succinato, possuem transportadores de electrões, mas o mecanismo de transferência de energia não é ainda totalmente conhecido. No entanto, nunca foi demonstrada a existência de qualquer ATPase nas bactérias do rúmen, capaz de converter o ADP em ATP, como resposta ao fluxo intermembranário de prótons na mitocôndria (RUSSELL e WALLACE, 1997).

5.4.2 - Y_{ATP}

Como já foi dito, os alimentos fermentescíveis podem ser convertidos em unidades de glucose. No entanto, a produção microbiana por unidade de glucose está dividida em duas componentes: a produção de ATP e o Y_{ATP} . A produção de ATP corresponde ao número de moles de ATP formadas a partir da fermentação de uma mole de glucose. O Y_{ATP} corresponde aos gramas de matéria seca de células microbianas formados a partir de uma mole de ATP (VAN SOEST, 1994).

Quando MONOD (1942) citado por RUSSELL e COOK (1995), estudou o crescimento de algumas culturas bacterianas verificou que o peso da matéria seca dos microrganismos obtidos era directamente proporcional à quantidade da fonte energética adicionada. No entanto não fez nenhuma estimativa da produção de ATP a partir da fermentação dos hidratos de carbono.

Outros autores (DE MOSS *et al.*, 1951 citados por RUSSEL e COOK, 1995) constataram que culturas de determinadas bactérias, utilizando a glucose como substrato, produziam mais biomassa do que outras, mostrando que as bactérias utilizavam diferentes processos de fermentação e produziam diferente quantidade de ATP por molécula de glucose.

BAUCHOP e ELSDEN (1960) citados por RUSSEL e WALLACE, (1997), estudaram o crescimento de várias bactérias anaeróbias e correlacionaram a biomassa produzida com o ATP disponível (Y_{ATP}). Obtiveram um valor médio de 10,5 g matéria seca de células microbianas por mole de ATP com uma variação de 8,3 a 12,6 g.mole⁻¹ de ATP.

Segundo RUSSELL e WALLACE (1997), o valor de 10,5 g para o Y_{ATP} foi considerado, durante algum tempo, como uma constante biológica e foi muitas vezes utilizado como método para estimar a produção de ATP de um processo catabólico.

Posteriormente, a noção de um Y_{ATP} constante começou a ser questionada tendo STOUTHAMER (1979) calculado, a partir da composição celular típica da *Escherichia coli*, o valor de 32 g de biomassa celular por mole de ATP (Quadro 5.3) ao ser utilizada a glucose como substrato.

Quadro 5.3 - Cálculo das necessidades de ATP para a formação de biomassa bacteriana (*Escherichia coli*), utilizando como substrato a glucose (adaptado de STOUTHAMER, 1979).

Macromolécula	% Matéria Seca	Necessidade de ATP (mmole.g ⁻¹ macromolécula)	
		Com amino-ácidos	Sem amino-ácidos
Proteína	52,2		
Formação a. a.		0,0	1,4
Polimerização		19,0	19,0
Polissacarídeos	16,6		
Formação G-6P		1,0	1,0
Polimerização		1,0	1,0
RNA	15,7	1,5	
Formação nucleósido		0,9	1,5
Polimerização			0,9
DNA	3,2		
Formação nucleósido		0,4	0,4
Polimerização		0,2	0,4
Lípidos	9,4	0,1	0,1
Outras	2,9		
turnover do mRNA		1,4	1,4
transporte ião amónia		0,0	4,2
transporte a. a.		4,8	0,0
transporte potássio		0,2	0,2
transporte fosfato		0,8	0,8
Total	100,0	31,3	32,3
Y_{ATP} (g células.mole ATP ⁻¹)		31	32

No entanto, o Y_{ATP} determinado para culturas bacterianas é normalmente muito menor do que o valor teórico esperado (32 g.mole⁻¹ de ATP). No Quadro 5.2 pode ver-se que, para as diferentes espécies bacterianas analisadas, o Y_{ATP} apresentou um valor mínimo de 10 g (MAROUNEK e WALLACE, 1984 citados por RUSSELL e WALLACE, 1997) e um valor máximo de 25 g (RUSSELL e BALDWIN, 1979), em ambos os casos para culturas de *Selenomonas ruminantium*. Esta discrepância ocorre com quase todas as bactérias, sugerindo que os cálculos de STOUTHAMER (1979), subestimaram a quantidade de ATP destinado à energização da membrana mitocondrial ou a ciclos metabólicos inúteis. No entanto parece ser menor nas bactérias do rúmen, para as quais os valores de Y_{ATP} determinados experimentalmente, se aproximam muito dos valores teóricos (HESPELL e BRYANT, 1979 citados por RUSSELL e WALLACE, 1997).

Parte da variação nos valores do ATP pode explicar-se pela composição celular. As bactérias do rúmen têm grandes reservas de polissacarídeos. Estes necessitam, para a sua síntese, de apenas 1/3 das despesas ATP necessárias para a síntese de proteína e ácidos nucleicos (CZERKAWSKI, 1978). As células contendo 40% de polissacarídeos (excesso de energia) terão um Y_{ATP} que é aproximadamente 1/3 maior do que as células sem reservas de hidratos de carbono (RUSSELL e WALLACE, 1997).

O conceito de Y_{ATP} pressupõe que toda a energia resultante do catabolismo dos alimentos pode ser utilizada para crescimento. No entanto, as bactérias também despendem energia em funções que não estão directamente relacionadas com o crescimento. Os microrganismos do rúmen utilizam o ATP produzido no decurso das fermentações ruminais para cobrir as suas necessidades energéticas de manutenção e para assegurar o seu crescimento (Figura 5.3). No entanto, nem sempre maior produção de ATP corresponde a maior crescimento bacteriano (RUSSELL, 1986). A estimativa directa da energia para manutenção foi muitas vezes confundida pelo facto de, até há pouco tempo, não existirem equipamentos suficientemente sensíveis para medirem taxas de catabolismo muito baixas.

Segundo RUSSELL e COOK, (1995), as populações bacterianas podem utilizar fontes energéticas com completa ausência de crescimento, encontrando-se correlações muito baixas entre o ATP produzido e a biomassa bacteriana formada. Algumas das variações encontradas na eficiência do crescimento bacteriano podem ser explicadas pelas despesas energéticas para manutenção, mas as bactérias apresentam também outros mecanismos de não crescimento e de dissipação de energia.

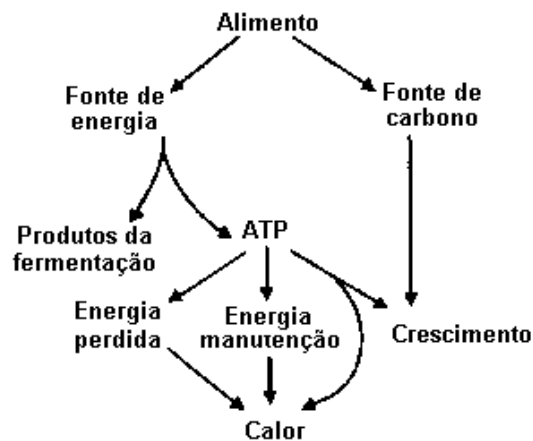


Figura 5.3 – Representação esquemática da partição dos produtos resultantes da fermentação dos alimentos pelo microrganismos do rúmen (adaptada de RUSSELL e WALLACE, 1997).

Os resultados referidos no Quadro 5.3 ilustram três aspectos importantes. Em primeiro lugar as reacções de polimerização, com destaque para as reacções de polimerização associadas à síntese proteica inerentes à produção de biomassa microbiana, são claramente as etapas mais exigentes em termos de ATP. Em segundo lugar a biossíntese de monómeros (amino ácidos, nucleótidos) utiliza apenas uma pequena fracção do ATP disponível. Em terceiro lugar o transporte de fontes de carbono e de osmólitos, exigem menos de $\frac{1}{4}$ das necessidades totais de ATP.

Como a síntese de poliósidos necessita de cerca de 30% menos energia do que a síntese de proteínas ou de ácidos nucleicos, poder-se-á considerar que as células microbianas que sintetizam abundantes glúcidos de reserva têm um rendimento mais elevado (JOUANY *et al.*, 1995). Com este pressuposto, os protozoários constituirão microrganismos de elevada eficiência de síntese.

A glicólise, constitui a principal fonte de ATP para os microrganismos do rúmen havendo um ganho global teórico de dois ATP por mole de glucose fermentada em duas moles de piruvato. BERGEN e YOKOYAMA (1977) referem que a síntese de uma mole de acetato, a partir do piruvato, produz 2 ATP e a síntese de uma mole de propionato, via succinato, produz 3 ATP. A formação de uma mole de butirato pode produzir até 3 moles de ATP e a formação de uma mole de metano produz 1 ATP. Os mesmos autores referem que, em culturas mistas de microrganismos do rúmen que produzem metano, obtêm-se quatro moles de ATP a partir de uma mole de glucose. No entanto, aquele valor está dependente dos produtos formados e da relação entre espécies microbianas.

Em meio aeróbio, a oxidação completa da glucose acontece de forma muito mais eficiente produzindo 38 ATP por mole de hexose ocorrendo em três fases distintas, a glicólise (2 ATP), o Ciclo de Krebs (2 ATP) e a cadeia de oxidação-redução (cadeia respiratória de transporte de electrões) (34 ATP) (BROCK e MADIGAN, 1991).

O coeficiente de manutenção de uma mistura de bactérias do rúmen foi estimado em 0,26 mmoles de glucose por grama de matéria seca bacteriana por hora, valor que é inferior ao coeficiente de manutenção de 0,39 mmoles de glucose por grama de matéria seca bacteriana por hora determinado em *Escherichia coli* (ISAACSON *et al.*, 1975 citados por RUSSELL e WALLACE, 1997). Em culturas puras de outras bactérias tem-se encontrado, em termos gerais, um coeficiente de manutenção idêntico, ainda que as variações nos produtos resultantes da fermentação tornem a estimativa difícil de ser feita. No entanto, em *Ruminobacter amylophilus* determinou-se um coeficiente de manutenção excepcionalmente elevado (10 vezes superior), o que poderá ser consequência da fragilidade da sua parede celular e consequente destruição a baixas taxas de crescimento (JENKINSON e WOODBINE, 1979). Com uma baixa diluição do licor de rúmen ($0,06 \text{ h}^{-1}$), diluição que está dentro da gama de valores encontrados *in vivo*, cerca de 32% da energia produzida pelas bactérias é utilizada para manutenção (HARRISON e McALLAN, 1980). Estudos *in vivo* suportam a ideia de que a manutenção pode ter um efeito acentuado na produção e eficiência microbiana. KENNEDY e MILLIGAN (1978) ao sujeitarem

ovinos a condições de *stress* térmico (temperaturas muito baixas) verificaram que a taxa de diluição efectiva no rúmen aumentou de $0,068 \text{ h}^{-1}$ para $0,115 \text{ h}^{-1}$, e esta alteração foi acompanhada pelo aumento do Y_{ATP} em 19%. As bactérias capazes de degradar hidratos de carbono estruturais e aquelas que só fermentam os hidratos de carbono não estruturais, têm um máximo teórico de crescimento bacteriano de 40 g de células por 100 g de hidrato de carbono fermentado. No entanto, os coeficientes de manutenção são respectivamente 0,05 e 0,150 g de hidratos de carbono por gramas de células produzidas por hora (RUSSELL e WALLACE, 1997).

Nos protozoários, menos de metade da energia produzida é utilizada para crescimento.

Em regimes alimentares desequilibrados, com excesso de energia e falta de azoto, de enxofre ou de fósforo, as bactérias do rúmen consomem rapidamente a energia disponível, ainda que a síntese da biomassa bacteriana seja fraca. Este fenómeno traduz-se em importante produção de ácidos gordos voláteis, sem crescimento microbiano. Segundo JOUANY *et al.* (1995), o desperdício energético daqui resultante está associado à existência de reacções parasitas que produzem calor e à actividade de ciclos metabólicos ditos desnecessários de tal forma que uma parte da energia produzida poderia ser mesmo utilizada para hidrolisar o ATP formado.

Em certos casos, a baixa produção de ATP pode ser compensada por uma maior eficácia da sua utilização. No caso de regimes alimentares ricos em glúcidos facilmente fermentescíveis, as bactérias que produzem lactato suplantam as que produzem acetato, ainda que a formação do lactato origine menos ATP do que a do acetato. Graças à elevada velocidade de crescimento, as bactérias lácticas podem produzir mais ATP por unidade de tempo e entrar em competição pela utilização do substrato com as bactérias produtoras de acetato. A diminuição do pH após a produção do lactato amplia este efeito de competição, em detrimento das bactérias produtoras de acetato (JOUANY *et al.*, 1995).

Como já foi referido, o conceito Y_{ATP} admite que toda a energia resultante do catabolismo dos alimentos é utilizada para o crescimento. No

entanto, as bactérias também gastam energia em funções que não estão directamente relacionadas com o crescimento.

Segundo MARR *et al.* (1962) citados por RUSSELL e COOK (1995), a energia gasta pelas bactérias para manutenção pode ser descrita como um valor correspondente a um crescimento negativo constante (a), e o total do substrato utilizado para o crescimento (q) pode ser fraccionado em verdadeiro crescimento (μx) e crescimento negativo (ax). Neste caso x corresponde à matéria seca celular resultante do crescimento bacteriano. Partindo deste pressuposto, o crescimento negativo causa um decréscimo na taxa de crescimento máximo teórico de um microrganismo, e o crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$) pode ser considerado como a taxa de crescimento que pode ser obtida se não houvesse energia gasta para a manutenção, obtendo-se uma produção de biomassa celular máxima ($x_{\text{máx}}$).

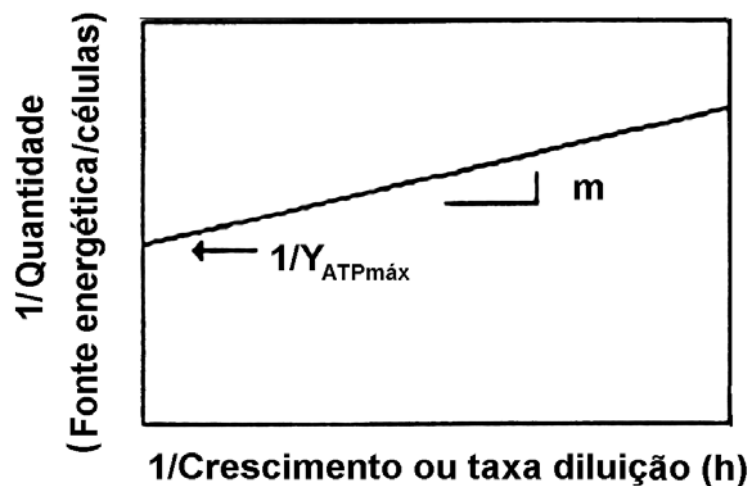


Figura 5.4 - Efeito do coeficiente de manutenção (m) na produção de biomassa bacteriana num meio com limitações energéticas (equação de PIRT, 1965 citado por RUSSELL e WALLACE, 1997). O $Y_{\text{ATPmáx}}$ define-se como o crescimento bacteriano máximo teórico.

No entanto PIRT (1965) citado por RUSSELL e WALLACE (1997), considerou que o conceito de crescimento negativo seria artificial e indirecto, pelo que deveria ser substituído por um coeficiente (m) que representasse a quantidade de energia necessária para a manutenção das células microbianas num determinado período de tempo (energia/células/tempo). Deste modo, a energia necessária para a manutenção não teria um efeito directo na taxa de

crescimento mas a produção total de biomassa bacteriana diminuiria. Considerando que o Y_{ATP} corresponde à produção de biomassa (gramas de matéria seca microbiana sintetizada por mole de ATP), e o $Y_{ATPm\acute{a}x}$ é a produção máxima teórica (Y_{ATP} se não houver despesas energéticas para manutenção), a utilização total de energia para manutenção ($1/Y_{ATP}$) poderia ser fraccionada em energia para manutenção (m/μ) (μ corresponderia à taxa de crescimento microbiano) e energia para o crescimento ($1/Y_{ATPm\acute{a}x}$). Obter-se-ia a seguinte equação

$$1/Y_{ATP} = 1 / Y_{ATPm\acute{a}x} + m / \mu$$

De referir que o coeficiente (a) de MARR *et al.* (1962) citados por RUSSELL e COOK (1995) e o coeficiente (m) de PIRT (1965) citado por RUSSELL e WALLACE (1997), estão relacionados por $m = a / Y_{ATPm\acute{a}x}$.

TEMPEST e NEIJSEL (1978), fizeram um rearranjo algébrico na equação anterior considerando que a taxa específica de utilização do substrato (q) e a taxa de crescimento (μ) tinham sido utilizadas para estimar a manutenção (m). Considerando que a taxa específica de consumo da fonte de energia é $q = (1 / Y_{ATP}) / \mu$ ou então $1 / Y_{ATP} = q / \mu$ a equação anterior seria modificada para

$$q = \mu / Y_{ATPm\acute{a}x} + m$$

Nas equações apresentadas utilizou-se o termo $Y_{ATPm\acute{a}x}$ introduzido por STOUTHAMER e BETTENHAUSSEN (1973), tendo-se aceite que a energia para manutenção é uma função dependente do tempo que é proporcional à biomassa celular e independente da taxa de crescimento. Definem m como um coeficiente específico, mas o erro experimental resultante da aplicação das duas equações é parcialmente diferente. Na equação de PIRT (1965) citado por RUSSELL e WALLACE (1997), o erro verifica-se na inclinação da recta (Figura 5.4) enquanto que na equação de TEMPEST e NEIJSEL (1984), o erro verifica-se na intercepção da recta (Figura 5.5). Nesta equação, o ponto de intercepção da recta é normalmente mais baixo e os resultados obtidos parecem sempre

melhores. A linearidade das rectas baseia-se no pressuposto de que a produção de ATP por unidade de fonte energética fermentada se mantém constante, a composição celular permanece inalterada e a manutenção é uma função estritamente dependente da biomassa celular e do tempo.

Num meio contínuo de culturas bacterianas semelhante ao que acontece no rúmen, a taxa de crescimento microbiano (μ) é igual à taxa de diluição do local de fermentação (d) (JOUANY *et al.*, 1995). Ao aplicarmos a equação de PIRT (1965) citado por RUSSELL e WALLACE (1997), a este caso ($1/Y_{ATP} = 1/Y_{ATPm\acute{a}x} + m/d$) verificamos que, quando a taxa de diluição aumenta, a relação m/d torna-se negligenciável e o Y_{ATP} aproxima-se do valor de $Y_{ATPm\acute{a}x}$. Quando isto acontece, verifica-se que o ATP é essencialmente utilizado para o crescimento microbiano sendo máxima a eficácia da síntese microbiana (JOUANY *et al.*, 1995).

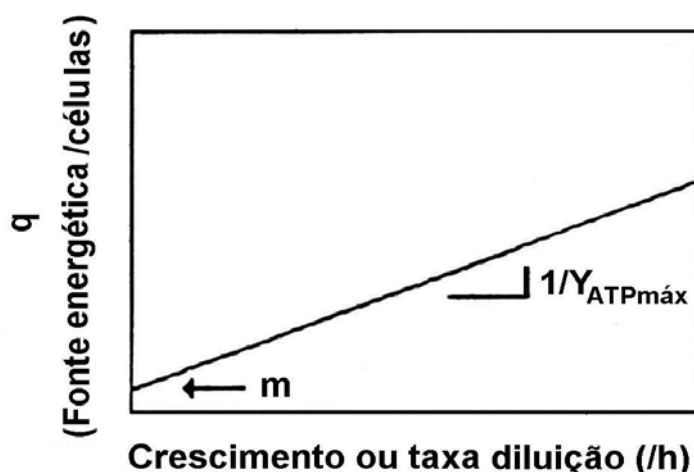


Figura 5.5 - Efeito do coeficiente de manutenção (m) na produção de biomassa bacteriana num meio com limitações energéticas (equação de TEMPEST e NEIJSEL, 1984). O $Y_{ATPm\acute{a}x}$ define-se como o crescimento bacteriano máximo teórico.

DEMEYER e VAN NEVEL (1975) demonstraram, em culturas *in vitro*, que o aumento da actividade fermentativa provocava um aumento da produção do ATP melhorando o Y_{ATP} quaisquer que fossem os ácidos gordos voláteis produzidos. A predação das bactérias pelos protozoários é outro factor que estimula a produção de biomassa bacteriana, mesmo que isso se traduza

numa diminuição da concentração de bactérias. As bactérias que sobrevivem têm uma taxa específica de crescimento mais elevada.

“The more we study the workings of dairy cow, the more efficiently we can exploit her capacity to produce milk and, eventually, meat, not only from grass and cereals but from an enormously wide range of plant products and by-products which we cannot, or choose not to, eat ourselves.”

J. Webster, 1993

Capítulo 6 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM UREIA E POLPA DE CITRINOS NA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTOS FIBROSOS

6.1 - INTRODUÇÃO

Tendo por base a homogeneidade nutricional, os glúcidos podem simplificarmente ser agrupados em estruturais e não estruturais. No sistema analítico das soluções detergentes (ROBERTSON e VAN SOEST, 1981), os hidratos de carbono estruturais estão associados à fracção do detergente neutro (NDF) que consiste em celulose, hemicelulose e lenhina. Neste sistema, a fracção solúvel em detergente inclui amido, açúcares, pectinas, galactanas, frutanas e outros glúcidos. Tendo em conta o impacte que a produção do ácido láctico tem no rúmen, VAN SOEST *et al.* (1991) subdividem esta última fracção em glúcidos cuja degradação promove (amido e açúcares) e não promove (pectinas, galactanas, β -glucanas) a produção de ácido láctico pela flora ruminal.

As pectinas são um grupo complexo de polissacarídeos heterogéneos, coloidais, muito ramificados e hidratados, onde a unidade de ácido D-galacturónico, seu principal constituinte, apresenta carga negativa

(COULTATE, 1996; COLL *et al.*, 1992; THEANDER *et al.*, 1989). As pectinas têm a particularidade de fixar cátions (Ca^{++}), apresentando consideráveis propriedades de gelificação (JARRIGE *et al.*, 1995), o que poderá dificultar a sua quantificação nos alimentos. VAN SOEST *et al.* (1991) propõem um método eficaz para a determinação da concentração de ácido galacturónico. Segundo TANIGUCHI *et al.* (1999) e BEM-GHEDALIA *et al.* (1989) a degradação ruminal das pectinas é muito elevada.

A polpa de citrinos e a polpa de beterraba são dois sub-produtos que contêm apreciável quantidade de pectinas. Constituem a principal fonte de hidratos de carbono e representam, na polpa de beterraba, cerca de 20% do total da energia bruta (CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996).

A polpa de citrinos é proveniente da produção de laranja, limão, lima e toranja e apresenta teores de gordura e proteína que aumentam com o conteúdo da polpa em semente. Valores de gordura total superiores a 2,2% indicam que a polpa tem grande quantidade de sementes (CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996).

Na formulação de regimes alimentares para animais criados em sistemas intensivos de produção, o grão dos cereais constitui, normalmente, o principal ingrediente fornecedor de amido (CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996; WEBSTER, 1993; WILSON e BRIGSTOCKE, 1981). No entanto, raramente ultrapassam 50% do total de matéria seca dos regimes alimentares elaborados para ruminantes. Em regimes alimentares para vacas leiteiras, e devido à importância que o amido tem na alimentação destes animais, a utilização dos cereais pode, por vezes, ser superior.

Na alimentação de ruminantes, os cereais podem ser substituídos por outras fontes de hidratos de carbono mais económicas, alimentos como a polpa de citrinos que, para além de ter pouco amido, contém grande quantidade de pectinas, glúcidos estruturais altamente digestíveis. Segundo ZEOULA *et al.* (1999), a percentagem de amido na polpa de citrinos é de apenas 8,4% enquanto que no milho, no sorgo e na mandioca é respectivamente de 79,3, 83,4 e 91,4%.

Também em sistemas extensivos de produção de ruminantes pode haver necessidade de utilizar, em certos momentos, alimentos menos dispendiosos

com capacidade para fornecer energia à população microbiana do rúmen afectando o menos possível o ecossistema ruminal. A utilização de polpa de citrinos associada a palhas e fenos tem como principal função disponibilizar rapidamente, para a população microbiana do rúmen, maior quantidade de glúcidos estruturais facilmente fermentescíveis que potenciem a degradação dos alimentos forrageiros. Vários trabalhos têm sido publicados referindo a utilização da polpa de citrinos como suplemento na alimentação de ovinos (BARRIOS URDANETA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1998; FONSECA, 1997; FEGEROS *et al.*, 1995; RIHANI *et al.*, 1993a; RIHANI *et al.*, 1993b), de bovinos (YAAKUB *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 1998; CASTRO e ZANETTI, 1998; HENRIQUE *et al.*, 1998; BELIBASAKIS e TSIRGOGIANNI, 1995) ou em ensaios laboratoriais com licor de rúmen (ROCHA FILHO *et al.*, 1999; TANIGUCHI *et al.*, 1999; HALL *et al.*, 1998).

Como os alimentos forrageiros utilizados são normalmente pobres em proteína bruta, a existência no rúmen de uma fonte de azoto não proteico facilmente hidrolisável como a ureia, associada à presença de glúcidos estruturais facilmente fermentescíveis, permite a utilização do NH₃ resultante para a síntese de proteína microbiana.

A suplementação proteica é um procedimento muito comum em sistemas de produção de ruminantes que utilizam forragens de fraca qualidade. Vários autores, trabalhando com bovinos, constataram que a suplementação crescente com uma fonte de proteína digestível no rúmen aumentava a ingestão de matéria orgânica a partir de forragens de fraca qualidade (KÖSTER *et al.*, 1996; SCOTT e HIBBERD, 1990), estando muitas vezes associada a um aumento da taxa de passagem e da taxa de digestão dos alimentos (MATHIS *et al.*, 2000; MCCOLLUM e HORN, 1990).

No entanto, a utilização de suplementos de azoto não proteico na alimentação de ruminantes é muitas vezes menos eficiente em termos metabólicos do que a utilização de fontes de azoto proteico. Parte da ineficiência da utilização do azoto não proteico, é atribuída ao excesso de amoníaco produzido que é absorvido pela parede do rúmen e, no fígado, é convertido em ureia que é depois excretada no leite e na urina do animal (CHALUPA, 1972 e BLOOMFIELD *et al.*, 1960 citados por RIHANI *et al.*, 1993b).

Os resultados obtidos com a suplementação proteica vão depender do tipo de animal, da forragem e das características do suplemento utilizado.

Um dos métodos *in vitro* que melhor retratam o processo fermentativo que ocorre no rectículo/rúmen é o método da produção de gás *in vitro* descrito por BEUVINK *et al.* (1992). O equipamento utilizado permite automatizar a medição da degradação dos alimentos forrageiros através da determinação da quantidade de gás produzido durante o período de incubação, numa mistura de licor do rúmen mais solução nutritiva tampão (RODRIGUES, 1999; CONE *et al.*, 1994; THEODOROU *et al.*, 1994; BEUVINK, 1993; PELL e SCHOFIELD, 1993; BEUVINK e SPOELSTRA, 1992).

Vários modelos matemáticos têm sido utilizados para traduzir, de forma evidente, a evolução da produção de gás (CONE *et al.*, 1997; GROOT *et al.*, 1996; SCHOFIELD *et al.*, 1994; FRANCE *et al.*, 1993; BEUVINK e KOGUT, 1993). O modelo a usar deve incluir parâmetros com significado biológico e deve ser de fácil aplicação.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a cinética da fermentação de dois alimentos forrageiros, feno de prado natural e palha de trigo, quando suplementados com polpa de citrinos e ureia, por forma a serem obtidos os níveis de 12 e 16% de proteína bruta.

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 – ALIMENTOS UTILIZADOS

Neste trabalho foram utilizados 2 alimentos forrageiros, feno de prado natural (F) e palha de trigo (Pa), sujeitos a 2 níveis de suplementação azotada (12 e 16% PB) e a uma suplementação energética. Como fonte energética utilizou-se uma polpa de citrinos desidratada (P) e, como fonte de azoto não proteico, a ureia (U).

As combinações de alimentos foram: feno+ureia+polpa de citrinos com 12% (FUP) e 16% (2FUP) de proteína bruta (PB); feno+ureia com 12% (FU) e 16% (2FU) de PB; palha+ureia+polpa de citrinos com 12% (PaUP) e 16%

(2PaUP) de PB; palha+ureia com 12% (PaU) e 16% (2PaU) de PB; ureia+polpa de citrinos com 12% (UP) e 16% (2UP) de PB.

Sempre que a polpa de citrinos foi adicionada ao alimento forrageiro utilizou-se uma quantidade que correspondeu a 40% do peso total da amostra.

A percentagem de forragem utilizada por amostra variou, para o feno de prado natural, entre 57,18% (2FUP), 58,49% (FUP), 97,33% (2FU), 98,67% (FU) e para a palha de trigo entre 56,58% (2PaUP), 57,89% (PaUP), 96,31% (2PaU) e 97,64% (PaU).

Embora o teor em PB dos substratos com suplemento azotado tenha variado entre 12 e 16%, a percentagem de ureia (% MS) utilizada como suplemento foi diferente em cada um deles. Quando se utilizou feno de prado natural como alimento forrageiro variou entre 3,07% (2FUP), 1,64% (FUP), 2,86% (2FU) e 1,43% (FU) e quando se utilizou a palha de trigo variou entre 3,70% (2PaUP), 2,28% (PaUP), 3,91% (2PaU) e 2,50% (PaU). Nos dois casos em que a polpa de citrinos foi utilizada só com o suplemento azotado, a percentagem de ureia variou entre 1,95% no UP e 3,37% no 2UP.

Para efeitos de cálculo, quando se aferiu a proteína dos substratos isoproteicos para 12% e 16% de PB, teve-se em conta, para a ureia, um teor de MS de 99% e uma quantidade de PB de 2875 g/kg MS (CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996).

6.2.2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS UTILIZADOS

Os alimentos foram caracterizados em termos de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra de detergente neutro (NDF), fibra de detergente ácido (ADF), lenhina de detergente ácido (ADL) e cinzas.

O teor em MS foi determinado após secagem em estufa a 105°C até a amostra apresentar um peso constante (AOAC, 1990). O teor em MO foi calculado com base no teor em MS e no teor em cinzas das amostras, que foi determinado por incineração da amostra a 500°C durante 3 horas. A PB (azoto total x 6,25), foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990). Os

constituintes da parede celular foram fraccionados pelo sistema das soluções detergentes (ROBERTSON e VAN SOEST, 1981).

6.2.3 - FONTE DE INÓCULO DE RÚMEN

Foi utilizado inóculo de rúmen proveniente de três vacas de raças diferentes com fístulas ruminais ($\varnothing=80$ mm). Os bovinos foram colocados em compartimentos individuais, num pavilhão utilizado para alojamento de vacas dadoras de licor de rúmen.

O regime alimentar, composto por feno de prado natural e bagaço de soja, de forma a satisfazer as necessidades de conservação (AFRC, 1993), foi distribuído duas vezes por dia às 08:00 e às 20:00 horas.

A recolha do inóculo de rúmen, para uma garrafa térmica, foi feita sempre duas horas após a primeira refeição diária, procedendo-se à mistura dos inóculos provenientes dos três animais. Já no laboratório, a mistura foi filtrada em duas camadas de gaze antes de ser utilizada nos ensaios de cinética de fermentação *in vitro*.

6.2.4 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO

A cinética de fermentação foi determinada utilizando o método de produção de gás descrito por BEUVINK (1993) e CONE *et al.* (1997). A produção de gás das amostras incubadas foi medida durante 96 horas. Para o efeito, utilizou-se um equipamento de registo automático do número de aberturas de válvulas em cada intervalo de 20 minutos. A produção de gás foi determinada directamente pelo número de abertura de válvulas previamente calibradas com ensaios de incubação de amido de arroz.

As amostras foram incubadas em vasos de fermentação previamente saturados com CO₂, aos quais se adicionou inóculo de rúmen e uma solução nutritiva tampão (CONE *et al.*, 1994) saturada de CO₂, obtida a partir da mistura de 300 ml de água destilada, 150 ml de solução A, 150 ml de solução B, 50 µl

de solução mineral e 0,7 ml de solução redox, agitando a mistura a 40°C com CO₂. Para obter a solução A dissolveu-se em um litro de água destilada 7,15 g de Na₂HPO₄*2H₂O, 6,20 g de KH₂PO₄, 0,60 g de MgSO₄*7H₂O. Para obter a solução B dissolveu-se em um litro de água destilada 39,0 g NaHCO₃ e 4,0 g (NH₄)HCO₃. Para obter a solução mineral dissolveu-se em 100 ml de água destilada 12,2 g de CaCl₂*2H₂O, 10,0 g MnCl₂*4H₂O, 1,0 g CoCl₂*6H₂O e 8,0 g FeCl₃*6H₂O. A solução redox foi preparada dissolvendo 150 mg de resazurina em 100 ml de água destilada.

A fermentação decorreu em vasos de 250 ml, previamente saturados de CO₂ e aquecidos em banho-maria a 39°C, onde foram colocadas amostras de 0,450 g de cada alimento e 60 ml de inóculo do rúmen e solução nutritiva tampão. Após aquela operação as garrafas foram fechadas com rolhas de borracha.

Para cada alimento foram feitas quatro repetições em quatro ensaios realizados em dias diferentes. Em cada ensaio, a primeira e a última garrafas foram destinadas ao branco (inóculo de rúmen sem amostra de alimento). A produção de gás foi expressa em ml gás por g matéria orgânica.

6.2.5 - MODELO MATEMÁTICO

Para descrever a cinética de fermentação *in vitro* foi utilizado o modelo logístico de duas fases, considerando-se o tempo de latência idêntico para cada uma das fases (SCHOFIELD *et al.*, 1994). Este modelo assume que a taxa de crescimento microbiano é proporcional tanto à massa celular existente como à quantidade de substrato digestível e a quantidade de gás produzido é proporcional à quantidade de substrato digerido. Permite a descrição de uma fase inicial da curva de produção de gás, em que ocorre a fermentação do material facilmente fermentescível, e de uma segunda fase fermentativa, em que ocorre a fermentação dos constituintes da parede celular mais dificilmente fermentescíveis. Segundo RODRIGUES (1999), no caso das celuloses, esta diferença pode corresponder à fermentação das zonas caracterizadas por um maior grau de cristalinidade.

Utilizou-se o modelo

$$V = V_{FA} \{1 + \exp[2 + 4\mu_{mA} / V_{FA}(\lambda - t)]\}^{-1} + V_{FB} \{1 + \exp[2 + 4\mu_{mB} / V_{FB}(\lambda - t)]\}^{-1}$$

Em que:

V – volume de gás produzido ao fim do tempo t (ml.gMO⁻¹);

V_{FA} - volume de gás produzido na primeira fase (ml.gMO⁻¹);

μ_{mA} - taxa máxima de produção de gás da primeira fase (ml.gMO⁻¹.h⁻¹);

V_{FB} - volume de gás produzido na segunda fase (ml.gMO⁻¹);

μ_{mB} - taxa máxima de produção de gás da segunda fase (ml.gMO⁻¹.h⁻¹);

λ – tempo de latência (h);

t – tempo (h)

μ_{mA} / V_{FA} - taxa específica de digestão da primeira fase (h⁻¹);

μ_{mB} / V_{FB} - taxa específica de digestão da segunda fase (h⁻¹).

Para o tratamento matemático do modelo recorreu-se à análise não linear utilizando o programa informático SYSTAT para Windows (WILKINSON *et al.*, 1992).

6.2.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros, após a aplicação do modelo logístico de duas fases, foram sujeitos a uma análise simples de variância (STEEL e TORRIE, 1980). Sempre que ocorreram diferenças significativas entre tratamentos utilizou-se o teste de Tukey como teste de comparações múltiplas.

As diferentes relações entre os resultados obtidos foram avaliadas por análise aos coeficientes de correlação através do método de Pearson por regressão linear simples (STEEL e TORRIE, 1980).

Para o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o programa informático SYSTAT para Windows (WILKINSON *et al.*, 1992).

6.3 - RESULTADOS

6.3.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS UTILIZADOS

No Quadro 6.1 apresenta-se a composição química dos alimentos forrageiros utilizados neste trabalho, feno de prado natural e palha de trigo.

Como seria de esperar, os teores em NDF, ADF e ADL da palha de trigo são muito superiores aos valores determinados para o feno de prado natural e a quantidade de PB da palha é menor do que o valor médio encontrado para o feno.

Quadro 6.1 - Composição química dos alimentos utilizados: feno de prado natural (F); palha de trigo (Pa); polpa de citrinos (P).

	MO	PB	NDF	ADF	ADL
	g.kgMS ⁻¹				
F (n=4)	941,50 (±5,911)	80,60 (±2,293)	651,77 (±5,011)	413,25 (±6,217)	61,22 (±2,223)
Pa (n=4)	949,70 (±3,511)	50,20 (±2,023)	893,90 (±17,364)	521,80 (±10,702)	72,80 (±5,093)
P (n=2)	926,20 (±0,141)	61,95 (±0,353)	215,40 (±5,656)	–	–

± - desvio padrão da amostra; MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; NDF – fibra de detergente neutra; ADF – fibra de detergente ácido; ADL – lenhina de detergente ácido.

No Quadro 6.1 apresenta-se a composição química da polpa de citrinos que foi utilizada como suplemento energético verificando-se que a fracção NDF é muito menor do que nos alimentos forrageiros e que a quantidade de PB deste alimento se situa entre os valores determinados para a PB do feno e da palha.

No Quadro 6.2 apresenta-se a composição química dos substratos utilizados para dois níveis de PB, com ou sem a adição de polpa de citrinos.

Quadro 6.2 - Composição química das misturas de alimentos utilizados:

F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

	MO	PB	NDF	ADF	ADL
	g.kg MS ⁻¹				
F	941,50 ^{abcd} (±5,911)	80,60 ^a (±2,293)	651,77 ^a (±5,011)	413,25 ^a (±6,217)	61,22 ^a (±2,223)
FU	952,31 ^{cd} (±2,698)	119,49 ^c (±2,638)	641,00 ^a (±1,892)	388,14 ^d (±2,570)	59,64 ^a (±1,935)
2FU	947,89 ^{cd} (±3,304)	159,96 ^d (±0,575)	644,02 ^a (±5,043)	385,60 ^d (±4,525)	58,49 ^{ac} (±1,305)
FUP	941,86 ^{bcd} (±1,881)	120,27 ^c (±2,168)	482,47 ^c (±2,891)	324,48 ^e (±4,333)	39,88 ^d (±2,104)
2FUP	953,15 ^{cd} (±4,767)	160,72 ^d (±0,607)	469,61 ^c (±8,813)	327,82 ^e (±4,173)	38,27 ^d (±0,527)
Pa	949,70 ^{cd} (±3,511)	50,20 ^b (±2,023)	893,90 ^f (±17,364)	521,80 ^h (±10,702)	72,80 ^e (±5,093)
PaU	956,30 ^d (±2,205)	119,32 ^c (±1,236)	799,66 ^e (±6,394)	469,91 ^f (±6,491)	61,092 ^a (±4,597)
2PaU	928,72 ^{ab} (±0,908)	160,06 ^d (±5,457)	810,39 ^e (±4,331)	486,99 ^g (±1,976)	61,18 ^a (±0,968)
PaUP	943,58 ^{bcd} (±0,831)	120,58 ^c (±1,057)	570,76 ^d (±9,965)	382,61 ^{cd} (±6,103)	52,72 ^c (±1,011)
2PaUP	954,76 ^{cd} (±0,140)	160,16 ^d (±0,354)	553,07 ^d (±3,471)	370,80 ^c (±4,692)	43,59 ^d (±0,519)
UP	940,00 ^{abc} (±9,008)	120,80 ^c (±1,731)	206,72 ^b (±2,558)	138,67 ^b (±8,325)	23,27 ^b (±1,902)
2UP	926,73 ^a (±3,533)	161,31 ^d (±1,469)	213,85 ^b (±4,856)	136,68 ^b (±5,802)	23,07 ^b (±0,650)

± - desvio padrão da amostra; MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; NDF – fibra de detergente neutro; ADF – fibra de detergente ácido; ADL – lenhina de detergente ácido.

6.3.2 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO OBTIDA PELO MÉTODO DA PRODUÇÃO DE GÁS – FENO DE PRADO NATURAL

No Quadro 6.3 apresentam-se os resultados obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases aos resultados da fermentação *in vitro* do feno de prado natural (F) com e sem suplemento de polpa de citrinos

(P) e com dois níveis de suplementação de ureia (U) e na Figura 6.1 apresenta-se a distribuição dos valores estimados para as curvas de cinética de fermentação *in vitro* dos mesmos alimentos.

Observando a Figura 6.1 e analisando os valores de produção de gás (ml.gMO^{-1}) verifica-se que os alimentos utilizados apresentaram uma distribuição homogênea durante o período de 96 horas de incubação. No entanto, foi evidente a menor produção de gás que ocorreu com o aumento sucessivo do teor em PB do substrato, quando o feno+ureia foi utilizado com ou sem polpa de citrinos. As amostras em que se utilizou a polpa de citrinos como suplemento (FUP e 2FUP), caracterizam-se por terem evidenciado uma produção de gás bastante superior ($P < 0,05$) às outras amostras. Para todos os substratos fermentados, a produção de gás observada após as primeiras 70 horas de incubação indica uma tendência evidente para a estabilização, podendo considerar-se que o patamar de fermentação foi atingido.

Os elevados coeficientes de determinação (r^2) calculados para os diferentes substratos, variando entre 0,990 ($\pm 0,001$) no 2FU e 0,997 ($\pm 0,001$) no FUP, evidenciam a precisão obtida com a aplicação do modelo logístico de duas fases no estudo da cinética da fermentação de alimentos com uma composição química diferente.

O volume de gás produzido na primeira fase (V_{FA}) de fermentação do F foi de 26,4 ($\pm 3,18$) ml.gMO^{-1} diminuindo para o FU (23,9 $\pm 2,79$ ml.gMO^{-1}) e ainda mais para o 2FU (17,2 $\pm 2,00$ ml.gMO^{-1}), onde foi significativamente menor ($P < 0,05$). O volume total de gás produzido (V) também diminuiu ($P < 0,05$) com o aumento da PB do substrato passando de 191,4 ($\pm 5,17$) ml.gMO^{-1} no F para 171,5 ($\pm 5,65$) ml.gMO^{-1} no 2FU. Situação idêntica ocorreu em relação à taxa máxima de produção de gás (μ_{mA}) e ao volume de gás produzido na segunda fase (V_{FB}). Em relação a estes parâmetros verificou-se que o μ_{mA} foi menor ($P > 0,05$) para o 2FU (4,5 $\pm 0,43$ $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quando comparado com os valores obtidos para o F (7,6 $\pm 2,38$ $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e FU (5,7 $\pm 1,61$ $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Também o V_{FB} diminuiu ligeiramente ($P > 0,05$) com o aumento do teor em PB passando de 165,0 ($\pm 2,07$) ml.gMO^{-1} no F para 154,2 ($\pm 5,28$) ml.gMO^{-1} no 2FU. Situação idêntica ocorreu com a taxa máxima de produção de gás na segunda fase (μ_{mB}). A taxa específica de digestão na

segunda fase (μ_{mB}/V_{FB}) não sofreu variação com o aumento da quantidade de ureia no substrato. Pelo contrário, o tempo de latência λ foi aumentando ($P>0,05$) com o acréscimo do teor em PB do substrato passando de ($1,7 \pm 0,76$ h) no F para ($2,2 \pm 0,20$ h) no FU e para ($3,4 \pm 0,39$ h) no 2FU.

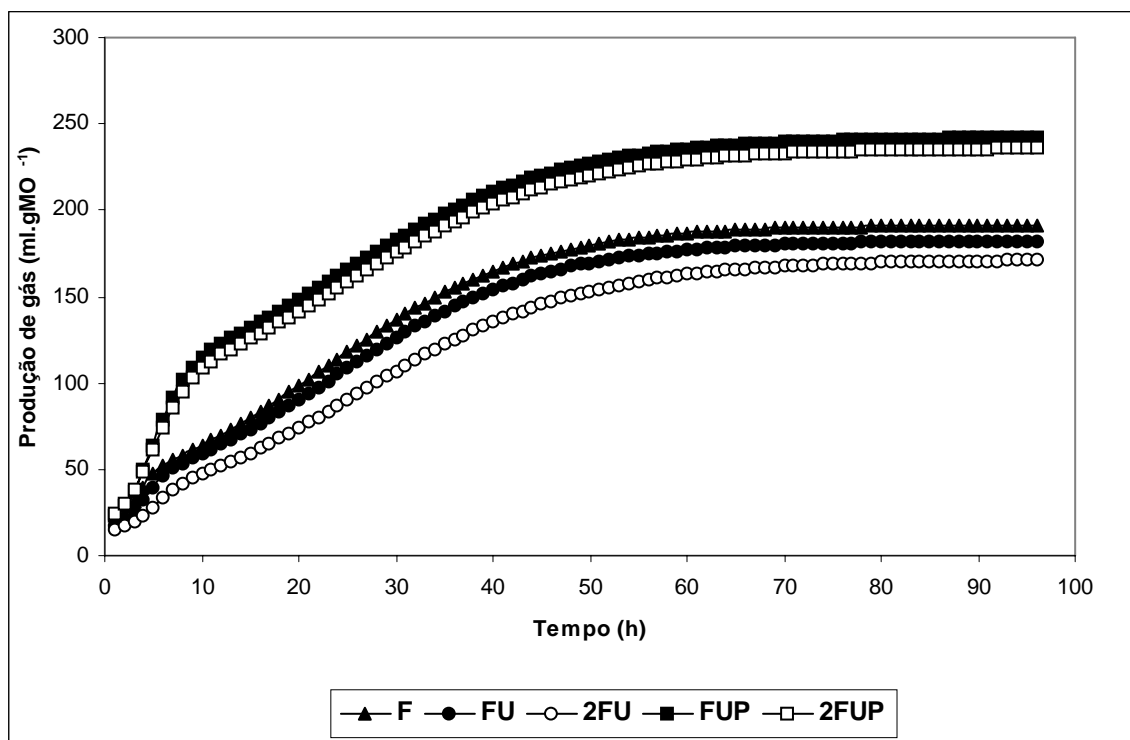


Figura 6.1 - Curvas da cinética de fermentação do feno (F), feno+ureia com 12% de PB (FU), feno+ureia com 16% de PB (2FU), feno+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (FUP) e feno+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2FUP), calculadas a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

Em termos globais pode-se dizer que a utilização de níveis crescentes de suplementação proteica com ureia provocou uma diminuição progressiva nos valores obtidos para a maior parte dos parâmetros considerados tendo aumentado apenas o tempo de latência e a taxa específica de digestão da primeira fase.

A adição da polpa de citrinos ao feno parece ter sido vantajosa para os dois níveis de proteína bruta do substrato, principalmente para os resultados obtidos durante a primeira fase da fermentação. Comparando com os valores determinados para o feno sem suplemento energético (F, FU, 2FU) (Quadro 6.3), verificou-se um aumento ($P<0,05$) do V_{FA} , do μ_{mA} e do V . Para o substrato

onde existiu polpa de citrinos, o valor médio de V_{FA} foi de 84,5 ($\pm 3,02$) ml.gMO⁻¹ para o FUP e de 78,5 ($\pm 5,32$) ml.gMO⁻¹ para o 2FUP, o valor do μ_{mA} foi de 13,4 ($\pm 0,44$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ para o FUP e de 12,7 ($\pm 1,45$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ para o 2FUP e o valor de V para o FUP foi de 242,2 ($\pm 7,35$) ml.gMO⁻¹ e para o 2FUP foi de 236,1 ($\pm 7,60$) ml. gMO⁻¹.

Quadro 6.3 - Efeito da utilização de dois níveis de proteína bruta (PB), com e sem polpa de citrinos, na variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação *in vitro* (F – feno; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB)).

	Alimentos					EPM	P
	F	FU	2FU	FUP	2FUP		
V_{FA}	26,4 ^a ($\pm 3,18$)	23,9 ^{ab} ($\pm 2,79$)	17,2 ^b ($\pm 2,00$)	84,5 ^c ($\pm 3,02$)	78,5 ^c ($\pm 5,32$)	1,72	**
μ_{mA}	7,6 ^a ($\pm 2,38$)	5,7 ^a ($\pm 1,61$)	4,5 ^a ($\pm 0,43$)	13,4 ^b ($\pm 0,44$)	12,7 ^b ($\pm 1,45$)	0,73	**
λ	1,7 ($\pm 0,76$)	2,2 ($\pm 0,20$)	3,4 ($\pm 0,39$)	2,0 ($\pm 0,46$)	1,9 ($\pm 1,68$)	0,43	ns
V_{FB}	165,0 ($\pm 2,07$)	158,1 ($\pm 5,23$)	154,2 ($\pm 5,28$)	157,7 ($\pm 8,04$)	157,6 ($\pm 7,15$)	2,96	ns
μ_{mB}	3,9 ($\pm 0,28$)	3,4 ($\pm 0,40$)	3,3 ($\pm 0,40$)	3,5 ($\pm 0,18$)	3,4 ($\pm 0,33$)	0,19	ns
r^2	0,994 ^{ab} ($\pm 0,002$)	0,991 ^{bc} ($\pm 0,003$)	0,990 ^c ($\pm 0,001$)	0,997 ^{ad} ($\pm 0,001$)	0,996 ^{ad} ($\pm 0,002$)	0,001	**
μ_{mA}/V_{FA}	0,287 ^a ($\pm 0,080$)	0,242 ^{ac} ($\pm 0,083$)	0,267 ^{ac} ($\pm 0,043$)	0,159 ^{bc} ($\pm 0,001$)	0,162 ^{bc} ($\pm 0,011$)	0,082	*
μ_{mB}/V_{FB}	0,024 ($\pm 0,002$)	0,022 ($\pm 0,003$)	0,022 ($\pm 0,003$)	0,022 ($\pm 0,002$)	0,022 ($\pm 0,002$)	0,001	ns
V	191,4 ^a ($\pm 5,17$)	182,0 ^{ab} ($\pm 7,73$)	171,5 ^b ($\pm 5,65$)	242,2 ^c ($\pm 7,35$)	236,1 ^c ($\pm 7,60$)	3,39	**

^{a b c d} – valores com notações diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05); \pm – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (** P<0,01) (* P<0,05); ns – diferenças não significativas.

Em relação ao tempo de latência (λ), verificou-se uma diminuição não significativa dos valores estimados após a adição de polpa de citrinos ao substrato, sendo de 2,0 ($\pm 0,46$) h no FUP e de 1,9 ($\pm 1,68$) h no 2FUP.

A diminuição foi significativa (P<0,05) em comparação com a taxa específica de digestão da primeira fase (μ_{mA}/V_{FA}) obtida para o feno sem a

adição de suplementos sendo de $0,159.h^{-1}$ ($\pm 0,001$) para o FUP e de $0,162.h^{-1}$ ($\pm 0,011$) para o 2FUP.

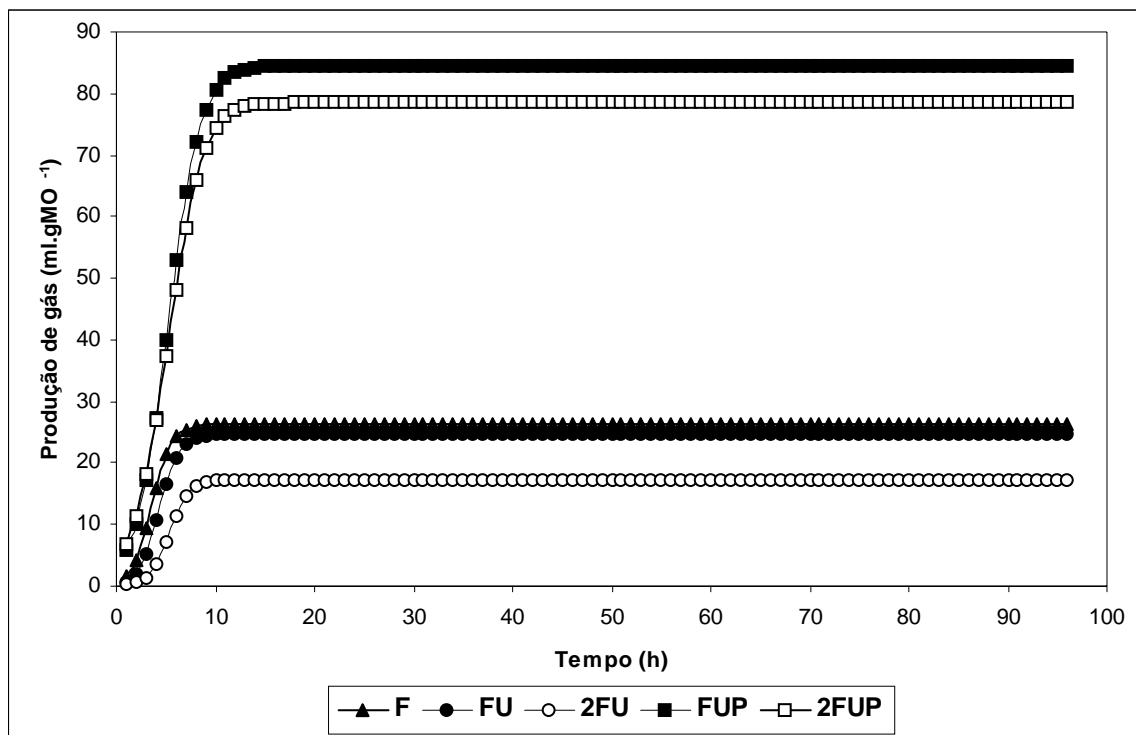


Figura 6.2 - Produção de gás da primeira fase de fermentação do feno (F), feno+ureia com 12% de PB (FU), feno+ureia com 16% de PB (2FU), feno+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (FUP) e feno+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2FUP), calculada a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

A adição de polpa de citrinos ao feno suplementado com ureia para 12% e 16% de PB trouxe alterações importantes aos valores obtidos para alguns parâmetros, principalmente para aqueles que definem o processo fermentativo que ocorreu na primeira fase de fermentação. Com exceção do μ_{mA}/V_{FA} , em que houve uma diminuição ($P < 0,05$) os valores obtidos para o V_{FA} , para o μ_{mA} e para o V foram significativamente mais elevados ($P < 0,01$) após a adição da polpa de citrinos. Entre o FU e o FUP houve um aumento de $60,6 \text{ ml.gMO}^{-1}$ no que diz respeito ao volume de gás produzido na primeira fase, um aumento de $7,7 \text{ ml.gMO}^{-1}.h^{-1}$ em relação à taxa máxima de produção de gás na primeira fase e um aumento de $60,2 \text{ ml.gMO}^{-1}$ em relação ao somatório do volume de gás produzido na primeira fase mais o gás produzido na segunda fase. Entre o

2FU e o 2FUP, o aumento foi de $61,3 \text{ ml.gMO}^{-1}$ em relação ao V_{FA} , foi de $8,2 \text{ ml.gMO}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em relação ao μ_{mA} e foi de $64,6 \text{ ml.gMO}^{-1}$ em relação ao V .

As Figuras 6.2 e 6.3 mostram a evolução da produção de gás (ml.gMO^{-1}) estimada para as duas fases de fermentação do substrato, após a aplicação do modelo logístico de duas fases.

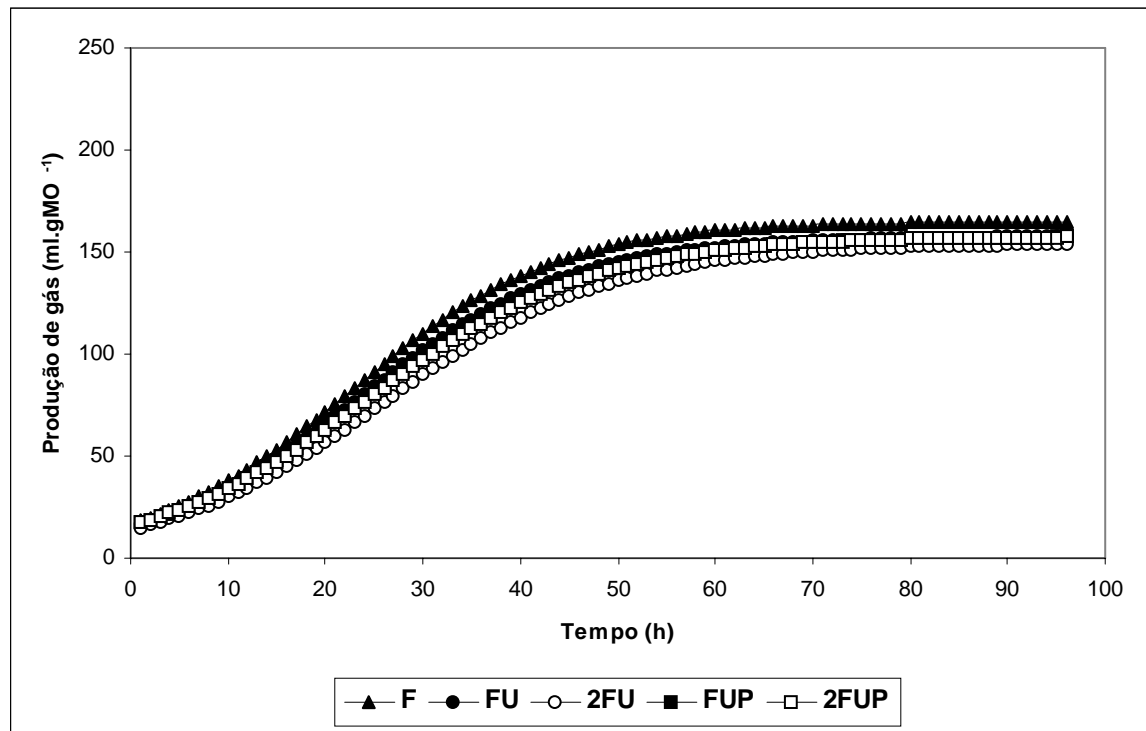


Figura 6.3 - Produção de gás da segunda fase de fermentação do feno (F), feno+ureia com 12% de PB (FU), feno+ureia com 16% de PB (2FU), feno+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (FUP) e feno+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2FUP), calculada a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

Na primeira fase (Figura 6.2), verificou-se que a produção máxima de gás obtida para o feno com a adição de polpa de citrinos (FUP e 2FUP) foi atingida 3-4 horas mais tarde do que nos substratos F, FU e 2FU, onde a produção máxima ocorreu às 9-10 horas de incubação. Verificou-se também que a utilização de polpa de citrinos originou sempre uma significativamente maior produção de gás na primeira fase e que o substrato constituído por feno+ureia com 16% (2FU) foi o que menor quantidade de gás produziu. Aliás, a utilização de ureia como suplemento único para o feno (FU e 2FU), provocou sempre uma redução na produção de gás da primeira fase, quando comparado com o feno sem suplementos.

Verificou-se também que a percentagem de gás produzido na primeira fase de fermentação, em relação ao total de gás produzido durante as 96 horas de incubação, variou com o tipo de alimento. Para o feno sem polpa de citrinos a variação foi entre 13,8% (F), 13,1% (FU) e 10,0% (2FU). Para o feno com polpa de citrinos a percentagem de gás produzido na primeira fase variou entre 34,9% (FUP) e 33,2% (2FUP).

Na segunda fase de fermentação (Figura 6.3), não se verificaram diferenças significativas entre a quantidade de gás produzido durante a incubação dos diferentes substratos, embora o que produziu menos tenha sido o 2FU. As características das curvas obtidas são idênticas e perfeitamente distintas das que foram definidas para a primeira fase de fermentação. Verificou-se que os diferentes alimentos (F, FU, 2FU, FUP e 2FUP) apresentaram uma capacidade fermentativa homogênea durante a segunda fase de incubação.

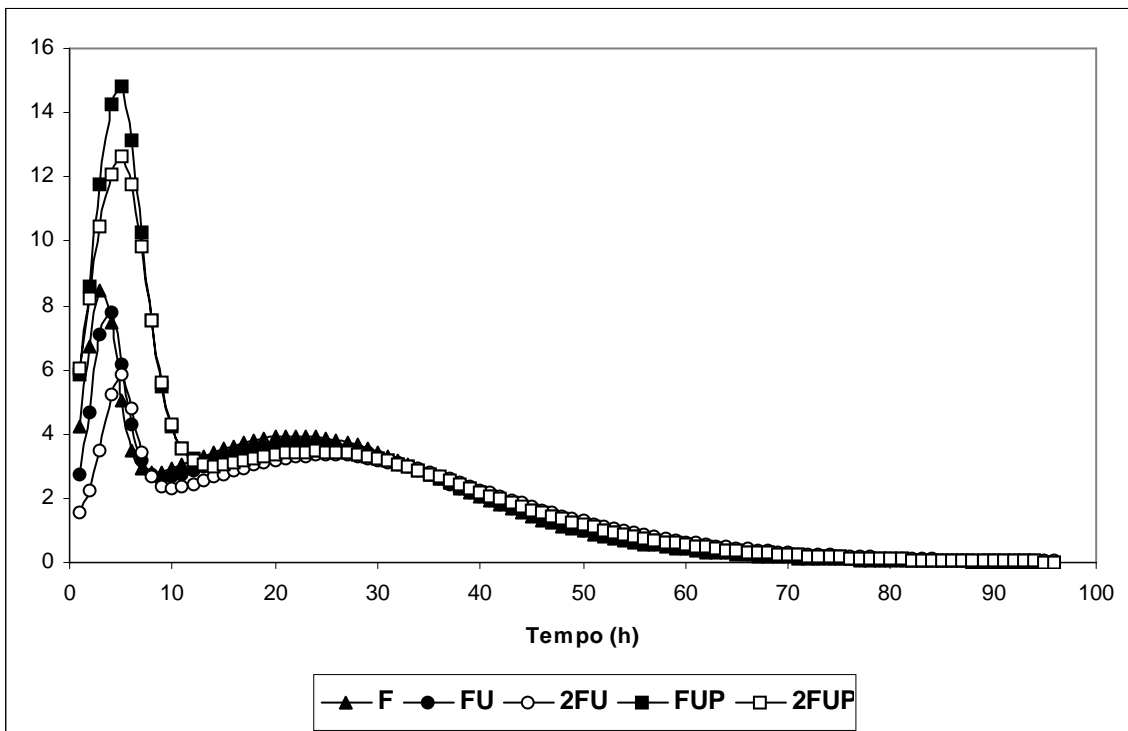


Figura 6.4 - Taxa de fermentação do feno (F), feno+ureia com 12% de PB (FU), feno+ureia com 16% de PB (2FU), feno+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (FUP) e feno+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2FUP), calculada a partir da diferença entre a produção de gás obtida para cada unidade de tempo.

A Figura 6.4 mostra a taxa de fermentação dos diferentes substratos considerados. A análise da taxa de fermentação evidencia dois aspectos fundamentais. O primeiro está relacionado com os tempos de latência, verificando-se, neste caso, que há uma coincidência entre o início da produção de gás em todos os alimentos incubados, embora o substrato 2FU comece a fermentar ligeiramente mais tarde. O segundo, demonstra as diferenças existentes entre a primeira fase e a segunda fase de fermentação.

O que ocorre na primeira fase está relacionado com os mecanismos de fermentação em que há hidrólise de uma fracção solúvel facilmente fermentescível. A segunda fase de fermentação está directamente relacionada com a fracção da parede vegetal que é insolúvel ou tem capacidade fermentativa limitada.

Para todos os casos verifica-se que a taxa de fermentação é muito mais elevada na primeira fase, o máximo ocorre durante as primeiras 6 horas de fermentação embora o valor atingido seja muito variável. Verifica-se também que os substratos com maior taxa de fermentação na primeira fase são aqueles em que o feno foi suplementado com polpa de citrinos (FUP e 2FUP) e que o menor valor foi atingido pelo feno+ureia com 16% de PB (2FU).

Como seria de esperar, a taxa de fermentação foi inferior na segunda fase e o valor máximo foi atingido entre as 23 e as 25 horas de incubação. Foi evidente uma grande uniformidade entre as curvas obtidas para os diferentes substratos. Mesmo quando se utilizou polpa de citrinos como suplemento (FUP e 2FUP), a taxa de fermentação na segunda fase foi semelhante à dos outros alimentos (F, FU, 2FU). A Figura 6.4 permite-nos ainda confirmar que, próximo das 70 horas de incubação, foi atingido o patamar de fermentação de todos os alimentos.

6.3.3 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO* OBTIDA PELO MÉTODO DA PRODUÇÃO DE GÁS – PALHA DE TRIGO

No Quadro 6.4 apresentam-se os valores obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases aos resultados da fermentação *in vitro* da palha

de trigo (Pa). Este alimento forrageiro foi utilizado com e sem suplementação de ureia e, para cada nível de suplementação azotada, com e sem polpa de citrinos.

A distribuição dos valores estimados para as curvas de fermentação durante o período de 96 horas de incubação de cada alimento é apresentada na Figura 6.5.

Observando a Figura 6.5 e analisando os valores correspondentes à produção de gás (ml.gMO^{-1}) verifica-se que, com exceção do substrato constituído por palha suplementada com ureia até aos 16% de PB (2PaU), os outros alimentos (Pa, PaU, PaUP, 2PaUP) apresentaram uma distribuição homogênea durante as 96 horas de incubação. No entanto, verifica-se uma menor produção de gás com o aumento da quantidade de ureia, tendência que se manteve mesmo quando se utilizou polpa de citrinos como suplemento. As amostras em que a polpa de citrinos foi utilizada (PaUP e 2PaUP), tiveram uma produção de gás significativamente maior ($P < 0,01$) do que as outras amostras (Pa, PaU e 2PaU).

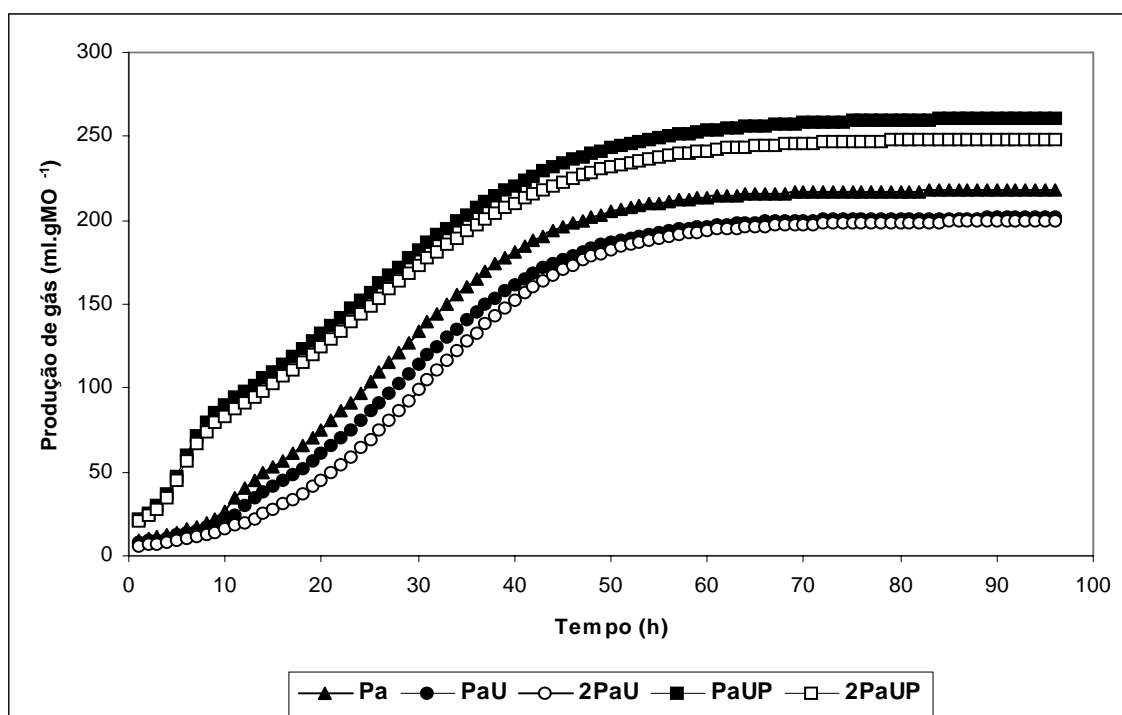


Figura 6.5 - Curva da cinética de fermentação da palha (Pa), da palha+ureia com 12% de PB (PaU), da palha+ureia com 16% de PB (2PaU), da palha+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (PaUP) e da palha+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2PaUP), calculada a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

Para todos os substratos, a produção de gás verificada após as primeiras 70 horas de incubação indicou uma clara tendência para a estabilização, atingindo-se o limite de fermentação.

Os coeficientes de determinação (r^2) calculados para os diferentes substratos em que se utilizou a palha variaram entre 0,989 ($\pm 0,003$) no 2PaUP, 0,991 ($\pm 0,002$) no PaU, 0,993 ($\pm 0,002$) no Pa e 0,997 ($\pm 0,001$) nos PaUP e 2PaUP. Estes elevados coeficientes de determinação permitem-nos afirmar que foi grande a precisão obtida com a aplicação do modelo logístico de duas fases ao estudo da cinética da fermentação de alimentos com uma composição química diferente, embora para o substrato 2PaU não tenha sido possível estimar valores para a primeira fase de fermentação.

Quadro 6.4 - Efeito da utilização de dois níveis de proteína bruta (PB) na variação dos parâmetros obtidos com a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação *in vitro* (Pa – palha; PaUP – palha+ureia (12% PB); 2PaUP -. palha+ureia (16% PB); PaUP – palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP -. palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB)).

	Alimentos					EPM	P
	Pa	PaU	2PaU	PaUP	2PaUP		
V_{FA}	13,0 ^a ($\pm 2,16$)	7,0 ^b ($\pm 0,64$)	–	47,7 ^c ($\pm 5,17$)	42,5 ^c ($\pm 7,528$)	2,35	**
μ_{mA}	9,5 ^a ($\pm 2,32$)	5,7 ^b ($\pm 0,33$)	–	11,2 ^a ($\pm 1,15$)	10,1 ^a ($\pm 0,61$)	0,67	**
λ	10,0 ^a ($\pm 0,82$)	11,0 ^a ($\pm 0,14$)	13,7 ^b ($\pm 2,11$)	3,3 ^c ($\pm 1,02$)	3,3 ^c ($\pm 0,84$)	0,59	**
V_{FB}	204,7 ^{ab} ($\pm 10,44$)	194,4 ^a ($\pm 3,93$)	199,3 ^{ab} ($\pm 8,05$)	213,3 ^b ($\pm 4,14$)	206,4 ^{ab} ($\pm 5,15$)	3,41	*
μ_{mB}	6,0 ^a ($\pm 0,24$)	5,6 ^{ab} ($\pm 0,24$)	6,0 ^a ($\pm 0,10$)	5,0 ^{bc} ($\pm 0,46$)	4,9 ^c ($\pm 0,44$)	0,16	**
r^2	0,993 ^a ($\pm 0,002$)	0,991 ^a ($\pm 0,002$)	0,989 ^a ($\pm 0,003$)	0,997 ^b ($\pm 0,001$)	0,997 ^b ($\pm 0,001$)	0,001	**
μ_{mA}/V_{FA}	0,756 ^a ($\pm 0,258$)	0,816 ^a ($\pm 0,101$)	–	0,236 ^b ($\pm 0,019$)	0,243 ^b ($\pm 0,036$)	0,070	**
μ_{mB}/V_{FB}	0,030 ^a ($\pm 0,000$)	0,029 ^a ($\pm 0,001$)	0,030 ^a ($\pm 0,001$)	0,024 ^b ($\pm 0,002$)	0,024 ^b ($\pm 0,002$)	0,001	**
V	217,7 ^a ($\pm 9,92$)	201,5 ^b ($\pm 3,79$)	199,3 ^b ($\pm 8,05$)	261,0 ^c ($\pm 3,71$)	248,9 ^c ($\pm 7,42$)	3,51	**

a b c – valores com notações diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$); \pm – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (** $P < 0,01$) (* $P < 0,05$).

O volume de gás (Quadro 6.4) produzido na primeira fase da fermentação do alimento Pa foi de 13,0 ($\pm 2,16$) ml.gMO⁻¹. Esta quantidade muito baixa, diminuiu ainda mais para o PaU (7,0 $\pm 0,64$) ml.gMO⁻¹ (P<0,05) não sendo mesmo possível determinar qualquer valor que definisse o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação da palha+ureia com 16% de PB (2PaU). A taxa máxima de produção de gás da primeira fase (μ_{mA}) diminuiu significativamente (P<0,05) do substrato Pa (9,5 $\pm 2,32$ ml.gMO⁻¹.h⁻¹) para o PaU (5,7 $\pm 0,33$ ml.gMO⁻¹.h⁻¹). Pelo contrário, a taxa de digestão específica da primeira fase aumentou de forma não significativa do Pa para o PaU sendo, respectivamente, de 0,756 h⁻¹ ($\pm 0,258$) e 0,816 h⁻¹ ($\pm 0,101$). Quando foram analisados os resultados obtidos para a segunda fase verificou-se que o V_{FB} produzido foi semelhante nos alimentos sem polpa de citrinos, variando entre 204,7 ($\pm 10,44$) ml.gMO⁻¹ no Pa e 194,4 ($\pm 3,93$) ml.gMO⁻¹ no PaU. Os resultados obtidos para o μ_{mB} foram idênticos para os três substratos tendo variado entre 6,0 ml.gMO⁻¹.h⁻¹ no Pa e 2PaU e 5,6 ml.gMO⁻¹.h⁻¹ no PaU. Verificou a mesma situação com a taxa específica de digestão da segunda fase que foi igual para o Pa, o PaU e o 2PaU. A quantidade total de gás produzido (V) diminuiu com o aumento da PB do substrato sendo mais elevada no Pa (217,7 $\pm 9,92$ ml.gMO⁻¹) (P<0,05) baixando para 201,5 ($\pm 3,79$) ml.gMO⁻¹ no PaU e para 199,3 ($\pm 8,05$) ml.gMO⁻¹ no 2PaU.

Contrariando a tendência geral, o tempo de latência λ , além de ser muito elevado no Pa, foi aumentando com o acréscimo do teor em PB do substrato passando de 10,0 ($\pm 0,82$) h no Pa para 11,0 ($\pm 0,14$) h no PaU, aumentando ainda mais (P<0,05) no 2PaU (13,7 $\pm 2,11$ h).

Interpretando os resultados obtidos, e tal como havia acontecido com o feno de prado natural, também a adição de ureia à palha parece ter tido um efeito negativo, provocando uma diminuição dos valores obtidos para a maior parte dos parâmetros e um aumento do tempo de latência e da taxa específica de digestão da primeira fase.

Ao analisarmos os resultados obtidos após a adição da polpa de citrinos à palha de trigo verificamos que, principalmente para a primeira fase de fermentação, a suplementação parece ter sido vantajosa para os dois níveis de

proteína bruta do substrato. O valor médio do V_{FA} para o PaUP foi de 47,7 ($\pm 5,17$) ml.gMO⁻¹ e para o 2PaUP foi de 42,5 ($\pm 7,52$) ml.gMO⁻¹. O μ_{mA} determinado foi de 11,2 ($\pm 1,15$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ para o PaUP e de 10,1 ($\pm 0,61$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ para o 2PaUP e a taxa específica de digestão na primeira fase foi idêntica para os dois substratos. Em relação à segunda fase de fermentação dos alimentos contendo polpa de citrinos, o aumento do teor em PB do substrato de 12% para 16%, também provocou uma diminuição não significativa dos valores encontrados para o V_{FB} e μ_{mB} . O μ_{mB}/V_{FB} foi igual para os dois níveis de proteína bruta. No que diz respeito à produção total de gás (V), verificou-se uma diminuição não significativa com o acréscimo de PB do substrato passando de 261,0 ($\pm 3,71$) ml.gMO⁻¹ no PaUP para 248,9 ($\pm 7,42$) ml.gMO⁻¹ no 2PaUP. O aumento do teor em PB nos alimentos em que se utilizou polpa de citrinos não provocou alterações significativas no tempo de latência (λ) do PaUP e do 2PaUP.

Quando se fez a comparação dos resultados obtidos para a palha de trigo sem (Pa, PaU, 2PaU) e com (PaUP, 2PaUP) polpa de citrinos, independentemente dos teores em PB (12% e 16%) (Quadro 6.4), verificou-se que, em todos os parâmetros, ocorreram alterações importantes.

Por exemplo, o V_{FA} , o μ_{mA} e o V aumentaram significativamente ($P < 0,05$) com a adição da polpa de citrinos. Entre o volume de gás produzido pelos substratos PaU e PaUP na primeira fase de fermentação (V_{FA}) houve um aumento de 40,7 ml.gMO⁻¹. A taxa máxima de produção de gás da primeira fase (μ_{mA}) também aumentou, sendo no PaUP mais elevada 5,5 ml.gMO⁻¹.h⁻¹ do que no PaU. O volume total de gás produzido (V) do PaUP foi 59,5 ml.gMO⁻¹ mais elevado do que o PaU e o V do 2PaUP foi 49,6 ml.gMO⁻¹ superior ao do 2PaU. Em relação ao volume de gás produzido na segunda fase de fermentação (V_{FB}) o aumento foi menor.

Outros parâmetros como o λ , o μ_{mB} , o μ_{mA}/V_{FA} e o μ_{mB}/V_{FB} , pelo contrário, tiveram reduções significativas após a adição da polpa de citrinos. O tempo de latência (λ), por exemplo, diminuiu de forma acentuada ($P < 0,05$). Entre o PaU e o PaUP a diminuição foi de 7,7 h e entre o 2PaU e o 2PaUP foi mesmo de 10,4 h. A taxa específica de digestão da primeira fase também sofreu uma redução acentuada ($P < 0,05$) com a adição da polpa. Já em relação ao μ_{mB} e ao μ_{mB}/V_{FB}

as reduções, embora significativamente diferentes ($P < 0,05$), tiveram menor expressão (Quadro 6.4).

As Figura 6.6 e 6.7 representam a evolução da produção de gás (ml.gMO^{-1}) estimada para as duas fases de fermentação do substrato, após a aplicação do modelo logístico de duas fases.

Para a primeira fase de fermentação (Figura 6.6), o modelo utilizado não conseguiu estimar valores para a palha+ureia com 16% de PB (2PaU) pelo que não está representada nenhuma curva para este alimento. Verificou-se que a produção máxima de gás dos substratos sem polpa de citrinos (Pa e PaU) ocorreu cerca de 2 horas mais tarde do que nos alimentos com polpa (PaUP e 2PaUP). Para estes, a produção máxima foi muito superior tendo sido atingida após 10 horas de incubação. Verifica-se também que, para o Pa e PaU, há um período de tempo prolongado, cerca de 8-9 horas, em que praticamente não há produção de gás.

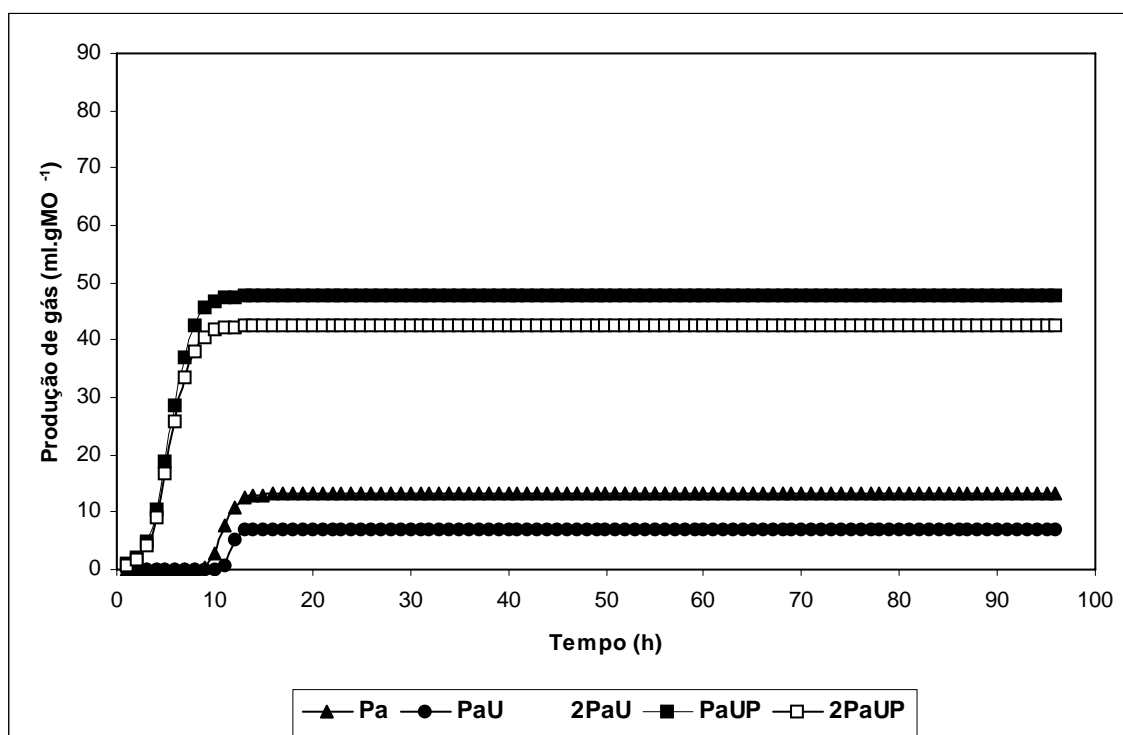


Figura 6.6 - Produção de gás da primeira fase de fermentação da palha (Pa), da palha+ureia com 12% de PB (PaU), da palha+ureia com 16% de PB (2PaU), da palha+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (PaUP) e da palha+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2PaUP), calculada a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

A percentagem do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação em relação ao total de gás produzido durante as 96 horas de incubação, variou com o tipo de substrato. Para a palha sem polpa de citrinos a variação foi entre 6,0% no Pa e 3,5% no PaU. Para a palha com polpa de citrinos a variação foi entre 18,3% (PaUP) e 17,1% (2PaUP).

Na segunda fase de fermentação (Figura 6.7) as características das curvas são semelhantes e muito diferentes das que foram definidas para a primeira fase.

Pode-se dizer que os diferentes alimentos (Pa, PaU, 2PaU, PaUP e 2PaUP), apresentaram uma capacidade fermentativa homogênea durante esta segunda fase de incubação, embora existam pequenas variações entre o volume de gás produzido por cada um. Essa diferença é mesmo estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o maior volume de gás produzido pelo substrato PaUP e o volume de gás produzido pelo PaU.

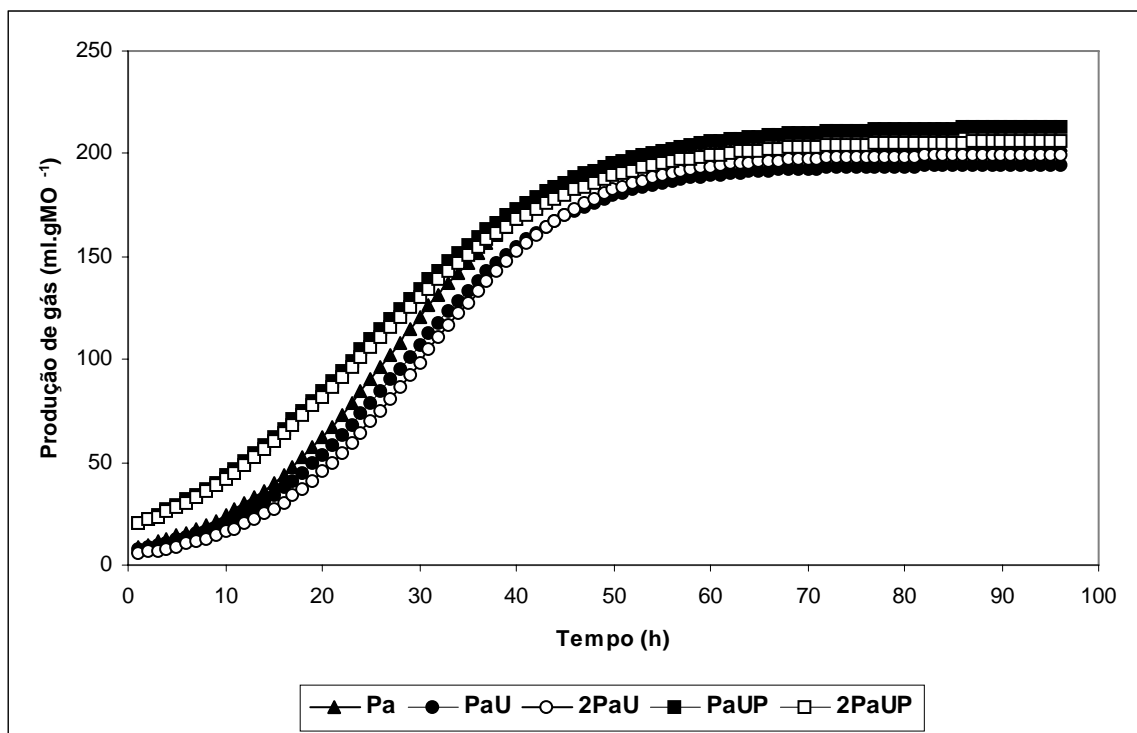


Figura 6.7 - Produção de gás da segunda fase de fermentação da palha (Pa), da palha+ureia com 12% de PB (PaU), da palha+ureia com 16% de PB (2PaU), da palha+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (PaUP) e da palha+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2PaUP), calculada a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

Na Figura 6.8 apresentam-se as taxas de fermentação dos alimentos Pa, PaU, 2PaU, PaUP e 2 PaUP. É evidente um desfasamento entre o início da produção de gás dos substratos em que foi utilizado o suplemento de polpa de citrinos e aqueles em que não existiu suplemento energético.

Verifica-se também que o substrato 2PaU não produziu gás no período correspondente à primeira fase de produção de gás dos outros alimentos.

A taxa de fermentação é muito mais elevada na primeira fase do que na segunda. Na primeira fase é notório um desfasamento de cerca de 6-7 horas entre a taxa máxima de fermentação dos alimentos com e sem polpa de citrinos.

O valor máximo nos alimentos com polpa de citrinos foi atingido pelo PaUP após as primeiras 5 horas de incubação. A taxa máxima nos alimentos sem polpa foi obtida pelo Pa, 11 horas após o início da incubação.

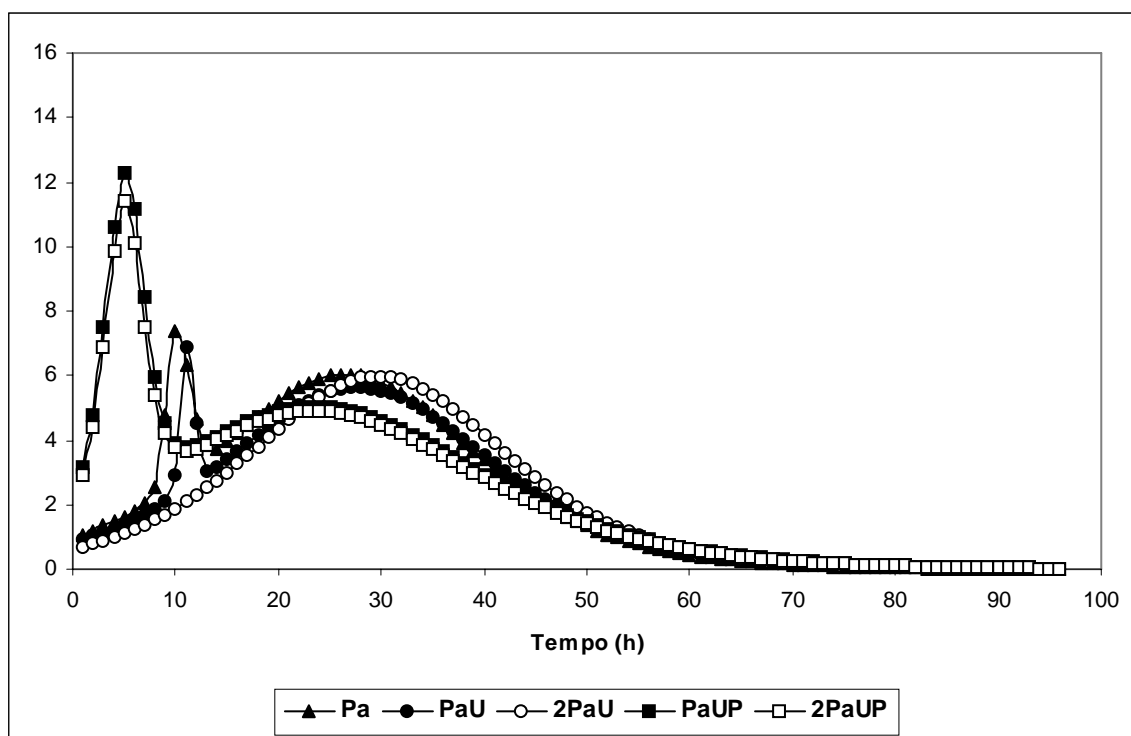


Figura 6.8 - Taxa de fermentação da palha (Pa), da palha+ureia com 12% de PB (PaU), da palha+ureia com 16% de PB (2PaU), da palha+ureia+polpa de citrinos com 12% de PB (PaUP) e da palha+ureia+polpa de citrinos com 16% de PB (2PaUP), calculada a partir da diferença entre a produção de gás obtida para cada unidade de tempo.

A taxa de fermentação da segunda fase apresentou algumas semelhanças para os diferentes alimentos e o valor máximo atingido foi sempre

inferior ao da primeira fase. Para os substratos PaUP e 2PaUP a taxa máxima ocorreu 23 horas após o início do processo de incubação e para os substratos Pa, PaU e 2PaU o valor máximo foi atingido 28 horas após. Tal como aconteceu com o feno de prado natural, também neste caso, a segunda fase de fermentação corresponde à degradação da parede celular que é insolúvel ou apresenta capacidade fermentativa limitada.

A Figura 6.8 permite-nos ainda confirmar que o patamar da fermentação dos cinco alimentos em que a palha de trigo foi a forragem utilizada, foi atingido 70 horas após o início da incubação.

6.3.4 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO* OBTIDA PELO MÉTODO DA PRODUÇÃO DE GÁS – POLPA DE CITRINOS DESIDRATADA

No Quadro 6.5 apresentam-se os resultados obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases aos valores da produção de gás resultantes da fermentação *in vitro* da polpa de citrinos desidratada, com um suplemento de ureia até 12% e 16% de PB.

Quadro 6.5 - Efeito da adição de ureia à polpa de citrinos, na variação dos parâmetros obtidos, após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética de fermentação *in vitro* (UP – polpa+ureia com 12% PB; 2UP – polpa+ureia com 16% de PB).

	Alimentos		P
	UP	2UP	
V_{FA}	229,6 (±28,69)	205,4 (±16,46)	ns
μ_{mA}	22,1 (±1,84)	23,1 (±2,55)	ns
λ	0,8 (±0,65)	1,9 (±0,66)	ns
V_{FB}	133,9 (±22,91)	137,1 (±12,24)	ns
μ_{mB}	3,3 (±0,91)	3,6 (±0,57)	ns
r^2	0,996 (±0,002)	0,998 (±0,001)	ns
μ_{mA}/V_{FA}	0,098 (±0,017)	0,112 (±0,005)	ns
μ_{mB}/V_{FB}	0,024 (±0,004)	0,026 (±0,002)	ns
V	363,5	342,6	

Figura 6.9 - Volume de gás produzido durante a primeira fase de fermentação, durante a segunda fase de fermentação e durante todo o período de incubação da polpa de citrinos com 12% de PB (UP) e com 16% de PB (2UP), calculado a partir da aplicação do modelo logístico de duas fases.

Na Figura 6.9 é possível visualizar as curvas da evolução do volume total de gás, do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação e do volume de gás produzido na segunda fase de fermentação, durante o período de incubação. Verifica-se um aumento muito rápido da quantidade de gás produzido logo a seguir ao início da incubação do substrato. O volume de gás produzido na primeira fase de fermentação corresponde no substrato UP e 2UP, respectivamente, a 63,1% e a 59,9% do volume total de gás produzido em 96 horas.

Para os dois níveis de proteína do substrato, foi determinada uma correlação negativa ($r=-0,878$; $P<0,01$) entre o V_{FA} e o V_{FB} , e entre o V_{FB} e o V ($r=-0,386$; $P>0,05$) e uma correlação positiva entre o V_{FA} e o volume total de gás (V) produzido durante as 96 horas de incubação dos substratos ($r=0,780$; $P<0,05$).

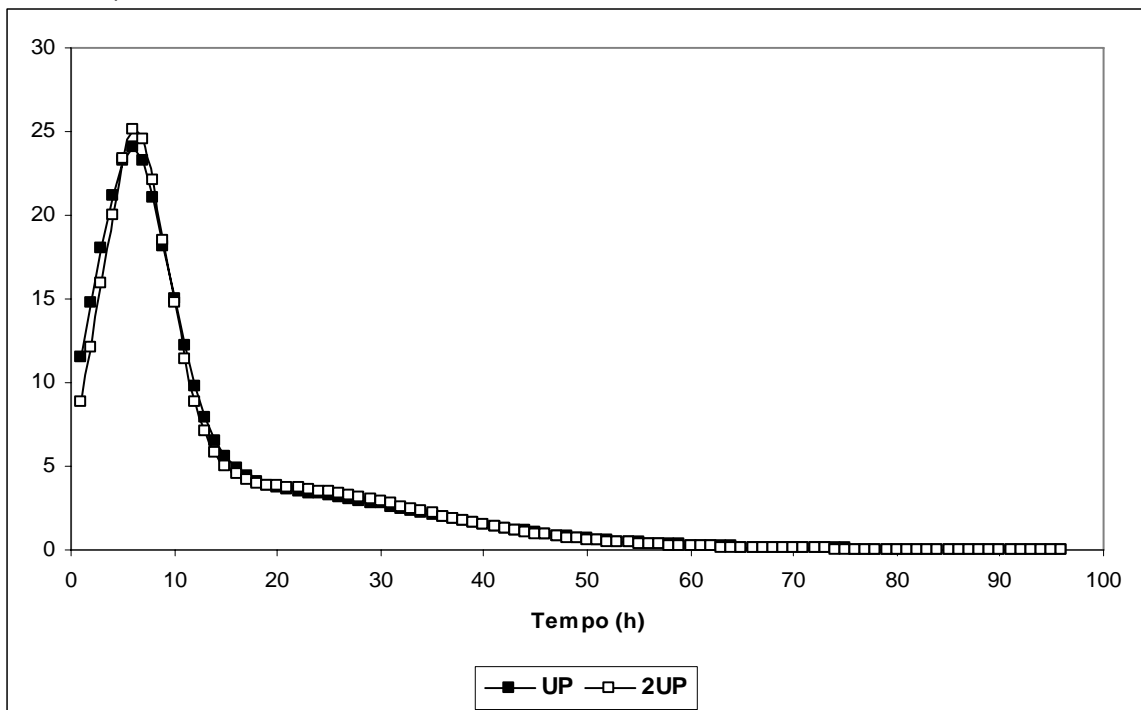


Figura 6.10 - Taxa de fermentação da polpa de citrinos com 12% de PB (UP) e com 16% de PB (2UP), calculada a partir da diferença entre a produção de gás obtida para cada unidade de tempo.

A Figura 6.10 mostra-nos a taxa de fermentação dos dois substratos considerados, havendo uma grande uniformidade entre as duas curvas apresentadas. A análise deste parâmetro evidencia uma coincidência entre o início da produção de gás dos dois alimentos incubados, reflectindo a semelhança entre os respectivos tempos de latência.

Para os substratos UP e 2UP, verifica-se que a taxa máxima de fermentação ocorre durante as primeiras 6 horas de incubação, com um valor máximo idêntico para os dois substratos.

A Figura 6.10 permite-nos ainda afirmar que o patamar de fermentação, nos dois casos, foi atingido 60 horas após a incubação.

6.4 - DISCUSSÃO

A composição química dos alimentos forrageiros utilizados é apresentada no Quadro 6.1.

Confirmam-se os valores habituais de NDF para a palha de trigo ($893,90 \text{ g.kgMS}^{-1} \pm 17,364$) valores que, embora idêntico aos referidos por RODRIGUES *et al.*, (1999) ($820,8 \text{ g.kgMS}^{-1}$), CHAMBERLAIN e WILKINSON (1996) (805 g.kgMS^{-1}) e VAN SOEST (1994) (850 g.kgMS^{-1}), é muito superior aos do feno de prado natural ($651,77 \text{ g.kgMS}^{-1} \pm 5,011$). Pelo contrário, a quantidade de PB da palha ($50,20 \text{ g.kgMS}^{-1} \pm 2,023$), é bastante inferior ao valor determinado para o feno ($80,60 \text{ g.kgMS}^{-1} \pm 2,293$) sendo, no entanto, superior aos valores, que variam entre 24 e 39 g.kgMS^{-1} , referidos por outros autores (RODRIGUES *et al.*, 1999; CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996; VAN SOEST, 1994; AFRC, 1993)

RODRIGUES (1999), trabalhando com 6 fenos de prado natural com origens diferentes, determinou valores médios de NDF e de PB respectivamente de 688,1 e $74,8 \text{ g.kgMS}^{-1}$. Como se pode ver no Quadro 6.1, o feno com que trabalhamos apresentou um NDF ligeiramente inferior e uma quantidade de PB superior.

O outro alimento utilizado foi a polpa de citrinos desidratada cuja composição química também pode ser observada no Quadro 6.1. Os resultados obtidos para o NDF deste alimento ($215,40 \text{ g.kgMS}^{-1} \pm 5,656$)

encontram-se dentro dos valores indicados por FONSECA (1997) (219 g.kgMS⁻¹) CHAMBERLAIN e WILKINSON (1996) (228 g.kgMS⁻¹) e VAN SOEST (1994) (230 g.kgMS⁻¹). No entanto, a polpa de citrinos que foi utilizada apresenta uma PB (61,95 g.kgMS⁻¹ ±0,353) inferior aos valores referidos por FONSECA (1997) (68 g.kgMS⁻¹) CHAMBERLAIN e WILKINSON (1996) (72 g.kgMS⁻¹), VAN SOEST (1994) (70 g.kgMS⁻¹), AFRC (1993) (99 g.kgMS⁻¹).

Observando o Quadro 6.2 verificamos que há uma grande homogeneidade dos diferentes substratos em relação ao conteúdo em matéria orgânica. Verifica-se também que estão organizados em dois níveis absolutamente distintos de PB, 12% e 16%.

Quando analisamos os resultados referentes à aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética de fermentação *in vitro*, verificamos que os resultados obtidos, para os diferentes parâmetros determinados para a primeira fase de fermentação do feno (V_{FA} , μ_{mA} , μ_{mA}/V_{FA}), coincidem com os valores médios referidos por RODRIGUES (1999) para 6 fenos de prado natural ($V_{FA}=29,1$ ml.gMO⁻¹; $\mu_{mA}=4,7$ ml.gMO⁻¹.h⁻¹; $\mu_{mA}/V_{FA}=0,29$ h⁻¹). O mesmo autor analisou 4 palhas diferentes e os resultados médios que obteve para a primeira fase ($V_{FA}=20,1$ ml.gMO⁻¹; $\mu_{mA}=7,9$ ml.gMO⁻¹.h⁻¹; $\mu_{mA}/V_{FA}=0,43$ h⁻¹) são diferentes dos valores por nós obtidos, o que poderá ter sido consequência de uma composição química diferente da palha com que trabalhamos.

Verificamos também que, para cada uma das forragens analisadas, o aumento da quantidade de proteína bruta da amostra (de 12% para 16%) provocou sempre uma diminuição na produção total de gás, nos casos em que houve e não houve adição de polpa de citrinos (P<0,05). Esta tendência foi pouco evidente em relação ao volume total de gás produzido na segunda fase, mas foi significativa (P<0,05) em relação à primeira fase de fermentação. Nesta fase da fermentação verificou-se mesmo uma situação extrema em que não foi possível determinar valores para o volume de gás produzido quando a palha foi suplementada com ureia até 16% de PB.

Tendência idêntica foi constatada por FONDEVILA *et al.* (1997) que obtiveram, nas primeiras 9 horas de fermentação de palha de cevada, maior volume de gás produzido do que quando adicionaram ureia à palha para 10% de PB ou do que quando utilizaram palha tratada previamente com amoníaco.

Confirmando aquela tendência GRISWOLD *et al.* (1996), utilizando um substrato constituído por palha de aveia e milho grão, analisaram o efeito que diferentes fontes azotadas como a farinha de soja, os péptidos de soja, vários aminoácidos e a ureia tinham sobre o crescimento da população microbiana do rúmen. Os suplementos foram utilizados em diferentes combinações, variando de 100% de farinha de soja até 100% de ureia, de forma a fornecerem 10% de PB uma vez que o milho e a palha forneciam até 6% da PB do regime alimentar. Comparando o substrato em que utilizaram como fonte proteica 100% de farinha de soja, com aquele em que foi utilizada 100% de ureia, verificaram que a ureia provocou uma diminuição na digestibilidade do ADF e um aumento na digestibilidade dos hidratos de carbono não estruturais e na quantidade de NH_3 produzido, atribuindo estas ocorrências à elevada degradabilidade da ureia. Não detectaram qualquer variação na digestibilidade do NDF e da matéria orgânica, nem na quantidade de azoto bacteriano produzido. De referir que, a degradabilidade da proteína bruta do substrato, variou entre 48,37 e 78,80%, respectivamente para os regimes alimentares com 100% de proteína de soja e 100% de ureia.

A palha com que trabalhamos, com um elevado NDF ($839,90 \text{ g.kgMS}^{-1}$) e com uma quantidade de PB superior ao normal ($50,20 \text{ g.kgMS}^{-1}$), poderá ter evidenciado o efeito negativo da adição de 2,50% e de 3,91% de ureia. Nos dois casos, devido à pouca quantidade de glúcidos não estruturais existentes na palha, terá havido um desfasamento entre a quantidade de NH_3 resultante da rápida hidrólise da ureia e a quantidade de energia disponível no rúmen. Esta ocorrência foi mais evidente na primeira fase de fermentação, onde o volume de gás produzido pelo substrato com 12% de PB foi de apenas $7,0 \text{ ml.gMO}^{-1}$ ($P < 0,05$), quando comparado com o valor obtido para a palha de trigo sem suplemento proteico ($13,0 \text{ ml.gMO}^{-1}$), e onde não se obtiveram valores para a produção de gás do substrato com 16% de PB.

Segundo DATT e SINGH (1995), o aumento da produção de gás indica a disponibilidade de energia e azoto fermentescível e outros nutrientes para a população microbiana do rúmen. Devido ao reduzido teor de glúcidos facilmente fermentescíveis na palha de trigo, cuja fermentação poderia acompanhar a rápida hidrólise da ureia, a produção de gás na primeira fase de

fermentação da palha foi, nos nossos ensaios, negativamente afectada pela suplementação azotada.

O tempo de latência também aumentou com o aumento da quantidade de ureia existente no substrato, tendo passado de 10,0 h na palha de trigo para 11,0 h na palha com 12% PB e para 13,7 h na palha com 16% de PB. O elevado tempo de latência poderá estar relacionado com o excesso de NH_3 existente no substrato durante as primeiras horas de fermentação.

RIHANI *et al.* (1993b) detectaram uma maior subida no valor do pH (7,03) do conteúdo do rúmen de ovinos durante a primeira hora após a ingestão de alimentos com 2,52% de ureia na matéria seca (12,5% PB), do que no rúmen de animais que ingeriram apenas 1,47% de ureia (9,5% PB) (pH=6,90). No entanto, ao fim de 9 horas o pH já tinha baixado para valores da ordem dos 6,6. CORDESSE e TABA-TABAI (1981) afirmam mesmo que, variações do pH desta ordem alteram a actividade da população bacteriana celulolítica, afectando a digestibilidade dos alimentos. Situação idêntica parece ter ocorrido no nosso trabalho, uma vez que as quantidades de ureia utilizadas (3,91% 2PaU e 2,50% PaU), superiores aos valores referidos por RIHANI *et al.* (1993b), poderão ter provocado o mesmo efeito.

Se o excesso de NH_3 produzido originar um aumento do pH para valores iguais ou superiores a 7,5 haverá condições desfavoráveis para a actividade da população microbiana do rúmen.

RANI *et al.* (1998) analisando o licor de rúmen de búfalos com alcalose induzida experimentalmente, verificaram que o pH médio e a concentração de NH_3 do licor de rúmen tinham aumentado e que a actividade e o número total dos protozoários do rúmen havia diminuído. Cerca de 96 horas após deixar de ser induzida a alcalose, os valores dos parâmetros alterados voltaram ao normal. Estes resultados são confirmados por VENKATESWARLU *et al.* (1998) que, ao analisarem as alterações ocorridas no licor de rúmen de 10 búfalos com sinais clínicos de uma alcalose induzida experimentalmente, verificaram que o pH do fluído ruminal ultrapassou 7,5, que houve um aumento significativo da concentração de NH_3 no rúmen, tendo verificado também aumentos significativos nos níveis de glucose e de ureia no sangue. SAHU *et al.* (1993) induziram alcalose aguda em 6 cabras adultas através da administração intra-

ruminal de ureia. Ao analisarem o fluído ruminal dos vários animais, verificaram uma hipomotilidade dos protozoários do rúmen até 6 horas após o início da alcalose. Verificaram também alterações importantes nos parâmetros bioquímicos do rúmen: ao fim de 2 horas, o pH ruminal atingiu o pico de 9,58; os ácidos gordos voláteis desceram para um valor mínimo (30 mEq.l^{-1}) ao fim de 2,5 horas; o azoto amoniacal aumentou para $176,97 \text{ mg.l}^{-1}$ ao fim de 2,5 horas; o azoto total atingiu o valor de $385,01 \text{ mg.l}^{-1}$ 1 hora após a administração intra-ruminal de ureia. PEDRONA *et al.* (1994) e SAHU *et al.* (1994), constataram a ocorrência de sintomas de anorexia, apatia, perda de peso, dificuldades na locomoção, aumento do pH da urina, aumento da temperatura rectal e alterações nos ritmos cardio-respiratório, para além das alterações já referidas em relação ao ecossistema ruminal.

Com o feno de prado natural utilizado, também verificámos o efeito negativo da suplementação crescente com ureia no volume de gás produzido na primeira fase. A adição de 2,86% (2FU) provocou uma diminuição acentuada ($P < 0,05$) no volume de gás produzido ($17,2 \text{ ml.gMO}^{-1}$) quando comparado com o feno sem suplemento ($26,4 \text{ ml.gMO}^{-1}$) (Quadro 5.3). Em relação ao feno suplementado com 1,43% de ureia (FU), ocorreu uma diminuição não significativa no volume de gás produzido na primeira fase de fermentação ($23,9 \text{ ml.gMO}^{-1}$).

Pelo contrário, a taxa máxima de produção de gás da primeira fase (μ_{mA}) diminuiu com o aumento do teor em PB do substrato. O μ_{mA} do feno com que trabalhamos ($7,6 \text{ ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi igual ao valor determinado para o mesmo parâmetro por RODRIGUES (1999), quando avaliou a cinética da fermentação *in vitro* de 6 fenos de prado natural diferentes ($\mu_{mA}=7,85$). As variações que ocorreram na taxa máxima de produção de gás na primeira fase de fermentação permitem-nos afirmar que a adição de ureia à razão de 2,86% e 1,43% afectou de forma não significativa aquele parâmetro.

O tempo de latência verificado durante a fermentação dos substratos 2FU (3,4 h) e FU (2,2 h) não foi significativamente diferente do valor encontrado durante a fermentação do feno sem suplemento (1,7 h) que, por sua vez, foi inferior ao valor médio determinado por RODRIGUES (1999) para 6 fenos de prado natural (2,2 h). Ou seja, embora o tempo de latência tenha

aumentado com o aumento da quantidade de ureia presente no substrato, esse aumento não foi indicador de um efeito negativo provocado pelo aumento do teor em PB do substrato.

As diferenças encontradas em relação aos parâmetros V_{FA} , μ_{mA} e λ resultantes da fermentação do feno de prado natural (NDF=65,17%; PB=8,06%) e da palha de trigo (NDF=89,39%; PB=5,02%), corresponderão ao maior conteúdo do feno em glúcidos citoplásmicos e em proteína bruta. Em comparação com a palha, a maior produção de gás na primeira fase de fermentação do feno é indicadora de maior actividade da população microbiana do rúmen (MENKE *et al.*, 1979).

A fermentação ruminal depende da quantidade de azoto ingerido e da degradabilidade da fonte azotada. RUSSELL *et al.* (1992) sugerem que há vantagens na utilização de alguma quantidade de azoto não proteico. Os mesmos autores referem que a população bacteriana responsável pela degradação dos glúcidos não estruturais, tem necessidade de azoto numa proporção de péptidos/aminoácidos: NH_3 de 66:34 e que aqueles valores não são atingidos em regimes alimentares com 100% de azoto proteico. Confirmando esta ideia, RIHANI *et al.* (1993b) verificaram que a concentração de amoníaco no inóculo de rúmen, ao fim da primeira hora, era muito mais elevada nos animais que tinham ingerido maior quantidade de ureia (503 mg.l^{-1}) do que nos outros (317 mg.l^{-1}). Ao fim de 6 horas, o NH_3 tinha baixado para valores de 122 mg.l^{-1} e 60 mg.l^{-1} permitindo concluir que, para evitar tão grandes variações, deverá ser utilizada uma fonte de azoto não proteico que seja degradada mais lentamente. Tendo em conta que o acréscimo de PB não trouxe benefícios à digestibilidade da MO nem à produção de ácidos gordos voláteis, os mesmos autores concluíram que 9,5% de PB, incluindo 1,47% de ureia, fornecem uma quantidade suficiente de azoto para favorecer a fermentação ruminal.

A normalização do pH e da concentração de NH_3 ao fim de algumas horas após o início da incubação do substrato poderá explicar as pequenas diferenças não significativas em relação ao volume de gás produzido e à taxa máxima de produção de gás, que ocorreram na segunda fase de fermentação da palha de trigo e do feno de prado natural, com ou sem suplementação

proteica. A utilização de níveis crescentes de PB para os substratos com palha (Pa=50,20, PaU=119,32 e 2PaU=160,09 g.kgMS⁻¹) e para os substratos com feno (F=80,60, FU=119,49 e 2FU=159,96 g.kgMS⁻¹) não provocou variações no volume de gás produzido, nem na taxa máxima de produção de gás da segunda fase.

Vários autores (RANI *et al.*, 1998; RIHANI *et al.*, 1993a; RIHANI *et al.*, 1993b; SAHU *et al.*, 1993) referem que há uma normalização da actividade da população microbiana do rúmen 6, 24 ou mesmo 96 horas após a ocorrência de fenómenos de alcalose. A intensidade e a duração da alcalose influenciam o processo de recuperação da população microbiana do rúmen.

Como seria de esperar, para todos os substratos fermentados, com excepção do 2PaU, o volume total de gás produzido foi condicionado pelo volume de gás produzido na primeira fase. Verificaram-se volumes produzidos sucessivamente decrescentes com o aumento da quantidade de ureia utilizada como suplemento da palha e do feno. Quando se utilizou feno de prado natural e palha de trigo com uma quantidade de ureia para 16% de PB, o volume total de gás produzido foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado com os valores obtidos para os respectivos alimentos forrageiros sem suplementos. Os nossos resultados não estão de acordo com os valores obtidos por DATT e SINGH (1995). Estes autores avaliaram a produção de gás da palha de trigo (3,39% PB) suplementada com quantidades crescentes de farinha de amendoim (47,04% PB), de forma a que o suplemento proteico fosse utilizado de 0 a 15% em relação ao total de matéria seca do substrato. Determinaram correlações positivas elevadas entre o teor em PB do substrato e o volume de gás acumulado durante 48 horas, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. Pensamos que estes resultados foram uma consequência do suplemento proteico utilizado que, para além de ter uma quantidade de energia metabolizável elevada (13,7 MJ.kgMS⁻¹), contém azoto proteico que apresenta uma degradabilidade inferior à da ureia.

Outros autores também têm verificado o efeito positivo que a suplementação azotada tem na digestão ruminal. KROOP *et al.* (1977) verificaram que as digestibilidades da matéria seca, da matéria orgânica e da

celulose aumentavam com a adição de ureia até ao nível de 8,5% de PB. De realçar que a quantidade de ureia com que trabalhamos foi muito superior, permitindo níveis de 12 e 16% de PB no substrato. Por sua vez, ADAMU *et al.* (1988) verificaram um acréscimo da digestibilidade da MO, do NDF, do ADF e da celulose da silagem de milho, após a adição de ureia à dieta base como forma de aumentar o seu teor em PB de 8,7 para 12,3%. No entanto, neste caso a dieta base foi constituída por silagem de milho, um alimento forrageiro muito energético e rico em glúcidos facilmente fermentescíveis no rúmen.

STRITZLER *et al.* (1992) constataram que a utilização, como suplemento, de outras fonte proteicas com degradabilidade ruminal muito mais baixa do que a ureia, obrigava a aumentar o teor em PB do regime alimentar para 14%. Ao utilizar farinha de peixe com 50% de degradabilidade como suplemento proteico de 8% até 14% de PB, detectaram um efeito favorável na digestibilidade da palha de cevada. A farinha de peixe originou também um aumento na quantidade média de NH_3 presente no rúmen, um aumento na produção total de ácidos gordos voláteis, um aumento na actividade da população microbiana traduzindo-se numa maior quantidade de biomassa bacteriana e de protozoários existentes.

ERDMAN *et al.* (1986) sugere que a concentração de amoníaco necessária para uma óptima digestão dos alimentos no rúmen não é um valor constante, mas é variável em função da degradabilidade da proteína alimentar e da fermentescibilidade dos hidratos de carbono ingeridos pelo animal, o que pode explicar a disparidade de valores referidos na bibliografia para concentrações ideais de NH_3 . Os valores mais citados para a concentração de NH_3 no líquido ruminal como níveis óptimos, potenciadores da fermentação ruminal de alimentos fibrosos, variam entre 50 mg.l^{-1} e 235 mg.l^{-1} (STRITZLER *et al.*, 1998; MEHREZ *et al.*, 1977).

MALES *et al.* (1981) demonstraram que o acréscimo do nível proteico de um regime alimentar à base de forragem, de 8 para 11%, aumentava as digestibilidades da matéria seca de 45,4% para 48,5%, da celulose de 49,7% para 55,1% e da hemicelulose de 45,4% para 48,5%. PRITCHARD e MALES (1985) obtiveram um aumento significativo na digestibilidade da matéria seca da palha de trigo utilizada na alimentação de bovinos com um suplemento

proteico, quando este passou de 10 para 12% de PB. STRITZLER *et al.* (1998), obtiveram resultados idênticos ao aumentar o teor em PB do regime alimentar de 8 para 14% tendo verificado aumentos nas digestibilidades da matéria seca de 37,7% para 40,9%, da celulose de 44,4% para 48,0% e da hemicelulose de 42,1% para 50,8%. Resultados semelhantes foram também obtidos por WIEDMEIER *et al.* (1983), KROPP *et al.* (1977) e FICK *et al.* (1973).

No entanto, é necessário ter cuidado com a interpretação destes resultados uma vez que a degradabilidade ruminal da proteína é um parâmetro crucial para avaliar o balanço proteico do rúmen (MADSEN, 1985) e a utilização de diferentes tipos e quantidades de suplemento proteico provoca diferentes alterações no pH ruminal.

A utilização de um suplemento alimentar rico em glúcidos rapidamente fermentescíveis constitui uma das formas de permitir o aproveitamento pela população microbiana do rúmen, do NH₃ resultante da rápida hidrólise da ureia.

Ao adicionarmos polpa de citrinos desidratada (40% da matéria seca da amostra) aos substratos contendo feno (FUP e 2FUP) e contendo palha (PaUP e 2PaUP), verificámos sempre um efeito favorável na cinética da fermentação *in vitro*.

Quando o alimento forrageiro foi a palha de trigo, a adição de polpa de citrinos provocou sempre um aumento significativo ($P < 0,05$) da taxa máxima de produção de gás na primeira fase, um aumento do volume de gás produzido durante a primeira fase de fermentação e uma diminuição do tempo de latência ($P < 0,05$), quando comparado com os resultados obtidos para os substratos constituídos por palha+ureia para 12% e 16% de PB (Quadro 6.4). O volume de gás produzido na primeira fase passou de 7,0 ml.gMO⁻¹ no PaU (3,5% do total de gás produzido) para 47,7 ml.gMO⁻¹ no PaUP (18,3% do total de gás produzido). Esse aumento foi ainda mais evidente para o substrato com 16% de PB, uma vez que a utilização da polpa de citrinos permitiu passar de uma produção de gás praticamente nula na primeira fase para uma produção de 42,5 ml.gMO⁻¹ no 2PaUP, correspondendo a 17,1% do total de gás produzido durante as 96 horas de fermentação. A utilização da polpa de citrinos também provocou uma redução do tempo de latência que baixou de forma significativa ($P < 0,05$), passando de 10 – 13 h para valores da ordem de 3,3 h.

O volume de gás produzido na segunda fase de fermentação dos substratos PaUP e 2PaUP, aumentou em relação aos substratos sem polpa de citrinos, sendo significativamente maior ($P < 0,05$) em relação à produção de gás do PaU. Embora o efeito da adição da polpa de citrinos tenha sido mais evidente na primeira fase de fermentação, indicando a presença de maior quantidade de glúcidos facilmente fermentescíveis (Figura 6.6), é um facto que também contribuiu para aumentar ligeiramente a produção de gás na segunda fase (Figura 6.7) e, conseqüentemente, aumentar o total de gás produzido durante o período de incubação (Figura 6.5).

A quantidade de ureia utilizada 3,70% (2PaUP) e 2,28% (PaUP) não afectou significativamente os parâmetros relativos à produção de gás na primeira fase, embora o volume de gás produzido pelo substrato 2PaUP fosse menor ($-5,2 \text{ ml.gMO}^{-1}$) do que o valor obtido para o substrato PaUP. Efeito idêntico ocorreu em relação à taxa máxima de produção de gás da primeira fase que baixou de $11,2 \text{ ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no PaUP para $10,1 \text{ ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Quadro 6.4). Em termos globais podemos dizer que a polpa de citrinos contribuiu para melhorar os parâmetros referentes à produção de gás na primeira fase, e o aumento do teor em proteína do substrato, de 12% para 16%, provocou uma ligeira diminuição nos valores determinados.

Também quando o alimento forrageiro utilizado foi o feno de prado natural ao qual foi adicionada polpa de citrinos, a quantidade de ureia utilizada no substrato 2FUP (3,07%) e no substrato FUP (1,64%) parece não ter afectado os parâmetros relativos à produção de gás na primeira fase. No entanto, tal como aconteceu com a palha, o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação não foi significativamente inferior no substrato 2FUP ($78,5 \text{ ml.gMO}^{-1}$) quando comparado com o substrato FUP ($84,5 \text{ ml.gMO}^{-1}$).

A utilização da polpa de citrinos aumentou de forma acentuada a proporção do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação em relação ao total de gás produzido durante 96 horas. Quando o feno foi utilizado sem a adição da polpa de citrinos, a produção de gás na primeira fase correspondeu a valores que variaram de 10,1% no 2FUP a 13,8% no F. A

utilização do subproduto alterou substancialmente aqueles valores que passaram a variar entre 33,2% no 2FUP e 34,9% no FUP.

Contrariamente ao que aconteceu com a palha de trigo, não se verificaram diferenças significativas em relação à taxa máxima de produção de gás e ao volume de gás produzido na segunda fase de fermentação (Figura 6.3), quando o feno de prado natural foi utilizado com e sem polpa de citrinos. No entanto, o volume total de gás produzido durante o período de incubação de 96 horas foi muito maior ($P < 0,05$) ($+60 \text{ ml.gMO}^{-1}$) nos substratos em que se adicionou polpa de citrinos ao feno mais ureia (Figura 6.1). De acordo com os nossos resultados, a polpa de citrinos, rica em glúcidos estruturais facilmente hidrolisáveis pela população microbiana do rúmen, provoca um aumento do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação *in vitro*, quando se utiliza a palha de trigo ou o feno de prado natural mais ureia, para teores de PB de 12 e 16%.

O volume de gás produzido e a taxa máxima de produção de gás em períodos longos de incubação com inóculo de rúmen, podem ser utilizados para avaliar o potencial de crescimento microbiano de alimentos forrageiros. Verifica-se uma correlação positiva elevada entre o volume de gás produzido e o crescimento bacteriano quando o substrato é o amido ou a celulose ou uma mistura de hidratos de carbono (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1991). Para o amido, para a celulose e para uma mistura de hidratos de carbono, verifica-se que a população bacteriana cresce linearmente com o aumento da produção de gás. Verifica-se também que a relação entre o crescimento microbiano total e a produção de gás é curvilínea, reflectindo elevada síntese por unidade de volume de gás produzido, a taxas mais elevadas de produção de gás (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1991). Isto permitiu avaliar o potencial de crescimento microbiano total de alimentos forrageiros. No entanto a produção acumulada de gás dos alimentos forrageiros com composição química variada, como indicador potencial do crescimento microbiano, deve ser considerada apenas quando a composição das forragens e a sua produção de gás é conhecida ou quando são avaliados alimentos forrageiros de composição química semelhante (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1991).

No entanto, outros autores (BLÜMMEL *et al.*, 1997a; BLÜMMEL e BULLERDIECK, 1997; MAKKAR *et al.*, 1995; BLÜMMEL, 1994; BLÜMMEL, 1992) têm vindo a afirmar poder existir uma correlação negativa entre as quantidades de ácidos gordos voláteis e de biomassa bacteriana produzidos, principalmente quando aqueles valores estão relacionados com a unidade de substrato efectivamente degradado.

BARRIOS URDANETA *et al.* (1999), trabalhando com ovelhas de raça Aragonesa em lactação, utilizaram polpa de citrinos e cevada em grão como suplemento de regimes alimentares à base de palha de cevada tratada com amoníaco. Verificaram que a digestibilidade da matéria orgânica aumentou quatro vezes mais com a inclusão da polpa de citrinos na dieta. Embora a composição do leite não tenha sofrido alterações, o volume produzido, o ganho médio diário dos borregos, a excreção diária de alantoína na urina das ovelhas e a eficiência da síntese microbiana tenderam a diminuir com o acréscimo da polpa de citrinos no regime alimentar. Concluíram que a polpa de citrinos pode ser utilizada na alimentação de ovelhas em lactação, desde que suplementada com uma fonte proteica que evite o efeito negativo da falta de proteína daquele subproduto, na produção de leite.

RIHANI *et al.* (1993a), ao utilizarem regimes alimentares isoproteicos (11,25% PB) constituídos por feno (43% da MS) e em que a polpa de citrinos (polpa tratada previamente com ureia ou com amoníaco, polpa+ureia e polpa+favas) foi utilizada à razão de 45% do total da matéria seca ingerida por ovinos, verificaram que a digestão ruminal da matéria orgânica do regime alimentar foi maior quando se utilizou polpa+ureia (69,5%) em comparação com as outras formas de enriquecimento da polpa em azoto proteico e não proteico. No entanto, a síntese de azoto microbiano, a absorção de azoto, a retenção de azoto e a eficiência microbiana foram significativamente maiores quando se utilizou polpa tratada previamente com ureia. Ao analisarem o crescimento dos borregos, verificaram que a dieta suplementada com polpa+ureia permitiu ganhos de peso significativamente maiores. Concluíram que o tratamento da polpa de citrinos com ureia parece ser um método seguro de enriquecer a polpa com azoto não proteico, não alterando a taxa de libertação de amónia no rúmen, permitindo mesmo uma utilização mais

eficiente do azoto (fluxo de azoto não amoniacal para o intestino / azoto ingerido) em comparação com a suplementação directa com a ureia. No entanto, este aspecto não teve reflexos no crescimento dos borregos. De acordo com os mesmos autores, o tratamento prévio da polpa com ureia em comparação com a adição de ureia ao alimento, parece ser vantajosa apenas em regimes alimentares em que o azoto é factor limitante ao crescimento.

No nosso trabalho, verificámos que a utilização de polpa de citrinos como suplemento de regimes alimentares com 12,04% de PB, à base de feno e de palha evidenciou melhores resultados do que quando o teor em PB foi aumentado para 16,04%, confirmando os resultados obtidos por BARRIOS URDANETA *et al.* (1999) e RIHANI *et al.* (1993a).

Com o objectivo de investigar a extensão da digestão dos glúcidos estruturais e dos glúcidos citoplásmicos de diferentes sub-produtos TANIGUCHI *et al.* (1999), utilizaram novilhos Holstein que receberam regimes alimentares diferentes à base de sub-produtos como a polpa de beterraba, a polpa de citrinos e a casca de soja. Os novilhos utilizados tiveram uma ingestão semelhante de energia digestível nas dietas controlo ($74,9 \text{ MJ.dia}^{-1}$) e com polpa de beterraba ($75,8 \text{ MJ.dia}^{-1}$) ou cascas de soja ($75,9 \text{ MJ.dia}^{-1}$) recebendo ligeiramente menos energia digestível na dieta com polpa de citrinos ($70,7 \text{ MJ.dia}^{-1}$). No entanto, a quantidade de hidratos de carbono totais digeridos no rúmen foi menor para a dieta controlo e para as cascas de soja do que para a dieta com polpa de beterraba e o fluxo duodenal de proteína microbiana foi maior para a polpa de citrinos (65 g.dia^{-1}) e para a polpa de beterraba (65 g.dia^{-1}) do que para a dieta controlo (52 g.dia^{-1}). Estes resultados indicam que o fluxo de proteína microbiana para o duodeno está mais relacionado com a digestão ruminal dos hidratos de carbono totais, do que com a ingestão de energia digestível. Embora a eficiência de síntese da proteína microbiana tenha sido mais elevada quando se utilizou polpa de citrinos ($22,4 \text{ g N microbiano.kgMO}^{-1}$ digerida no rúmen), foi baixa em todas as dietas o que pode estar relacionado com o baixo nível de matéria seca ingerida pelos novilhos durante o estudo. O regime alimentar também influenciou a concentração de ácidos gordos voláteis no fluído ruminal sendo maior nos animais que

consumiram os sub-produtos (115 a 128 mmol.l⁻¹) quando comparado com a dieta padrão (84 mmol.l⁻¹).

Ao estudarem o efeito da substituição parcial da silagem de milho por polpa de citrinos e por farinha de milho em regimes alimentares para vacas leiteiras, ROCHA FILHO *et al.* (1999) verificaram que a produção de ácido acético foi sempre maior em dietas contendo polpa de citrinos. A produção de ácido propiónico aumentou em regimes alimentares contendo polpa de citrinos mais farinha de milho e a produção de ácido butírico foi maior em regimes alimentares com 23% de polpa de citrinos quando comparado com dietas com apenas 12% de polpa de citrinos ou com 23% de milho. No entanto, a quantidade total de ácidos gordos voláteis não foi diferente para os diferentes níveis de utilização da polpa de citrinos e da farinha de milho. A proporção molar acetato/propionato baixou quando a farinha de milho foi incluída na dieta com e sem polpa de citrinos. Os resultados sugerem que a polpa de citrinos pode substituir o alimento forrageiro provocando alterações desejáveis no ecossistema ruminal. Indicam também que a farinha de milho, utilizada como suplemento de elevada concentração energética, provoca uma alteração na fermentação ruminal típica dos alimentos concentrados. O amido e os açúcares são rapidamente fermentados no rúmen dando origem a uma redução do pH ruminal o que pode provocar a diminuição da ingestão e da digestibilidade de alimentos forrageiros. A utilização de subprodutos que tenham uma elevada concentração energética mas uma pequena quantidade de amido, provoca menores efeitos negativos na ingestão de matéria seca e na digestibilidade da forragem, permitindo melhores resultados produtivos em vacas leiteiras e em novilhos de engorda intensiva. Em situações em que há necessidade de complementar o alimento forrageiro, a utilização de suplementos de elevada digestibilidade como o bagaço de soja, o farelo de trigo ou a polpa de citrinos, comparada com um suplemento à base de produtos ricos em amido tal como o milho grão, parece ser mais vantajosa mantendo o mesmo nível produtivo.

No nosso trabalho também analisámos o efeito da adição de ureia à polpa de citrinos, sem qualquer alimento forrageiro. Da análise do Quadro 6.5 verifica-se que a polpa de citrinos com suplementos de ureia de 1,95% (UP) e de 3,37% (2UP), apresentou uma taxa máxima e um volume de produção de

gás na primeira fase de fermentação muito superior aos valores correspondentes, determinados para a segunda fase de fermentação (Figura 6.9). Verifica-se que a contribuição do volume de gás produzido na primeira fase corresponde, nos dois casos, a valores da ordem dos 60% e que a correlação entre o V_{FA} e o V é positiva e elevada ($r=0,780$; $P<0,05$). Estes aspectos, aliados ao baixo tempo de latência que variou entre 0,8 h (UP) e 1,9 h (2UP) leva-nos a afirmar que a polpa de citrinos, um alimento com elevada concentração energética $12,6 \text{ MJ.kgMS}^{-1}$ (CHAMBERLAIN e WILKINSON, 1996), permite conciliar a elevada taxa de fermentação da polpa (energia) com a rápida produção de NH_3 .

A produção total de gás durante o período de 96 horas de incubação foi significativamente maior ($P<0,01$) quando se utilizou polpa de citrinos mais ureia para 12% de PB. Também neste caso, e à semelhança do que aconteceu quando se utilizou a palha e o feno com suplementos de polpa de citrinos e ureia, a adição de maior quantidade de ureia provocou uma diminuição no V_{FA} , no μ_{mA} , no V_{FB} , no μ_{mB} e no V . O volume de gás produzido na primeira fase de fermentação está relacionado com a degradação da fracção solúvel e facilmente fermentescível dos alimentos. A segunda fase de fermentação está directamente associada à degradação da parede vegetal com capacidade fermentativa limitada.

Como o substrato utilizado é constituído por polpa de citrinos mais ureia, polpa rica em pectinas e outros glúcidos solúveis, a produção de gás resume-se quase exclusivamente à primeira fase (mais de 60% do total). A ureia disponível é facilmente hidrolisada havendo a libertação de NH_3 que é rapidamente utilizado pela população microbiana do rúmen para a síntese de proteína microbiana. JOHNSON (1976), refere que a sincronização entre o excesso de amoníaco e a disponibilidade de energia no rúmen permite aumentar a eficiência microbiana em relação à utilização do NH_3 , melhorando os resultados produtivos dos animais.

Tendo em conta que o volume de gás produzido durante a fermentação do substrato é indicador da actividade da população microbiana do rúmen (MENKE *et al.*, 1979), podemos afirmar que a adição de 3,37% de ureia à polpa

de citrinos provocou uma diminuição da actividade microbiana, não só na primeira fase como no período total de incubação.

6.5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem-nos confirmar que a utilização de uma fonte de azoto não proteico como a ureia, na alimentação de ruminantes, deve ser encarada com algum cuidado. Ao adicionarmos ureia ao feno de prado natural e à palha de trigo, os resultados obtidos para os diferentes parâmetros, após a aplicação do modelo logístico de duas fases, foram afectados negativamente, quando comparados com os alimentos forrageiros sem suplemento. A adição de ureia terá provocado um rápido e acentuado aumento do NH_3 e um aumento do pH para valores que terão afectado a actividade da população microbiana do rúmen, aumentando o tempo de latência e diminuindo a importância que a quantidade de gás produzido na primeira fase de fermentação teve, em relação ao total produzido. Consideramos mesmo a hipótese de terem ocorrido situações de alcalose com os substratos em que se elevou a proteína bruta para 16%.

A utilização da polpa de citrinos, provocou um aumento da produção total de gás, reflectindo uma maior actividade microbiana durante o período de incubação. Causou um acréscimo da produção de gás na primeira fase de fermentação e uma redução no tempo de latência. Estas ocorrências reflectem o efeito favorável que aquele subproduto teve na fase inicial de incubação. As pectinas e outros glúcidos facilmente fermentescíveis presentes na polpa sofreram rápida degradação, acompanhando no tempo a rápida hidrólise da ureia, permitindo um eficaz aproveitamento do NH_3 pela população microbiana do rúmen. Com este suplemento terá sido possível evitar variações acentuadas do pH, causadoras de uma diminuição da actividade microbiana.

Nas circunstâncias em que trabalhamos, não considerámos vantajosa a utilização de ureia como único suplemento do feno de prado natural e da palha de trigo.

A utilização da polpa de citrinos desidratada, suplementada apenas com ureia para 12% e 16% de PB, permitiu confirmar que este suplemento, embora tendo pouco amido e outros glúcidos citoplásmicos, sofreu uma rápida fermentação no início do período de incubação tendo-se obtido também uma taxa máxima de produção de gás muito elevada. Este aumento da produção de gás é reflexo da disponibilidade de energia e de azoto fermentescíveis e de outros nutrientes necessários para a multiplicação da população microbiana. O que atrás foi referido, associado ao muito baixo tempo de latência determinado, permite-nos concluir que mesmo sem alimento forrageiro, a polpa de citrinos não terá provocado alterações no pH dos substratos de forma a afectar a fermentação ruminal.

Com excepção dos substratos em que apenas utilizámos polpa de citrinos, em todas as outras combinações de alimentos o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação foi inferior aos valores obtidos para a segunda fase. Esta fase de fermentação está associada à degradação da fracção insolúvel com alguma capacidade fermentativa.

Como seria de esperar, a produção de gás na segunda fase de fermentação foi sempre maior nos substratos em que se utilizaram alimentos forrageiros, o que está relacionado com o maior conteúdo em celulose e hemiceluloses, quando comparados com os substratos em que apenas foi utilizada a polpa de citrinos.

Confirma-se, mais uma vez, que a polpa de citrinos desidratada tem potencialidades para ser utilizada na alimentação de ruminantes. Como é um alimento pobre em proteína, consideramos indispensável a sua suplementação com fontes azotadas. A utilização de 1,95% de ureia permite a obtenção de bons resultados a nível de laboratório.

A ureia, como único suplemento azotado de feno e palhas, só deverá ser utilizada se também recorrermos a um suplemento energético, por hipótese a polpa de citrinos. A quantidade de ureia a utilizar deverá ser $\leq 1,64\%$ no caso de feno de prado natural ou $\leq 2,50\%$ no caso de palha de trigo.

6.6 – CONCLUSÕES

A utilização de níveis crescentes de ureia como único suplemento de um feno de prado natural e de uma palha de trigo, provocou uma progressiva diminuição dos valores obtidos para o volume de gás produzido e para a taxa máxima de produção de gás das primeira e segunda fases de fermentação e para o volume total de gás produzido durante as 96 horas de incubação. Pelo contrário, causou um aumento do tempo de latência. O efeito negativo da suplementação azotada foi mais evidente quando se utilizou a palha como alimento fibroso.

A polpa de citrinos desidratada, como suplemento energético do feno e da palha, foi benéfica para os níveis de suplementação azotada utilizados contribuindo para a alteração dos parâmetros que definem o processo fermentativo. Verificou-se um aumento significativo da produção de gás e da taxa máxima de produção de gás da primeira fase de fermentação e do volume total de gás produzido durante o período de incubação. O suplemento energético provocou mesmo uma diminuição significativa do tempo de latência quando se utilizou a palha de trigo como forragem. Em todos os casos, com ou sem ureia e com ou sem polpa de citrinos, o volume de gás produzido na segunda fase de fermentação foi muito superior ao volume de gás produzido na primeira fase.

Quando utilizámos apenas a polpa de citrinos com ureia, verificámos que houve um aumento acentuado da quantidade de gás produzido e da taxa máxima de produção de gás da primeira fase de fermentação e do volume total de gás obtido durante o período de incubação. Quando comparada com os substratos que também incluíram um alimento forrageiro, a polpa de citrinos, para os níveis de suplementação azotada considerados, provocou o aumento da proporção do gás produzido na primeira fase de fermentação em relação ao gás produzido na segunda fase.

“O eterno retorno é uma ideia misteriosa de Nietzsche que, com ela, conseguiu dificultar a vida a não poucos filósofos: pensar que um dia, tudo o que se viveu se há-de repetir outra vez e que essa repetição se há-de repetir ainda uma e outra vez, até ao infinito!”

Milan Kundera, 1988.

CAPÍTULO 7 – A DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E A CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO PELO MÉTODO DA PRODUÇÃO DE GÁS EM ALIMENTOS FIBROSOS

7.1 - INTRODUÇÃO

A análise do valor nutritivo de alimentos para ruminantes implica o conhecimento não só da sua composição química, como também de outros parâmetros relacionados com a utilização digestiva. Durante muitos anos a energia, a proteína e a digestibilidade foram considerados parâmetros essenciais na caracterização dos alimentos forrageiros. Actualmente, devem ser analisados outros parâmetros de modo a caracterizar, de forma conveniente, os alimentos forrageiros utilizados na alimentação de ruminantes com grande capacidade produtiva.

A maior parte das técnicas laboratoriais de rotina destinadas a avaliar *in vitro* a digestibilidade dos alimentos forrageiros, baseiam-se no método de TILLEY e TERRY (1963) e de GOERING e VAN SOEST (1970). Além da digestibilidade, a taxa de degradação das forragens é de crucial importância para manter o óptimo funcionamento do rúmen sendo um parâmetro alimentar importante, na medida em que também influencia a ingestão de matéria seca. Até há algum tempo, a incubação de amostras em sacos de nylon era a técnica

mais utilizada para estimar a taxa de degradação ruminal (MEHREZ e ØRSKOV, 1977). Hoje existem outros métodos, menos trabalhosos e menos dispendiosos, que também permitem avaliar com rigor o processo fermentativo.

A medição da produção de gás para avaliar a taxa de digestão dos alimentos não é uma ideia nova. MCBEE (1953) citado por PELL *et al.* (1993) descreveu um técnica manométrica para estudar a digestão microbiana da celulose e da hemicelulose, um método substancialmente modificado por HUNGATE *et al.* (1955) citado por PELL *et al.* (1993). Ao longo do tempo têm sido introduzidas várias modificações e melhoramentos nos métodos utilizados. Mais recentemente surgiu o método da produção de gás proposto por MENKE *et al.* (1979) com o qual foi possível medir com rigor o volume de gás produzido durante 24 horas de incubação. Desta forma foi possível avaliar o processo dinâmico da fermentação, determinando-se a extensão e a taxa de degradação do substrato incubado com inóculo de rúmen e solução nutritiva tampão.

Muitos grupos de investigação têm vindo a medir o volume de gás, utilizando grandes seringas de vidro (KHAZAAL e ØRSKOV 1994; NSAHLAI *et al.*, 1994) ou sistemas manométricos (WAGHORN e STAFFORD, 1993). Em ambos os casos são necessárias leituras periódicas o que diminui a precisão dos sistemas, afectando as curvas cumulativas de produção de gás que são obtidas com um reduzido número de dados. A capacidade de ajustamento dos resultados obtidos à curva estimada, vai depender do modelo matemático utilizado.

A evolução da técnica tem continuado de tal forma que, com o aparecimento de transdutores de pressão muito sensíveis, foi possível produzir dispositivos automáticos para medição do volume de gás. Estes, associados a equipamentos informáticos, têm vindo a facilitar a obtenção de um grande número de dados (THEODOROU *et al.*, 1994; PELL e SCHOFIELD, 1993; BEUVINK *et al.*, 1992) que são depois sujeitos a sofisticadas análises estatísticas utilizando modelos matemáticos (CONE *et al.*, 1997; GROOT *et al.*, 1996; SCHOFIELD *et al.*, 1994; FRANCE *et al.*, 1993; BEUVINK e KOGUT, 1993) permitindo estimar, com precisão, os parâmetros que descrevem a cinética da fermentação.

A produção de gás *in vitro* está directamente relacionada com a fermentação ruminal permitindo obter informações preciosas sobre a forma

como a população microbiana do rúmen degrada ou não os alimentos forrageiros.

Ao avaliarmos a produção de gás estamos a medir não só o desaparecimento do substrato, quantificando o resíduo após um período de incubação, como também estamos a quantificar produtos resultantes da fermentação como a biomassa microbiana, os ácidos gordos voláteis e o volume de gás. Dependendo do método pelo qual o resíduo da incubação é quantificado, os resíduos consistirão: no substrato não degradado mais a biomassa bacteriana (obtida por ultracentrifugação) após a fermentação (BLÜMMEL, 1992); no substrato não degradado mais alguma biomassa microbiana residual usando o método de TILLEY e TERRY (1963); no substrato não degradado isento de biomassa microbiana utilizando o método de TILLEY e TERRY (1963) com as modificações introduzidas por GOERING e VAN SOEST (1970).

Alguns autores têm afirmado que o volume de gás produzido durante as fermentações *in vitro* tem uma relação directa com a produção de biomassa microbiana (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1991).

No entanto, outros autores têm vindo a demonstrar que o método da produção de gás reflecte apenas a produção de ácidos gordos voláteis e outros gases. Pode existir uma correlação negativa entre a quantidade de ácidos gordos voláteis produzidos e a produção de biomassa bacteriana (NAGA e HARMEYER, 1975), particularmente quando ambas estão relacionadas com a unidade de substrato efectivamente degradado (BLÜMMEL *et al.*, 1997a; BLÜMMEL e BULLERDIECK, 1997; MAKKAR *et al.*, 1995; BLÜMMEL, 1994; BLÜMMEL, 1992). Substratos com proporcionalmente maior volume de gás produzido têm comparativamente menor produção de biomassa microbiana.

BLÜMMEL *et al.* (1997a) sugerem que as determinações da produção de gás sejam complementadas com a correspondente determinação da quantidade de substrato efectivamente degradado *in vitro*, utilizando uma solução detergente neutra no tratamento do resíduo (GOERING e VAN SOEST, 1970). Menor volume de gás produzido por unidade de matéria orgânica efectivamente degradada indica menor produção de ácidos gordos voláteis e

consequentemente maior produção de biomassa microbiana (BLÜMMEL *et al.*, 1997a).

De um modo geral, a determinação do valor nutritivo dos alimentos utilizados no regime alimentar de ruminantes é feita a partir do alimento simples. Vários trabalhos em que a digestibilidade *in vitro* e o método da produção de gás *in vitro* foram utilizados para avaliar a qualidade dos alimentos confirmam isso mesmo (BORBA *et al.*, 2000; RODRIGUES 1999; RODRIGUES *et al.*, 1999; ADESOGAN *et al.*, 1999; ADESOGAN *et al.*, 1998; HALL *et al.*, 1998; RONQUILLO *et al.*, 1998; BLÜMMEL e BULLERDIECK, 1997; CONE *et al.*, 1996; SCHOFIELD e PELL, 1995; KHAZAAL e ØRSKOV 1994; BLÜMMEL e ØRSKOV, 1993; KHAZAAL *et al.*, 1993). No entanto, nos regimes alimentares elaborados para ruminantes, diversos alimentos são incluídos em diferentes proporções. De acordo com WOOD e MANYUCHI (1997), PRASAD *et al.* (1994) e MOSS *et al.*, (1992), o valor nutritivo dos alimentos parece ser aditivo e nos regimes alimentares para ruminantes a avaliação de cada alimento *per si* pode ser enganosa. Um alimento pode influenciar outro em termos de digestibilidade e de utilização do azoto disponível. Por esta razão, alguns autores têm vindo a utilizar o método da produção de gás (THEODOROU *et al.*, 1994) para avaliar a degradação *in vitro* de misturas de alimentos (WOOD e MANYUCHI, 1997) com ou sem suplementos (OTTON e DOREAU, 1996; PRASAD *et al.*, 1994).

Os objectivos deste trabalho foram: avaliar comparativamente os resultados obtidos para a digestibilidade *in vitro* após 48 horas e 96 horas de incubação, avaliar a eficácia do modelo logístico de duas fases na estimativa dos parâmetros que definem a cinética da fermentação *in vitro* de misturas de alimentos e analisar a eficácia do método da produção de gás na estimativa do valor nutritivo de misturas de alimentos, utilizando os conceitos volume de gás produzido e substrato efectivamente degradado.

7.2 – MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizados todos os alimentos referidos em 6.2.1, cuja composição química foi determinada conforme descrito em 6.2.2. A

diferença entre as fracções NDF e ADF, foi utilizada para determinar o teor em hemiceluloses. O teor em celulose foi determinado pela diferença entre as fracções ADF e ADL.

Obteve-se o licor de rúmen dos animais e da forma descrita em 6.2.3. Para a determinação da digestibilidade *in vitro* e para o estudo da cinética de fermentação *in vitro*, utilizou-se uma solução nutritiva tampão elaborada da forma referida em 6.2.4.

Para descrever a cinética de fermentação *in vitro* aplicou-se o modelo logístico de duas fases descrito em 6.2.5.

O tratamento estatístico realizado vem referido em 6.2.6 e as diferentes relações entre os resultados da digestibilidade *in vitro* e os resultados obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética de fermentação *in vitro*, foram avaliadas por análise dos coeficientes de correlação através do método de Pearson por regressão linear simples (STEEL e TORRIE, 1980).

7.2.1 - DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

A digestibilidade *in vitro* das amostras estudadas foi efectuada recorrendo ao método de TILLEY e TERRY (1963) com as alterações introduzidas por GOERING e VAN SOEST (1970), tendo sido utilizada a solução nutritiva tampão já descrita. As incubações foram realizadas em balões de Erlenmeyer de 125 ml, contendo amostras de alimentos com 0,450 g e 40 ml de solução nutritiva tampão. Imediatamente após a adição da solução nutritiva tampão os frascos foram selados com rolhas de borracha equipadas com um sistema de fornecimento constante de CO₂ através de um manómetro de água, uma válvula de Bunsen e um tubo para injeção do licor de rúmen.

A adição dos 10 ml de inóculo de rúmen, foi efectuada depois de estabilizar a pressão do meio de incubação.

Após 48 horas de fermentação procedeu-se à determinação do teor em NDF das amostras. Estes resultados foram ajustados a ensaios de controlo onde se procedeu ao processo de extracção das amostras com a solução de detergente neutro, imediatamente após a incubação com licor de rúmen.

Para cada alimento foram feitas quatro repetições em quatro ensaios realizados em dias diferentes.

7.2.2 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO IN VITRO

A cinética de fermentação foi determinada utilizando o método de produção de gás descrito em 6.2.4 e, após as 96 horas de incubação, foi determinado o teor em NDF do resíduo de todas as amostras (GOERING e VAN SOEST, 1970). A quantidade de substrato efectivamente degradado foi calculada por diferença do peso da matéria seca da amostra para o peso do resíduo, após acção da solução detergente neutra para remover a biomassa microbiana do substrato não degradado (MAKKAR *et al.*, 1995).

7.3 - RESULTADOS

7.3.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS UTILIZADOS

No Quadro 7.1 apresenta-se a composição química dos alimentos utilizados. Com excepção do feno de prado natural (F) e da palha de trigo (Pa), todas as outras amostras resultaram da combinação das forragens com um suplemento energético, a polpa de citrinos desidratada (P), e/ou uma fonte de azoto não proteico, a ureia (U).

Verifica-se que as amostras utilizadas foram muito heterogéneas em termos de composição química. A matéria orgânica variou entre 926,73 ($\pm 3,533$) g.kgMS⁻¹ no alimento 2UP e 956,30 ($\pm 2,205$) g.kgMS⁻¹ no PaU ($P < 0,05$). O teor em proteína bruta também foi muito diferente entre amostras ($P < 0,05$), tendo variado entre 50,20 ($\pm 2,023$) g.kgMS⁻¹ no Pa e 161,31 ($\pm 1,469$) g.kgMS⁻¹ no alimento 2UP. A quantidade dos principais constituintes da parede celular (celulose, hemiceluloses e lenhina) também foi muito diferente entre amostras ($P < 0,05$).

Quadro 7.1 - Composição química dos alimentos utilizados: F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

	MO	PB	NDF	ADF	ADL	H	C
	g.kg MS ⁻¹						
F	941,50 ^{abcd} (±5,911)	80,60 ^a (±2,293)	651,77 ^a (±5,011)	413,25 ^a (±6,217)	61,22 ^a (±2,223)	238,52 ^a (±7,382)	352,02 ^a (±5,633)
FU	952,31 ^{cd} (±2,698)	119,49 ^c (±2,638)	641,00 ^a (±1,892)	388,14 ^d (±2,570)	59,64 ^a (±1,935)	252,86 ^a (±1,351)	328,501 ^d (±3,612)
FUP	941,86 ^{bcd} (±1,881)	120,27 ^c (±2,168)	482,47 ^c (±2,891)	324,48 ^e (±4,333)	39,88 ^d (±2,104)	157,99 ^{cd} (±3,668)	284,59 ^c (±4,501)
2FU	947,89 ^{cd} (±3,304)	159,96 ^d (±0,575)	644,02 ^a (±5,043)	385,60 ^d (±4,525)	58,49 ^{ac} (±1,305)	258,41 ^a (±7,716)	327,10 ^d (±5,571)
2FUP	953,15 ^{cd} (±4,767)	160,72 ^d (±0,607)	469,61 ^c (±8,813)	327,82 ^e (±4,173)	38,27 ^d (±0,527)	141,78 ^c (±12,426)	289,55 ^c (±3,832)
Pa	949,70 ^{cd} (±3,511)	50,20 ^b (±2,023)	893,90 ^f (±17,364)	521,80 ^h (±10,702)	72,80 ^e (±5,093)	372,10 ^g (±25,065)	449,00 ^g (±6,602)
PaU	956,30 ^d (±2,205)	119,32 ^c (±1,236)	799,66 ^e (±6,394)	469,91 ^f (±6,491)	61,092 ^a (±4,597)	329,75 ^f (±8,474)	408,81 ^e (±4,561)
PaUP	943,58 ^{bcd} (±0,831)	120,58 ^c (±1,057)	570,76 ^d (±9,965)	382,61 ^{cd} (±6,103)	52,72 ^c (±1,011)	188,15 ^e (±8,139)	329,89 ^d (±5,968)
2PaU	928,72 ^{ab} (±0,908)	160,06 ^d (±5,457)	810,39 ^e (±4,331)	486,99 ^g (±1,976)	61,18 ^a (±0,968)	323,39 ^f (±3,996)	425,81 ^f (±1,365)
2PaUP	954,76 ^{cd} (±0,140)	160,16 ^d (±0,354)	553,07 ^d (±3,471)	370,80 ^c (±4,692)	43,59 ^d (±0,519)	182,27 ^{de} (±5,098)	327,20 ^d (±4,876)
UP	940,00 ^{abc} (±9,008)	120,80 ^c (±1,731)	206,72 ^b (±2,558)	138,67 ^b (±8,325)	23,27 ^b (±1,902)	68,05 ^b (±7,397)	115,39 ^b (±9,653)
2UP	926,73 ^a (±3,533)	161,31 ^d (±1,469)	213,85 ^b (±4,856)	136,68 ^b (±5,802)	23,07 ^b (±0,650)	77,16 ^b (±10,456)	113,61 ^b (±5,207)

MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; NDF – fibra de detergente neutro; ADF – fibra de detergente ácido; ADL – lenhina de detergente ácido; H – conteúdo em hemiceluloses; C – conteúdo em celulose.

^{a b c d e f g h} – valores da mesma coluna com notações diferentes são significativamente diferentes (P<0,05); ± – desvio padrão.

Com exceção dos alimentos F e Pa, todos os outros foram agrupados em amostras com 12% de PB (FU, FUP, PaU, PaUP e UP) e com 16% de PB (2FU, 2FUP, 2PaU, 2PaUP, 2UP).

Para as duas forragens utilizadas de forma simples ou combinada com a ureia, os componentes da parede celular constituíram a fracção quantitativamente mais importante da MS. Para estes casos o NDF variou entre

641,00 ($\pm 1,892$) g.kgMS⁻¹ no substrato FU e 893,90 ($\pm 17,364$) g.kgMS⁻¹ no alimento Pa (P<0,05), o ADF variou entre 385,60 ($\pm 4,525$) g.kgMS⁻¹ no 2FU e 521,80 ($\pm 10,702$) g.kgMS⁻¹ no substrato Pa (P<0,05) e o ADL variou entre 58,49 ($\pm 1,305$) g.kgMS⁻¹ no substrato 2FU e 72,80 ($\pm 5,093$) g.kgMS⁻¹ no alimento Pa (P<0,05).

Como seria de esperar, a inclusão da polpa de citrinos provocou uma diminuição da quantidade de NDF das amostras, baixando para valores que variaram entre 206,72 ($\pm 2,558$) g.kgMS⁻¹ (UP) e 570,76 ($\pm 9,965$) g.kgMS⁻¹ (PaUP). O ADF e o ADL também diminuíram variando, respectivamente, entre 136,68 ($\pm 5,802$) g.kgMS⁻¹ (2UP) e 382,61 ($\pm 6,103$) g.kgMS⁻¹ (PaUP) e entre 23,07 ($\pm 0,650$) g.kgMS⁻¹ (2UP) e 38,27 ($\pm 0,527$) g.kgMS⁻¹ (2FUP).

Para todos os alimentos utilizados, a quantidade de celulose variou entre 113,61 ($\pm 5,207$) g.kgMS⁻¹ no substrato 2UP e 449,00 ($\pm 6,602$) g.kgMS⁻¹ no substrato Pa (P<0,05) e a quantidade de hemicelulose variou entre 68,05 ($\pm 7,397$) g.kgMS⁻¹ e 372,10 ($\pm 25,065$) g.kgMS⁻¹ respectivamente, nos alimentos UP e Pa (P<0,05).

Confirma-se, portanto, a grande heterogeneidade das amostras com o objectivo de testar a eficácia do método da produção de gás aplicado a alimentos combinados, com composição química muito diferente.

7.3.2 - DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

No Quadro 7.2 apresentam-se os valores determinados para a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF dos 12 alimentos utilizados. A digestibilidade *in vitro* foi determinada após 48 horas (Dig48) e 96 (Dig96) horas de incubação. As amostras com que trabalhamos apresentaram diferenças importantes (P<0,01) em relação à Dig48 e à Dig96 da MS e da fracção NDF, confirmando a grande heterogeneidade dos alimentos utilizados.

A Dig48 da MS variou entre 63,60 ($\pm 0,050$) % no alimento 2FU e 94,66 ($\pm 0,058$) % no UP (P<0,05) e a Dig48 do NDF variou entre 45,80 ($\pm 0,075$) % no substrato 2FU e 83,57 ($\pm 0,254$) % no UP (P<0,05).

A Dig96 da MS variou entre 64,11 ($\pm 1,306$) % no alimento F e 94,24 ($\pm 0,974$) % no substrato 2UP ($P < 0,05$) e a Dig96 do NDF variou entre 46,00 ($\pm 2,005$) % no alimento F e 80,92 ($\pm 4,434$) % no 2UP ($P < 0,05$).

Quadro 7.2 - Resultados da digestibilidade *in vitro* (%) da matéria seca (MS) e dos constituintes celulares (NDF) após 48 horas (Dig48) e 96 horas de incubação (Dig96). (F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB)).

	Dig48 MS	Dig96 MS	P	Dig48 NDF	Dig96 NDF	P
F	66,10 ^a ($\pm 0,548$)	64,11 ^a ($\pm 1,306$)	*	49,05 ^a ($\pm 0,854$)	46,00 ^a ($\pm 2,005$)	*
FU	65,95 ^a ($\pm 0,041$)	64,42 ^a ($\pm 1,559$)	ns	49,36 ^a ($\pm 0,057$)	47,04 ^a ($\pm 2,360$)	ns
FUP	77,67 ^e ($\pm 0,057$)	76,84 ^d ($\pm 2,345$)	ns	56,68 ^c ($\pm 0,111$)	55,01 ^b ($\pm 4,768$)	ns
2FU	63,60 ^b ($\pm 0,050$)	66,21 ^{ab} ($\pm 1,875$)	*	45,80 ^b ($\pm 0,075$)	49,76 ^{ab} ($\pm 2,845$)	*
2FUP	77,58 ^e ($\pm 0,071$)	76,75 ^d ($\pm 0,422$)	**	56,32 ^c ($\pm 0,139$)	54,62 ^b ($\pm 0,856$)	**
Pa	70,53 ^d ($\pm 0,802$)	70,73 ^c ($\pm 1,595$)	ns	66,65 ^f ($\pm 0,915$)	67,49 ^c ($\pm 1,786$)	ns
PaU	68,49 ^c ($\pm 0,034$)	71,92 ^c ($\pm 1,187$)	**	62,54 ^e ($\pm 0,045$)	66,65 ^c ($\pm 1,427$)	**
PaUP	79,22 ^f ($\pm 0,038$)	77,83 ^d ($\pm 1,154$)	ns	66,67 ^f ($\pm 0,057$)	64,34 ^c ($\pm 1,926$)	ns
2PaU	66,25 ^a ($\pm 0,047$)	69,27 ^{bc} ($\pm 1,912$)	*	60,51 ^d ($\pm 0,057$)	64,08 ^c ($\pm 2,258$)	*
2PaUP	80,99 ^g ($\pm 0,010$)	80,10 ^d ($\pm 0,473$)	**	68,35 ^g ($\pm 0,020$)	66,81 ^c ($\pm 0,821$)	**
UP	94,66 ^h ($\pm 0,058$)	93,99 ^e ($\pm 0,193$)	**	83,57 ^h ($\pm 0,254$)	80,66 ^d ($\pm 0,820$)	**
2UP	94,14 ^h ($\pm 0,043$)	94,24 ^e ($\pm 0,974$)	ns	80,47 ⁱ ($\pm 0,202$)	80,92 ^d ($\pm 4,434$)	ns
EPM	0,142	0,699		0,189	1,260	
P	**	**		**	**	

^{a b c d e f g h} – valores da mesma coluna com notações diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$); \pm – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (** $P < 0,01$) (* $P < 0,05$); ns – diferenças não significativas.

Observando o Quadro 7.3 verifica-se que não houve diferenças significativas entre os resultados médios obtidos para a Dig48 e para a Dig96 da MS, respectivamente de 75,43 ($\pm 10,310$) % e 75,53 ($\pm 9,910$) %. Aconteceu o mesmo em relação à digestibilidade da fracção NDF sendo de 62,16 ($\pm 11,465$) % às 48 e de 61,95 ($\pm 11,599$) % às 96 horas de incubação.

Quadro 7.3 – Valores determinados para a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dig48 MS) e da fracção detergente neutra (Dig48 NDF) após 48 horas de incubação e para a digestibilidade após 96 horas de incubação (Dig96 MS) (Dig96 NDF).

	Dig48 MS	Dig96 MS	EPM	P
Digestibilidade (%) (n=48)	75,43 ($\pm 10,310$)	75,53 ($\pm 9,910$)	1,460	ns

	Dig48 NDF	Dig96 NDF	EPM	P
Digestibilidade (%) (n=48)	62,16 ($\pm 11,465$)	61,95 ($\pm 11,599$)	1,665	ns

\pm – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância; ns – diferenças não significativas.

7.3.3 - Cinética de fermentação *in vitro*

No Quadro 7.4 apresentam-se os valores obtidos para os diferentes parâmetros, após a aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* dos diferentes alimentos.

Verifica-se que se obtiveram resultados muito diferentes ($P < 0,01$) em relação a cada um dos parâmetros determinados para os 12 alimentos analisados.

Os valores determinados para o V_{FA} variaram entre 7,0 ($\pm 0,64$) ml.gMO⁻¹ no alimento PaU e 229,6 ($\pm 28,69$) ml.gMO⁻¹ no UP. Para o μ_{mA} variaram entre 4,5 ($\pm 0,43$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ no substrato 2FU e 23,1 ($\pm 2,55$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ no substrato 2UP. O tempo de latência (λ) variou entre 0,8 ($\pm 0,65$) h no alimento UP e 13,7 ($\pm 2,11$) h no alimento 2PaU. Os valores determinados para o V_{FB} variaram entre 133,9 ($\pm 22,91$) ml.gMO⁻¹ no substrato UP e 213,3 ($\pm 4,14$) ml.gMO⁻¹ no alimento PaUP. Para o μ_{mB} os valores determinados variaram entre 3,3 ($\pm 0,91$) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ no alimento UP e 6,0 ml.gMO⁻¹.h⁻¹ nos substratos

2PaU e Pa. O coeficiente de determinação (r^2) variou entre 0,989 ($\pm 0,003$) no substrato 2PaU e 0,998 ($\pm 0,001$) no 2UP.

Quadro 7.4 - Variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação *in vitro* dos diferentes alimentos utilizados (n=48). (F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB)

	$V_{FA(i)}$	$\mu_{mA(i)}$	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	$\mu_{mA}/V_{FA(i)}$	μ_{mB}/V_{FB}	V
F	26,4 ^{abd} ($\pm 3,18$)	7,6 ^{abc} ($\pm 2,38$)	1,7 ^{ab} ($\pm 0,76$)	165,0 ^a ($\pm 2,07$)	3,9 ^{ab} ($\pm 0,28$)	0,994 ^{abc} ($\pm 0,002$)	0,287 ^a ($\pm 0,080$)	0,024 ^{abc} ($\pm 0,002$)	191,4 ^{ac} ($\pm 5,17$)
FU	23,9 ^{abd} ($\pm 2,791$)	5,7 ^{ab} ($\pm 1,61$)	2,2 ^{ab} ($\pm 0,20$)	158,1 ^{ac} ($\pm 5,23$)	3,4 ^a ($\pm 0,40$)	0,991 ^a ($\pm 0,003$)	0,242 ^a ($\pm 0,083$)	0,022 ^a ($\pm 0,003$)	182,0 ^{ab} ($\pm 7,73$)
FUP	84,5 ^e ($\pm 3,02$)	13,4 ^d ($\pm 0,44$)	2,0 ^{ab} ($\pm 0,46$)	157,7 ^{ac} ($\pm 8,04$)	3,5 ^a ($\pm 0,18$)	0,997 ^{bcd} ($\pm 0,001$)	0,159 ^a ($\pm 0,001$)	0,022 ^a ($\pm 0,002$)	242,2 ^e ($\pm 7,35$)
2FU	17,2 ^{ab} ($\pm 2,00$)	4,5 ^a ($\pm 0,43$)	3,4 ^b ($\pm 0,39$)	154,2 ^{abc} ($\pm 5,28$)	3,3 ^a ($\pm 0,40$)	0,990 ^a ($\pm 0,001$)	0,267 ^a ($\pm 0,043$)	0,022 ^a ($\pm 0,003$)	171,5 ^b ($\pm 5,65$)
2FUP	78,5 ^e ($\pm 5,32$)	12,7 ^d ($\pm 1,45$)	1,9 ^{ab} ($\pm 1,68$)	157,6 ^{ac} ($\pm 7,15$)	3,4 ^a ($\pm 0,33$)	0,996 ^{bcd} ($\pm 0,002$)	0,162 ^a ($\pm 0,011$)	0,022 ^a ($\pm 0,002$)	236,1 ^e ($\pm 7,60$)
Pa	13,0 ^a ($\pm 2,16$)	9,5 ^{bcd} ($\pm 2,32$)	10,0 ^c ($\pm 0,82$)	204,7 ^d ($\pm 10,44$)	6,0 ^d ($\pm 0,24$)	0,993 ^{ab} ($\pm 0,002$)	0,756 ^b ($\pm 0,258$)	0,030 ^{cd} ($\pm 0,000$)	217,7 ^d ($\pm 9,92$)
PaU	7,0 ^c ($\pm 0,64$)	5,7 ^{ab} ($\pm 0,33$)	11,0 ^c ($\pm 0,14$)	194,4 ^d ($\pm 3,93$)	5,6 ^{cd} ($\pm 0,24$)	0,991 ^a ($\pm 0,002$)	0,816 ^b ($\pm 0,101$)	0,029 ^{bcd} ($\pm 0,001$)	201,5 ^{cd} ($\pm 3,79$)
PaUP	47,7 ^d ($\pm 5,17$)	11,2 ^{cd} ($\pm 1,15$)	3,3 ^b ($\pm 1,02$)	213,3 ^d ($\pm 4,14$)	5,0 ^{cd} ($\pm 0,46$)	0,997 ^{cd} ($\pm 0,001$)	0,236 ^a ($\pm 0,019$)	0,024 ^{ab} ($\pm 0,002$)	261,0 ^f ($\pm 3,71$)
2PaU	-	-	13,7 ^d ($\pm 2,11$)	199,3 ^d ($\pm 8,05$)	6,0 ^d ($\pm 0,10$)	0,989 ^a ($\pm 0,003$)	-	0,030 ^d ($\pm 0,001$)	199,3 ^c ($\pm 8,05$)
2PaUP	42,5 ^{bd} ($\pm 7,52$)	10,1 ^{cd} ($\pm 0,61$)	3,3 ^b ($\pm 0,84$)	206,4 ^d ($\pm 5,15$)	4,9 ^{bc} ($\pm 0,44$)	0,997 ^{bcd} ($\pm 0,001$)	0,243 ^a ($\pm 0,036$)	0,024 ^{ab} ($\pm 0,002$)	248,9 ^{ef} ($\pm 7,42$)
UP	229,6 ^f ($\pm 28,69$)	22,1 ^e ($\pm 1,84$)	0,8 ^a ($\pm 0,65$)	133,9 ^b ($\pm 22,91$)	3,3 ^a ($\pm 0,91$)	0,996 ^{bcd} ($\pm 0,002$)	0,098 ^a ($\pm 0,017$)	0,024 ^{abc} ($\pm 0,004$)	363,5 ^h ($\pm 9,42$)
2UP	205,4 ^f ($\pm 16,46$)	23,1 ^e ($\pm 2,55$)	1,9 ^{ab} ($\pm 0,66$)	137,1 ^{bc} ($\pm 12,24$)	3,6 ^a ($\pm 0,57$)	0,998 ^d ($\pm 0,001$)	0,112 ^a ($\pm 0,005$)	0,026 ^{abcd} ($\pm 0,002$)	342,6 ^g ($\pm 4,22$)
EPM	7,51	1,12	0,69	6,71	0,30	0,001	0,065	0,002	4,93
P	**	**	**	**	**	**	**	**	**

a b c d e f – valores com notações diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05); \pm – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (** P<0,01); (i) n=44.

Em relação à taxa específica de digestão da primeira fase de fermentação (μ_{mA}/V_{FA}) o alimento UP ($0,098 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$) foi o que apresentou

um valor mais baixo e o mais elevado foi obtido pelo alimento Pa ($0,816 \pm 0,101 \text{ h}^{-1}$). Já em relação ao parâmetro μ_{mB}/V_{FB} o valor mínimo ($0,022 \text{ h}^{-1}$) foi igual em vários alimentos e o valor mais elevado ($0,030 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) foi obtido pelo substrato 2PaU. A produção total de gás durante as 96 horas de incubação (V) foi mais elevada no substrato UP com $363,5 (\pm 9,42) \text{ ml.gMO}^{-1}$ e mais baixa na alimento 2FU com $171,5 (\pm 5,65) \text{ ml.gMO}^{-1}$.

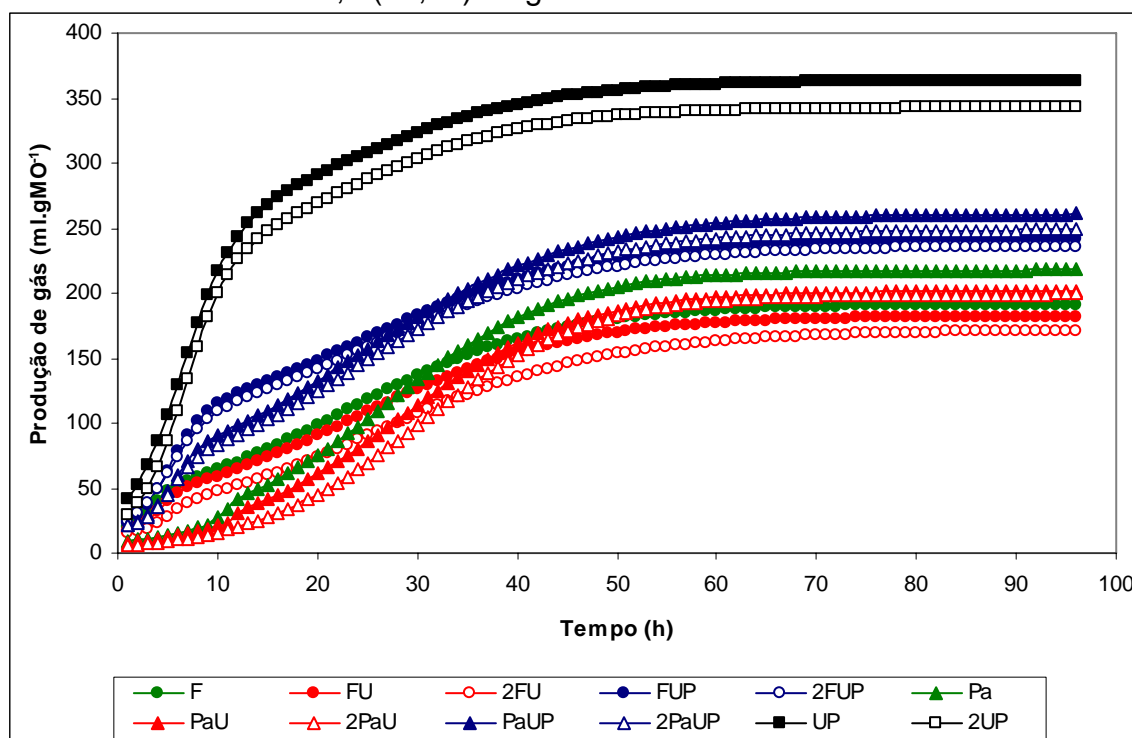


Figura 7.1 - Curvas da cinética de fermentação dos alimentos utilizados: F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

Consultando o Quadro 7.4, verifica-se que o volume de gás produzido na primeira fase da fermentação do alimento Pa foi de $13,0 (\pm 2,16) \text{ ml.gMO}^{-1}$. Esta quantidade muito baixa, diminuiu ainda mais para o PaU ($7,0 \pm 0,64) \text{ ml.gMO}^{-1}$ ($P < 0,05$) não sendo mesmo possível determinar qualquer valor que definisse o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação da palha+ureia com 16% de PB (2PaU). Por esta razão foram considerados apenas 44 resultados para os parâmetros que definem a primeira fase de fermentação.

A distribuição dos diferentes valores médios estimados para as curvas de cinética de fermentação dos 12 alimentos está representada nas Figura 7.1, 7.2, 7.3 e 7.4.

Observando a Figura 7.1 e analisando os valores obtidos para a produção total de gás (ml.gMO^{-1}) verificamos que os alimentos utilizados, embora com composição química muito diferente, apresentaram uma distribuição homogênea durante o período de 96 horas de incubação. No entanto, foi evidente a maior produção de gás dos substratos em que foi utilizada a polpa de citrinos como suplemento. Verifica-se também que a menor produção está associada aos substratos em que os alimentos forrageiros foram suplementados com ureia (FU, PaU, 2FU e 2PaU).

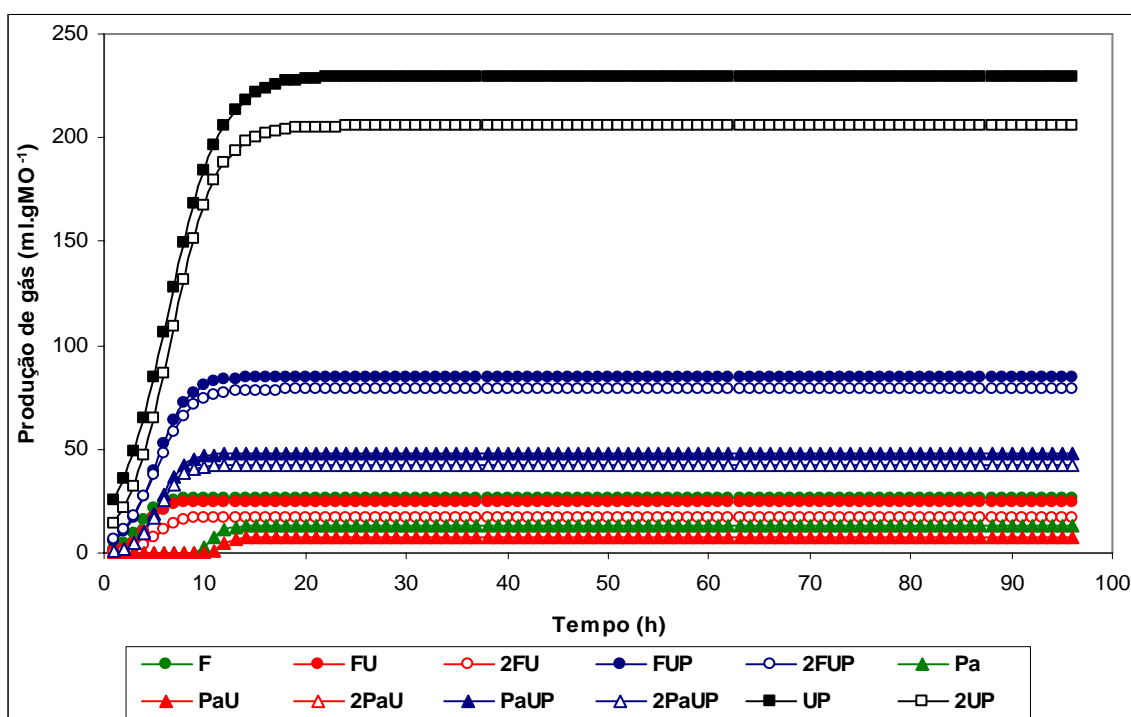


Figura 7.2 - Curvas da produção de gás durante a primeira fase de fermentação dos alimentos utilizados: F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

As Figuras 7.2 e 7.3 representam a produção de gás diferencial (ml.gMO^{-1}) em cada uma das duas fases de fermentação dos alimentos considerados. Verifica-se que, na primeira fase (Figura 7.2), os substratos que atingiram maior volume de gás produzido foram aqueles em que se utilizou

polpa de citrinos como suplemento. Destacam-se os substratos UP e 2UP em que a polpa foi utilizada apenas com ureia.

Pelo contrário, nos casos em que a forragem foi utilizada simples ou suplementada com ureia (F, FU, 2FU, Pa, PaU), a produção de gás foi muito baixa na primeira fase de fermentação. Uma situação extrema ocorreu com a palha de trigo suplementada com ureia (16% PB) (2PaU) em que, após a aplicação do modelo logístico de duas fases, não foi estimada qualquer quantidade de gás na primeira fase de fermentação.

Verificou-se que a produção máxima de gás obtida para os alimentos forrageiros suplementados com polpa de citrinos ocorreu cerca de 2 a 4 horas mais tarde do que quando a polpa não foi utilizada como suplemento. Com estes substratos (F, FU, 2FU, Pa, PaU, 2PaU), a produção máxima de gás ocorreu 9 a 10 horas após o início da incubação.

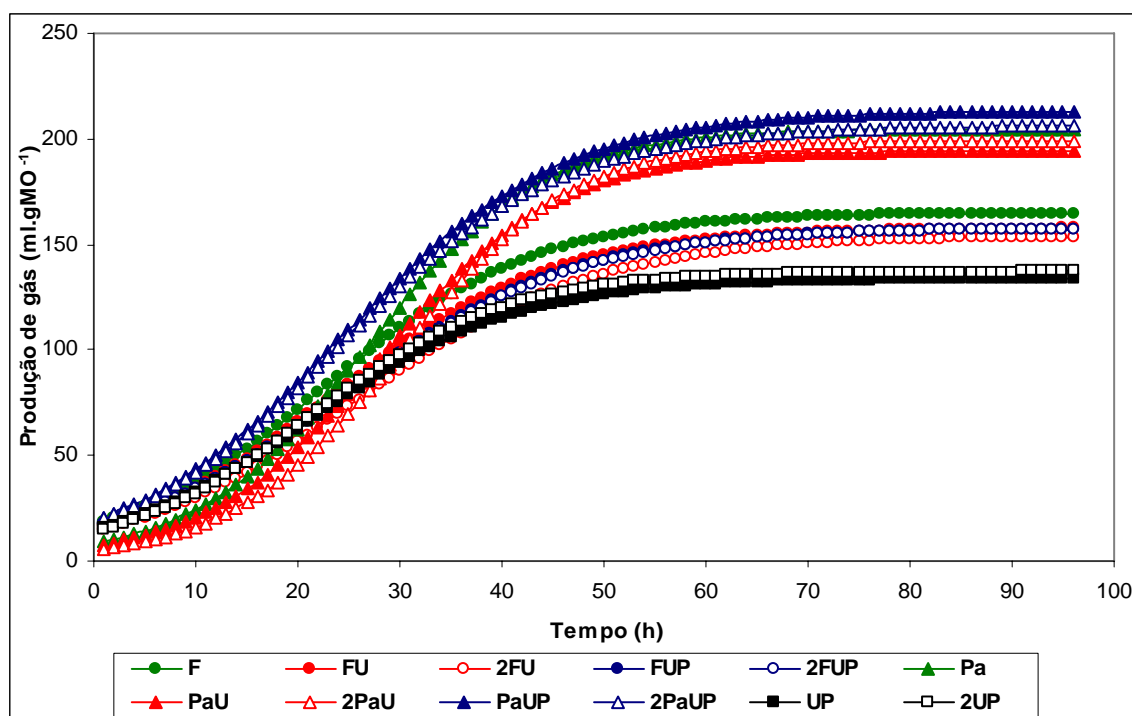


Figura 7.3 - Curvas da produção de gás durante a segunda fase de fermentação dos alimentos utilizados: F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

Na segunda fase de fermentação, houve uma maior homogeneidade na quantidade de gás produzido. Analisando a Figura 7.3, verifica-se que as

curvas definidas após aplicação do modelo logístico de duas fases aos resultados obtidos, são relativamente semelhantes. No entanto, constata-se que houve uma inversão da quantidade de gás produzido por substrato em relação à primeira fase de fermentação. Os alimentos que produziram maior volume de gás na primeira fase de fermentação produziram, correspondentemente, menor quantidade de gás na segunda fase. Os substratos contendo só polpa de citrinos+ureia produziram a menor quantidade de gás na segunda fase. Seguiram-se os substratos em que o feno de prado natural foi utilizado como alimento fibroso, com ou sem suplementação, e aqueles em que se utilizou a palha de trigo como forragem.

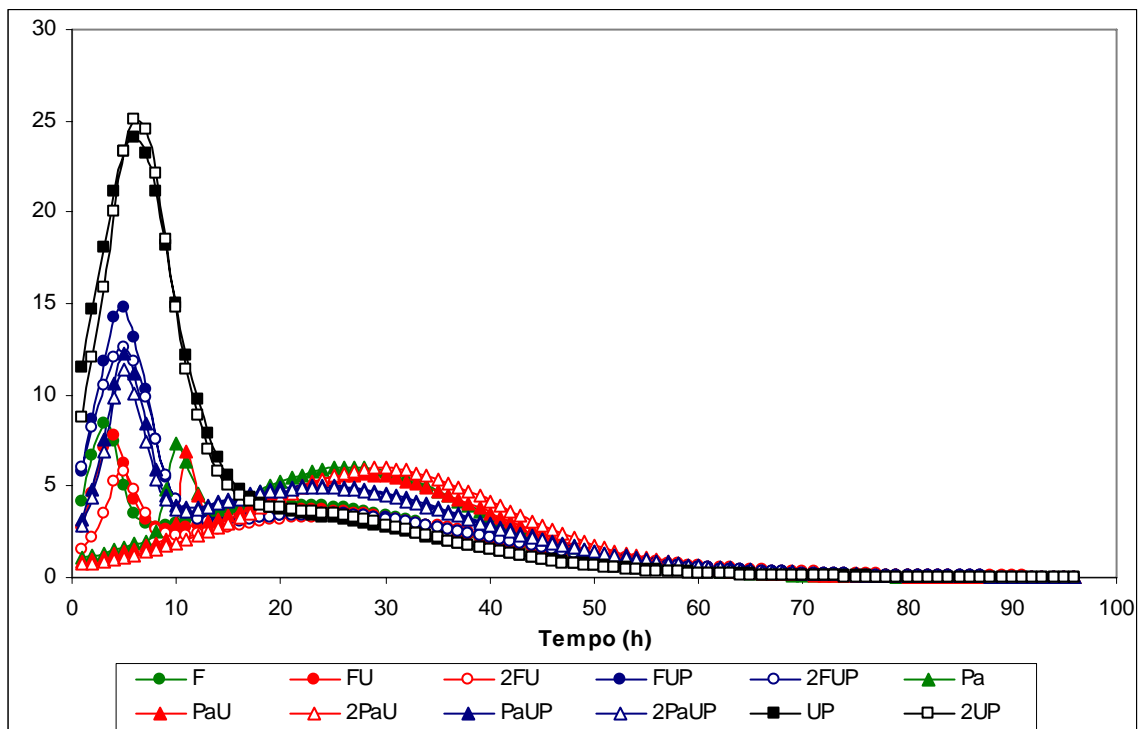


Figura 7.4 - Taxas de fermentação dos alimentos utilizados: F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB).

Verificamos também um desfasamento de cerca de 10 horas entre o momento em que ocorreu o patamar de fermentação dos diferentes alimentos. Nos substratos UP e 2UP o patamar de fermentação ocorreu por volta das 62 horas de incubação. Nos substratos com feno ocorreu por volta das 68 horas e nos substratos com palha de trigo ocorreu após 72 horas de incubação.

Estas ocorrências podem ser confirmadas na Figura 7.4 onde são apresentadas as taxas de fermentação dos doze substratos utilizados.

Na Figura 7.4 constata-se que as taxas máximas de fermentação ocorridas na primeira fase, são muito heterogêneas quando comparadas com as que ocorrem na segunda fase. Destacam-se os substratos em que a polpa de citrinos+ureia foi utilizada só, ou como suplemento dos alimentos forrageiros, onde a taxa de fermentação da primeira fase é muito superior à que ocorre na segunda fase. Pelo contrário, nos substratos FU, 2FU, Pa e PaU a taxa máxima de produção de gás da primeira fase é pouco diferente da que se observa para a segunda fase de fermentação.

7.3.4 - Cinética de fermentação *in vitro* sem resíduo

No Quadro 7.5 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros determinados após a aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* do substrato efectivamente degradado, dos diferentes alimentos considerados.

Também neste caso se obtiveram valores muito diferentes ($P < 0,01$) em relação a cada um dos parâmetros determinados para os 12 alimentos analisados.

Os valores determinados para o V_{FA} variaram entre 11,2 ($\pm 2,77$) ml.gMO^{-1} no alimento PaU e 238,9 ($\pm 30,10$) ml.gMO^{-1} no UP. Para o μ_{mA} variaram entre 9,0 ($\pm 0,84$) $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no substrato FU e 23,9 ($\pm 2,56$) $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no substrato 2UP. O tempo de latência (λ) variou entre 0,8 ($\pm 0,65$) h no alimento UP e 14,0 ($\pm 3,40$) h no alimento 2PaU. Os valores determinados para o V_{FB} variaram entre 139,3 ($\pm 23,72$) ml.gMO^{-1} no substrato UP e 276,1 ($\pm 21,24$) ml.gMO^{-1} no alimento Pa. Para o μ_{mB} os valores determinados variaram entre 3,4 ($\pm 0,94$) $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no alimento UP e 8,4 ($\pm 0,64$) $\text{ml.gMO}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no substrato 2PaU. O coeficiente de determinação (r^2) variou entre 0,959 ($\pm 0,012$) no substrato Pa e 0,998 ($\pm 0,001$) no 2UP. Em relação à taxa específica de digestão da primeira fase de fermentação (μ_{mA}/V_{FA}) o alimento UP ($0,098 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$) foi o que apresentou um valor mais baixo e o mais

elevado foi obtido pelo alimento Pa ($0,537 \pm 0,137 \text{ h}^{-1}$). Já em relação ao parâmetro μ_{mB}/V_{FB} o valor mínimo ($0,020 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$) foi obtido pelo substrato 2FU e o valor mais elevado ($0,031 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) foi obtido pelo substrato 2PaU. A produção total de gás durante as 96 horas de incubação (V) foi mais elevada no substrato UP com $378,2 (\pm 10,19) \text{ ml.gMO}^{-1}$ e mais baixa no alimento 2FU com $249,0 (\pm 10,36) \text{ ml.gMO}^{-1}$.

Quadro 7.5 - Variação dos parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação *in vitro* do substrato efectivamente degradado. (F – feno de prado natural; FU – feno+ureia (12% PB); 2FU - feno+ureia (16% PB); FUP – feno+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2FUP - feno+ureia+polpa de citrinos (16% PB); Pa – palha de trigo; PaU - palha+ureia (12% PB); 2PaU - palha+ureia (16% PB); PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (12% PB); 2PaUP - palha+ureia+polpa de citrinos (16% PB); UP - polpa de citrinos+ureia (12% PB); 2UP - polpa de citrinos+ureia (16% PB)

	$V_{FA(i)}$	$\mu_{mA(i)}$	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	$\mu_{mA}/V_{FA(i)}$	μ_{mB}/V_{FB}	V
F	36,0 ^{abd} (±3,83)	12,4 ^{abc} (±2,25)	2,2 ^a (±0,22)	245,4 ^{ade} (±8,58)	6,1 ^a (±0,48)	0,994 ^{ac} (±0,002)	0,351 ^a (±0,101)	0,025 ^{abcd} (±0,001)	281,4 ^{acd} (±11,80)
FU	31,5 ^{ab} (±3,82)	9,0 ^a (±0,84)	2,5 ^a (±0,58)	236,7 ^{ad} (±14,76)	5,2 ^{ac} (±0,55)	0,992 ^{ac} (±0,001)	0,290 ^{ac} (±0,046)	0,022 ^{ab} (±0,002)	268,2 ^{ab} (±16,74)
FUP	106,0 ^e (±2,35)	16,8 ^d (±0,39)	2,0 ^a (±0,46)	198,1 ^c (±14,29)	4,4 ^{bc} (±0,24)	0,997 ^c (±0,001)	0,159 ^{bc} (±0,001)	0,022 ^{ab} (±0,002)	304,1 ^{de} (±14,78)
2FU	25,6 ^a (±4,91)	9,0 ^a (±1,59)	3,1 ^a (±0,94)	223,3 ^{ac} (±10,51)	4,3 ^{bc} (±0,62)	0,978 ^a (±0,019)	0,366 ^{ad} (±0,105)	0,020 ^a (±0,004)	249,0 ^b (±10,36)
2FUP	98,6 ^e (±6,78)	15,9 ^{cd} (±1,84)	1,9 ^a (±1,68)	198,0 ^c (±8,22)	4,3 ^{bc} (±0,40)	0,996 ^c (±0,002)	0,162 ^{bc} (±0,011)	0,022 ^{ab} (±0,002)	296,7 ^{acde} (±8,73)
Pa	20,9 ^a (±4,72)	10,7 ^{ab} (±0,69)	10,0 ^b (±1,32)	276,1 ^e (±21,24)	8,1 ^e (±0,47)	0,959 ^b (±0,012)	0,537 ^d (±0,137)	0,030 ^{de} (±0,001)	297,1 ^{cde} (±18,12)
PaU	11,2 ^c (±2,77)	9,0 ^a (±1,21)	11,5 ^{bc} (±1,12)	260,6 ^{de} (±9,18)	7,6 ^{de} (±0,34)	0,991 ^{ac} (±0,002)	0,822 ^e (±0,119)	0,030 ^{cde} (±0,000)	271,8 ^{abc} (±8,74)
PaUP	59,30 ^d (±6,22)	13,9 ^{bcd} (±1,29)	3,3 ^a (±1,02)	265,0 ^{de} (±6,55)	6,3 ^{ad} (±0,62)	0,997 ^c (±0,001)	0,236 ^{abc} (±0,019)	0,024 ^{abc} (±0,002)	324,3 ^e (±5,34)
2PaU	-	-	14,0 ^c (±3,40)	272,3 ^e (±13,69)	8,4 ^e (±0,64)	0,990 ^{ac} (±0,003)	-	0,031 ^e (±0,003)	272,3 ^{abc} (±13,69)
2PaUP	53,7 ^{bd} (±5,35)	12,3 ^{abc} (±0,68)	3,3 ^a (±0,84)	250,6 ^{ade} (±5,78)	5,9 ^a (±0,51)	0,997 ^c (±0,001)	0,230 ^{abc} (±0,011)	0,024 ^{abc} (±0,002)	304,3 ^{de} (±6,52)
UP	238,9 ^f (±30,10)	23,0 ^e (±1,92)	0,8 ^d (±0,65)	139,3 ^b (±23,72)	3,4 ^b (±0,94)	0,996 ^c (±0,002)	0,098 ^b (±0,017)	0,024 ^{abcd} (±0,004)	378,2 ^f (±10,19)
2UP	213,0 ^f (±16,39)	23,9 ^e (±2,56)	1,9 ^a (±0,66)	142,2 ^b (±13,10)	3,7 ^b (±0,60)	0,998 ^c (±0,001)	0,112 ^b (±0,005)	0,026 ^{bcdde} (±0,002)	355,3 ^f (±4,28)
EPM	7,912	1,093	0,949	9,593	0,340	0,005	0,051	0,002	8,184
P	**	**	**	**	**	**	**	**	**

a b c d e f – valores com notações diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,05); ± – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (* * P<0,01); (i) – n=44.

Tal como foi referido anteriormente para os resultados constantes do Quadro 7.4, também em relação aos valores apresentados no Quadro 7.5 não foi possível determinar qualquer valor que definisse o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação do substrato 2PaU. Apenas foram considerados 44 resultados para os parâmetros que definem a primeira fase de fermentação do alimento 2PaU.

No Quadro 7.6 apresentam-se os valores médios dos diferentes parâmetros estimados após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética da fermentação *in vitro* do substrato total (ST) e do substrato efectivamente degradado (SED).

Quadro 7.6 - Valores médios dos diferentes parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de fermentação *in vitro* do substrato total (ST) e do substrato efectivamente degradado (SED) (n=48).

	$V_{FA(i)}$	$\mu_{mA(i)}$	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	$\mu_{mA}/V_{FA(i)}$	μ_{mB}/V_{FB}	V
ST	70,5 (±74,89)	11,4 (±6,17)	4,6 (±4,29)	173,5 (±28,62)	4,3 (±1,12)	0,994 (±0,004)	0,307 (±0,250)	0,025 (±0,004)	238,1 (±58,91)
SED	81,3 (±75,67)	14,2 (±5,29)	4,7 (±4,45)	225,6 (±47,24)	5,6 (±1,73)	0,990 (±0,013)	0,306 (±0,216)	0,025 (±0,004)	300,2 (±37,52)
EPM	11,35	0,86	0,63	5,63	0,21	0,001	0,035	0,001	7,12
P	ns	*	ns	**	**	ns	ns	ns	**

± – desvio padrão; EPM – erro padrão da média; P – probabilidade calculada após análise de variância (** P<0,01) (* P<0,05); ns – diferenças não significativas; (i) – n=44.

Os valores determinados para a taxa máxima de produção de gás da primeira fase (μ_{mA}), o volume de gás produzido na segunda fase (V_{FB}), a taxa máxima de produção de gás da segunda fase (μ_{mB}) e o volume total de gás (V) aumentaram significativamente do ST para o SED. Foram respectivamente de 11,4 (±6,17) e 14,2 (±5,29) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ (P<0,05), 173,5 (±28,62) e 225,6 (±47,24) ml.gMO⁻¹ (P<0,01), 4,3 (±1,12) e 5,6 (±1,73) ml.gMO⁻¹.h⁻¹ (P<0,01) e 238,1 (±58,91) e 300,2 (±37,52) ml.gMO⁻¹ (P<0,01).

Os valores determinados para o volume de gás produzido na primeira fase (V_{FA}) e para o tempo de latência (λ) tiveram um aumento não significativo do ST para o SED. Pelo contrário, os valores estimados para o coeficiente de determinação (r^2) e para a taxa específica de digestão da primeira fase

(μ_{mA}/V_{FA}) diminuíram de forma não significativa do ST para o SED. A taxa específica de digestão da segunda fase (μ_{mB}/V_{FB}) não sofreu alteração.

7.4 - DISCUSSÃO

A composição química dos alimentos utilizados é apresentada no Quadro 7.1. Como forragens utilizámos um feno de prado natural e uma palha de trigo. Como suplemento energético utilizámos uma polpa de citrinos desidratada e como suplemento azotado a ureia. Com excepção do feno (F) e da palha (Pa), todos os outros substratos resultaram de misturas de dois ou três alimentos.

A eficácia do método da produção de gás *in vitro* foi assim testada num conjunto de 12 amostras com composição química muito diferente.

Se a quantidade de MO das diferentes amostras pouco variou, todos os outros parâmetros foram muito diferentes. Verificou-se que a quantidade de PB variou entre 50,20 e 161,31 g.kgMS⁻¹ o NDF variou entre 206,72 e 893,90 g.kgMS⁻¹, o ADF variou entre 136,68 e 521,80 g.kgMS⁻¹ e o ADL variou entre 23,07 e 72,80 g.kgMS⁻¹. As quantidades de celulose e de hemicelulose dos substratos utilizados variaram, respectivamente, entre 113,61 e 449,00 g.kgMS⁻¹ e 68,05 e 372,10 g.kgMS⁻¹, confirmando a grande heterogeneidade das amostras.

Na maior parte dos trabalhos que consultámos, a digestibilidade *in vitro* e o método da produção de gás *in vitro* têm sido utilizados para avaliar alimentos simples. No entanto, em termos práticos, os regimes alimentares elaborados para ruminantes incluem diversos alimentos em diferentes proporções.

Alguns autores referem que, nos ruminantes, o valor nutritivo dos alimentos parece ser aditivo. A digestibilidade dos constituintes da parede vegetal pode aumentar quando as dietas contêm nutrientes em quantidade suficiente que estimulam a actividade dos microrganismos do rúmen. Por esta razão, vários autores têm vindo a utilizar o método da produção de gás para avaliar a degradação *in vitro* de misturas de alimentos com ou sem suplementos (WOOD e MANYUCHI, 1997; OTTON e DOREAU, 1996; PRASAD *et al.*, 1994)

7.4.1 - DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Os métodos *in vitro* utilizados para estimar laboratorialmente a degradação dos alimentos para ruminantes são ferramentas importantes para a nutrição animal. Estes métodos permitem medir o desaparecimento do substrato, quantificando o resíduo após um período de incubação. Permitem também determinar os produtos resultantes da fermentação como a biomassa microbiana, os ácidos gordos voláteis e o volume de gás produzido. O resíduo quantificado consistirá no substrato não degradado mais a biomassa bacteriana (obtida por ultracentrifugação) após a fermentação (BLÜMMEL, 1994; BLÜMMEL, 1992), no substrato não degradado mais alguma biomassa microbiana residual (TILLEY e TERRY, 1963) ou no substrato não degradado isento de biomassa microbiana utilizando o método de TILLEY e TERRY com as modificações introduzidas por GOERING e VAN SOEST (1970).

O método utilizado para determinar a digestibilidade *in vitro*, foi recentemente testado por RODRIGUES (1999). Este autor, comparou os resultados obtidos para a digestibilidade *in vitro* de 6 fenos de prado natural e 4 palhas, com os resultados obtidos para a digestibilidade *in vivo* dos mesmos alimentos. Verificou que as equações de regressão obtidas apresentaram um coeficiente de determinação que variou entre 0,897 e 0,850 ($P < 0,01$) com um desvio padrão residual respectivamente de 1,965 e 2,370. A partir destes resultados, concluiu que foi observada uma distribuição homogénea nos diferentes ensaios, o que permitiu inferir da aplicação desta técnica na avaliação da digestibilidade *in vitro* de alimentos para ruminantes.

No Quadro 7.2, apresentam-se os resultados obtidos para a digestibilidade *in vitro* calculada após 48 horas de incubação (Dig48) e para a digestibilidade *in vitro* calculada após 96 horas de incubação (Dig96), da MS e do NDF dos diferentes substratos. A Dig48 da MS e do NDF do feno foi, respectivamente, 66,10% e 49,05%. Estes valores estão muito próximos dos resultados obtidos por RODRIGUES (1999) que, para um total de 6 fenos determinou uma Dig48 média da MS e do NDF, respectivamente de 67,13% e

53,15%. O mesmo autor obteve, para um total de quatro palhas, uma digestibilidade da MS de 65,55% e do NDF 58,55%, valores semelhantes aos obtidos por nós, para a palha de trigo.

O Quadro 7.3 mostra-nos os valores médios encontrados para a Dig48 e Dig96 da MS e do NDF dos doze substratos utilizados, num total de 48 resultados. Foram encontradas diferenças não significativas entre os valores determinados para a Dig48 e Dig96 da MS (75,43 e 75,53%) e para a Dig48 e Dig96 do NDF (62,16 e 61,95%). Os resultados médios obtidos parecem indicar que a Dig48 poderá ser substituída pela Dig96, determinada a partir do resíduo existente, após o período de 96 horas de incubação inerente à utilização do método da produção de gás.

Quadro 7.7 - Coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) ($n=12$) entre a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF das amostras ao fim de 48 horas de incubação (Dig48) e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro*.

	MS				NDF			
	r	r^2	EPM	P	r	r^2	EPM	P
V_{FA}	0,922	0,852	4,302	**	0,741	0,549	8,342	**
μ_{mA}	0,939	0,882	3,840	**	0,744	0,554	8,295	**
λ	-0,467	0,218	9,878	ns	-0,025	0,001	12,418	ns
V_{FB}	-0,380	0,144	10,336	ns	-0,060	0,004	12,399	ns
μ_{mB}	-0,322	0,104	10,576	ns	0,125	0,016	12,324	ns
r^2	0,836	0,700	6,123	**	0,600	0,361	9,933	*
μ_{mA}/V_{FA}	-0,360	0,130	10,419	ns	-0,081	0,006	12,381	ns
μ_{mB}/V_{FB}	-0,108	0,012	11,107	ns	0,352	0,124	11,629	ns
V	0,984	0,969	1,967	**	0,905	0,818	5,295	**

P – probabilidade calculada após análise de variância ** - $P<0,01$; * - $P<0,05$; ns – diferenças não significativas

No entanto, se analisarmos caso a caso os resultados presentes no quadro 7.2, verificamos que, para alguns, há diferenças significativas entre os resultados da digestibilidade *in vitro* obtida após 48 e 96 horas de incubação. Constatámos que para os alimentos F ($P<0,05$), 2FU ($P<0,05$), 2FUP ($P<0,01$), PaU ($P<0,01$), 2PaU ($P<0,05$), 2PaUP ($P<0,01$) e UP ($P<0,01$) houve uma

variação significativa entre a Dig48 e a Dig96, tanto da MS como do NDF. Existindo em 58,3% das amostras diferenças significativas entre os resultados obtidos para a Dig48 e para a Dig96, consideramos que a digestibilidade deverá ser sempre calculada após 48 horas de incubação. Esta opinião foi reforçada após termos determinado as relações existentes entre os parâmetros estimados com base no modelo logístico de duas fases e a digestibilidade da MS e do NDF das amostras ao fim de 48 e 96 horas de incubação. Verificamos que, para todos os casos considerados, os coeficientes de correlação e de determinação foram mais elevados com a Dig48 (Quadros 7.7) do que com a Dig96 (Quadro 7.8). Isto indica-nos uma maior eficácia na interpretação associada de resultados provenientes do método da produção de gás e da digestibilidade *in vitro*, calculada ao fim de 48 horas de incubação. Segundo TILLEY e TERRY (1963), o período de incubação de 48 horas corresponderia ao tempo médio de retenção das forragens no rúmen.

Determinámos coeficientes de correlação elevados entre a Dig48 da MS e o V_{FA} ($r=0,922$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=0,939$; $P<0,01$) e o V ($r=0,984$; $P<0,01$) e entre a Dig48 do NDF e o V_{FA} ($r=0,741$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=0,744$; $P<0,01$) e o V ($r=0,905$; $P<0,01$). Pelo contrário, encontrámos coeficientes de correlação negativos, muito baixos e não significativos entre a Dig48 da MS e o V_{FB} ($r=-0,380$) e o μ_{mB} ($r=-0,322$). Entre a Dig48 do NDF e o V_{FB} e o μ_{mB} não encontrámos qualquer correlação.

Estes resultados sugerem-nos que o aumento da Dig48 da MS e do NDF da amostra influencia, de forma determinante, os parâmetros inerentes à primeira fase de fermentação, tendo pouca influência ou influenciando negativamente os parâmetros associados à segunda fase. Em termos médios e considerando todos os substratos utilizados, verifica-se que o volume de gás produzido na primeira fase corresponde apenas a 22,8% do total de gás produzido durante as 96 horas de incubação. No entanto, a percentagem de gás da primeira fase está positivamente correlacionada com as digestibilidades da MS ($r=0,906$; $P<0,01$) e do NDF ($r=0,647$; $P<0,05$) do substrato. Pelo contrário, a percentagem de gás produzido na segunda fase de fermentação está negativamente correlacionada com a Dig48 da MS ($r=-0,906$; $P<0,01$) e com a Dig48 do NDF ($r=-0,647$; $P<0,05$). Infere-se daqui que, quanto maior for a

digestibilidade da MS e do NDF dos alimentos, maior será a proporção de gás produzido na primeira fase de fermentação em relação ao total de gás. A utilização da polpa de citrinos confirma isso mesmo. Verificou-se um aumento do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação que influenciou o volume total de gás produzido durante o período de incubação. Com a adição de polpa de citrinos aumentou a quantidade de substâncias pécicas que foram rápida e extensamente degradadas (TANIGUCHI *et al.*, 1999; HALL *et al.*, 1998; BEN-GHEDALIA *et al.*, 1989).

Quadro 7.8 - Coeficientes de correlação (r) e de determinação (r²) (n=12) entre a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF das amostras ao fim de 96 horas de incubação (Dig96) e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro*.

	MS				NDF			
	r	r ²	EPM	P	r	r ²	EPM	P
V _{FA}	0,912	0,832	4,368	* *	0,655	0,429	9,321	*
μ _{mA}	0,902	0,814	4,594	* *	0,635	0,404	9,525	* *
λ	-0,353	0,125	9,973	ns	0,146	0,021	12,211	ns
V _{FB}	-0,363	0,132	9,933	ns	-0,006	0,000	12,343	ns
μ _{mB}	-0,255	0,065	10,306	ns	0,234	0,055	12,001	ns
r ²	0,762	0,580	6,908	* *	0,456	0,208	10,985	ns
μ _{mA} /V _{FA}	-0,325	0,105	10,081	ns	0,000	0,000	12,344	ns
μ _{mB} /V _{FB}	-0,020	0,000	10,660	ns	0,490	0,240	10,760	ns
V	0,979	0,958	2,188	* *	0,822	0,676	7,023	* *

P – probabilidade calculada após análise de variância * * - P<0,01; * - P<0,05; ns – diferenças não significativas

De referir que, para alguns substratos considerados, a percentagem de gás produzido na primeira fase foi inferior a 15% (2PaU 0,0%; PaU 3,5%; Pa 6,0%; 2FU 10,0%; FU 13,1% e F 13,7%) do total de gás produzido, enquanto que para outros, onde só existiu polpa de citrinos+ureia, foi superior a 50% (2UP 59,9%; UP 63,1%). Pode-se concluir que substratos com digestibilidade elevada contribuem para o aumento do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação enquanto que alimentos com menor digestibilidade favorecem a produção de gás na segunda fase. A correlação muito elevada entre a Dig48 da MS (r=0,984; P<0,01) e do NDF (r=0,905; P<0,01) com o

volume total de gás produzido durante as 96 horas de incubação permitem-nos ainda concluir que alimentos com maior digestibilidade levam à produção de maior volume total de gás durante as 96 horas de incubação

Quadro 7.9 – Coeficientes de correlação e de determinação entre os constituintes da parede celular e a digestibilidade da MS e do NDF ao fim de 48 (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

	Dig48 MS				Dig48 NDF			
	r	r ²	EPM	P	r	r ²	EPM	P
NDF	-0,867	0,752	5,562	**	-0,549	0,301	10,382	ns
ADF	-0,864	0,746	5,623	**	-0,584	0,341	10,079	*
ADL	-0,901	0,811	4,857	**	-0,622	0,387	9,723	*
Hem	-0,843	0,711	6,007	**	-0,487	0,237	10,847	ns
C	-0,851	0,725	5,864	**	-0,574	0,329	19,174	ns

	Dig96 MS				Dig96 NDF			
	r	r ²	EPM	P	r	r ²	EPM	P
NDF	-0,831	0,690	5,925	**	-0,437	0,191	11,102	ns
ADF	-0,842	0,710	5,738	**	-0,492	0,242	10,749	ns
ADL	-0,889	0,791	4,876	**	-0,535	0,286	10,424	ns
Hem	-0,790	0,624	6,533	**	-0,355	0,126	11,538	ns
C	-0,828	0,686	5,969	**	-0,481	0,231	10,824	ns

Hem – Hemicelulose; C – Celulose; P – probabilidade calculada após análise de variância ** - P<0,01; * - P<0,05; ns – diferenças não significativas.

Além do que atrás foi dito verificámos, também, que os coeficientes de correlação e de determinação calculados entre os constituintes da parede celular e a digestibilidade *in vitro* às 48 e 96 horas de incubação, foram sempre mais elevados quando se relacionaram as quantidades de NDF, ADF, ADL, hemicelulose e celulose das amostras com a Dig48 da MS do que com a Dig96 da MS (Quadro 7.9). Porém, a correlação dos constituintes da parede celular com a Dig48 do NDF e a Dig96 do NDF apresenta coeficientes de determinação muito baixos, não significativos.

Coeficientes de determinação mais elevados para a Dig48 da MS (0,811<r²>0,711) (P<0,01) em todos os casos analisados, suportam as

vantagens da utilização da digestibilidade *in vitro* após 48 horas de fermentação.

A lenhina é um polímero estrutural pelo que, vários autores (RODRIGUES, 1999; WILSON e MERTENS, 1995; ENGELS e SCHURMANS, 1992) têm tentado avaliar o seu efeito sobre a digestibilidade da parede celular. VAN SOEST (1993), atribui à lenhina uma influência directa sobre a digestibilidade da fracção NDF e GIGER-REVERDIN (1995) evidencia as relações negativas existentes entre a lenhina e as digestibilidades da MS e da MO.

No nosso trabalho avaliámos, também, a influência que a fracção ADL da MS dos substratos teve sobre a Dig48 da MS e do NDF (Quadro 7.9). Verificámos que a fracção ADL (g.kgMS^{-1}) apresentou uma maior correlação negativa com a Dig48 da MS ($r=-0,901$; $P<0,01$) do que com a Dig48 da fracção NDF ($r=-0,622$; $P<0,05$).

Os valores que obtivemos não estão totalmente de acordo com os resultados de RODRIGUES (1999) determinados para um conjunto de 6 fenos e 4 palhas. Aquele autor verificou existir um maior grau de associação entre a lenhina e a digestibilidade da MO não encontrando, pelo contrário, qualquer relação significativa entre a digestibilidade da fracção NDF e a % de lenhina.

Os elevados coeficientes de determinação entre a Dig48 da MS e os parâmetros que definem a primeira fase de fermentação (V_{FA} e μ_{mA}) e o volume total de gás produzido durante as 96 horas de incubação (V) (Quadro 7.7), permitem-nos propor a estimativa da Dig48 da MS tendo por base aqueles parâmetros, mediante as seguintes equações de regressão:

$$\text{Dig48 da MS} = 67,08894 + 0,128958 V_{FA} \quad r^2=0,852$$

$$\text{Dig48 da MS} = 59,99272 + 1,470397 \mu_{mA} \quad r^2=0,882$$

$$\text{Dig48 da MS} = 34,18652 + 0,17315 V \quad r^2=0,969$$

MENKE *et al.* (1979), utilizando a sua técnica para medir a produção de gás *in vitro*, determinaram uma correlação muito elevada ($r=0,98$) entre a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica e o volume de gás produzido durante o período de incubação. Idênticos resultados foram obtidos por AREGHEORE e IKHATUA (1999), que utilizaram o mesmo método de produção de

gás para avaliar o valor nutritivo de 6 subprodutos utilizados na alimentação de ruminantes. Verificaram que a extensão da degradação, a taxa de produção e o volume total de gás produzido, variou entre alimentos. Ao relacionarem a produção de gás com a digestibilidade *in vitro* da MO, verificaram existir um elevado coeficiente de correlação entre o método utilizado (Hohenheim Gas Test) e a digestibilidade de 5 dos alimentos estudados.

Pensamos que a partir dos resultados obtidos pelo método da produção de gás após 96 horas de incubação do substrato, e depois de aplicado o modelo logístico de duas fases para descrever a cinética de fermentação *in vitro*, alguns dos parâmetros determinados (V_{FA} , μ_{mA} e V) podem ser utilizados para estimar, com rigor, a digestibilidade *in vitro* dos alimentos utilizados.

7.4.2 - EFICÁCIA DO MODELO UTILIZADO

A cinética de fermentação é caracterizada pela produção de gás de diferentes alimentos, simples ou combinados, e evolui em função de um conjunto de factores. Destacam-se as proporções relativas das fracções solúvel facilmente fermentescível, insolúvel revelando capacidade fermentativa limitada e não degradável. A descrição matemática dos padrões de fermentação das fracções referidas proporciona a análise e avaliação dos dados correspondentes à dimensão e continuidade das relações que se estabelecem entre elas.

Vários modelos têm sido utilizados para estimar a produção de gás resultante da fermentação *in vitro* de diversos substratos. De acordo com FRANCE e THORNLEY (1987), os modelos matemáticos permitem descrever o crescimento bacteriano e a evolução da concentração do substrato ao longo do tempo de incubação.

O modelo exponencial de ØRSKOV e McDONALD (1979) tem sido o mais utilizado, essencialmente para avaliar a cinética da degradação de alimentos para ruminantes utilizando incubações com sacos de nylon.

Inicialmente, devido à fraca precisão dos sistemas mais antigos de registo da produção de gás, as curvas de produção de gás podiam ser

descritas pelo modelo mono-fásico (FRANCE e THORNLEY, 1987) e pelo modelo exponencial (BEUVINK e KOGUT, 1993). Com a introdução de equipamento de registo mais avançado (BEUVINK *et al.*, 1992), os modelos mais simples deixaram de descrever matematicamente de forma satisfatória a produção de gás registada. É neste sentido que BEUVINK e KOGUT (1993) introduzem o modelo de Gompertz modificado, para descrever a produção de gás da fracção do substrato rapidamente e lentamente fermentescível. Com o aparecimento de equipamento ainda mais preciso e de registo automático da produção de gás, para além das 48 horas de incubação (CONE *et al.*, 1996; THEODOROU *et al.*, 1994; PELL e SCHOFIELD, 1993), passaram a ser necessários outros modelos que melhor descrevessem a cinética da produção de gás. FRANCE *et al.* (1993) propõem o modelo exponencial modificado, SCHOFIELD *et al.* (1994) propõem o modelo logístico de duas fases, CONE *et al.* (1996) e GROOT *et al.* (1996) propõem o modelo multifásico e CONE *et al.* (1997) propõem o modelo trifásico.

Para descrever a cinética de fermentação *in vitro* utilizámos o modelo logístico de duas fases (SCHOFIELD *et al.*, 1994), considerando o tempo de latência idêntico em cada uma das fases. O modelo logístico, que tem sido utilizado por vários autores (RODRIGUES, 1999; HALL *et al.*, 1998; STEFANON *et al.*, 1996; SCHOFIELD *et al.*, 1994; PELL *et al.*, 1993), considera que a taxa de crescimento microbiano é proporcional à massa microbiana existente e à quantidade de substrato digestível. Considera também que a quantidade de gás produzido durante o período de incubação é proporcional à quantidade de substrato digerido.

O modelo logístico de duas fases permite a descrição de uma fase inicial da curva de produção de gás, em que ocorre a fermentação do material facilmente fermentescível, e de uma segunda fase de produção de gás, em que ocorre a fermentação dos constituintes da parede celular mais dificilmente fermentescíveis.

Ao analisarmos o Quadro 7.4 verificamos que, pese embora a diferente composição química dos substratos utilizados, resultante da combinação de dois ou três alimentos, o modelo logístico de duas fases permitiu estimar com precisão os parâmetros que definem a cinética da fermentação *in vitro*. Foi eficaz ao estimar os parâmetros V_{FA} , μ_{mA} , λ , V_{FB} , μ_{mB} , μ_{mA}/V_{FA} , μ_{mB}/V_{FB} e V ,

com coeficientes de determinação (r^2) muito elevados e que variaram, para os diferentes alimentos, entre 0,998 ($\pm 0,001$) no substrato 2UP e 0,989 ($\pm 0,003$) para o substrato 2PaU.

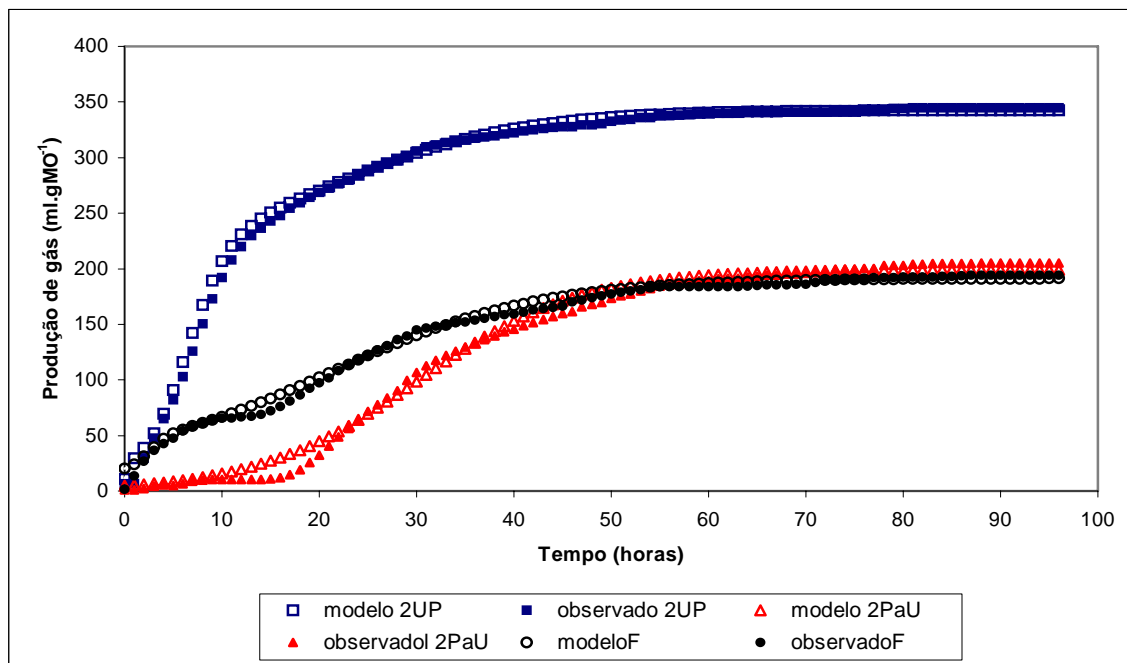


Figura 7.5 - Representação gráfica dos valores observados e dos valores estimados após aplicação do modelo logístico de duas fases aos resultados obtidos para os substratos polpa+ureia com 16% de PB (2UP) ($r^2=0,998$), feno de prado natural (F) ($r^2=0,994$) e palha+ureia com 16% de PB (2PaU) ($r^2=0,989$).

Como se pode ver na Figura 7.5, as curvas estimadas pelo modelo praticamente se sobrepõem às curvas observadas para os três substratos considerados, situação que tende a ser menos evidente com a diminuição do valor de r^2 .

Constatou-se que, com o modelo logístico de duas fases, houve alguma dificuldade em estimar a fase inicial da curva de produção de gás nos substratos em que o tempo de latência foi muito elevado. De realçar o coeficiente de correlação negativo ($r=-0,599$; $P<0,05$) verificado entre o tempo de latência e o coeficiente de determinação calculado. O coeficiente de determinação (r^2) mais baixo foi calculado para o substrato 2PaU, em que o tempo de latência (λ) foi de 13,7 h. Pelo contrário o r^2 mais elevado foi estimado para o substrato 2UP com um $\lambda=1,9$ h.

Como seria de esperar, à medida que o valor de r^2 se aproximou da unidade, a sobreposição entre a curva estimada e a curva observada foi quase total (2UP; $r^2=0,998$).

Quadro 7.10 - Coeficientes de determinação (r^2) obtidos por vários autores após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* de diferentes substratos.

Substrato	r^2	Referência
Fenos de prado natural e palhas	$0,992 \geq r^2 \leq 0,996$	RODRIGUES, 1999
Diferentes substratos	$r^2 \geq 0,970$	HALL <i>et al.</i> , 1998
Luzerna	$0,995 \geq r^2 \leq 0,999$	STEFANON <i>et al.</i> , 1996
Bromo	$0,992 \geq r^2 \leq 0,999$	"
Celulose	0,9985	SCHOFIELD <i>et al.</i> , 1994
Milho forragem	0,9997	PELL <i>et al.</i> , 1993
Cascas de soja	0,9990	"
Feno-silagem de luzerna	0,9980	"

Os valores de r^2 muito elevados, determinados neste trabalho para os 12 substratos utilizados (Quadro 7.4), coincidem com os coeficientes de determinação obtidos por RODRIGUES (1999), HALL *et al.* (1998), STEFANON *et al.* (1996), SCHOFIELD *et al.* (1994) e PELL *et al.* (1993) (Quadro 7.10). Estes autores também usaram o modelo logístico de duas fases para descrever a cinética de fermentação *in vitro*. No entanto, as amostras utilizadas em cada uma das fermentações eram constituídas apenas por um alimento.

Ao analisarmos o Quadro 7.10, os valores de r^2 foram sempre muito elevados tendo variado entre 0,999 e 0,992.

RODRIGUES (1999), trabalhando com 6 fenos de prado natural e 4 palhas diferentes, encontrou coeficientes de determinação que variaram entre 0,996 e 0,992 no primeiro caso e 0,994 e 0,993 no segundo caso. Os valores determinados neste trabalho para o feno de prado natural ($r^2=0,994$) e para a palha de trigo ($r^2=0,993$), enquadram-se naquela gama de valores.

Os resultados que obtivemos são ligeiramente superiores aos verificados por HALL *et al.* (1998). Aqueles autores, utilizando o modelo logístico de duas fases para descrever a cinética de fermentação de substratos como a polpa de

citrosos, a polpa de beterraba e as cascas de soja obtiveram, sempre, coeficientes de determinação iguais ou superiores a 0,97. Concluíram que o modelo foi eficaz para estimar os parâmetros de fermentação.

Constatámos que, à medida que aumentava a quantidade de ureia e PB dos substratos não suplementados com polpa de citrosos, o valor de r^2 diminuía. Determinámos correlações negativas elevadas entre as quantidades de ureia ($r^2=0,923$; $P<0,01$) e de PB ($r^2=0,824$; $P<0,05$) do substrato e o valor de r^2 . Pelo contrário, nos substratos suplementados com polpa de citrosos, não detectámos qualquer efeito do aumento da quantidade de ureia e PB na diminuição do valor de r^2 .

Ao compararmos o NDF dos 12 alimentos utilizados com o coeficiente de determinação obtido após a aplicação do modelo logístico de duas fases, determinámos uma correlação negativa ($r=-0,726$; $P<0,01$) entre o NDF e o r^2 obtido para cada alimento. Este resultado não está de acordo com os valores obtidos por PELL *et al.* (1993). Embora elevada nos dois casos, a precisão do modelo logístico foi ligeiramente superior ao estimar a cinética de fermentação de cascas de soja ($r^2=0,999$) do que de feno-silagem de luzerna ($r^2 =0,998$) ainda que o NDF do primeiro alimento (NDF=64,8%) fosse muito superior ao NDF da luzerna (NDF=34,3%).

Tendo em conta os resultados obtidos, consideramos que o modelo logístico de duas fases pode ser utilizado para descrever a cinética da produção de gás de alimentos com características fermentativas muito diferentes. O modelo é eficaz não só para alimentos analisados individualmente (F, Pa), como também para misturas de alimentos (FU, 2FU, FUP, 2FUP, PaU, 2PaU, PaUP, 2PaUP, UP, 2UP), estimando a curva de produção de gás de forma muito precisa. No entanto, parece-nos que poderá ser menos eficaz para definir a curva de produção de gás de substratos (forragens) ricos em PB, principalmente quando esta PB resulta da adição de fontes azotadas rapidamente fermentescíveis.

7.4.3 – EFEITO DOS CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR NOS PARÂMETROS CALCULADOS APÓS APLICAÇÃO DO MODELO À CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

Ao analisarmos as correlações existentes entre os parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* e o NDF, o ADF, a hemicelulose e a celulose das amostras dos alimentos com que trabalhamos (Quadros 7.11 e 7.12), verificamos existirem sempre correlações negativas elevadas ($P < 0,01$) com os parâmetros que definem a primeira fase de fermentação e o volume total de gás produzido. A correlação negativa entre os constituintes da parede celular e os parâmetros atrás referidos é reflexo da menor quantidade de glúcidos facilmente fermentescíveis existente nos alimentos com maior quantidade de fibra. Observaram-se, pelo contrário, correlações positivas ($P < 0,01$) entre os parâmetros da segunda fase de fermentação (V_{FB} e μ_{mB}/V_{FB}) e os glúcidos estruturais presentes na amostra.

Quadro 7.11 - Coeficientes de correlação e de determinação entre o NDF e o ADF da amostra e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* (n=12).

	NDF				ADF			
	r	r ²	EPM	P	r	r ²	EPM	P
V_{FA}	-0,931	0,866	29,237	**	-0,958	0,918	23,831	**
μ_{mA}	-0,878	0,771	3,414	**	-0,886	0,785	3,115	**
λ	0,757	0,573	2,981	**	0,704	0,496	3,239	*
V_{FB}	0,712	0,507	20,844	**	0,757	0,573	19,406	**
μ_{mB}	0,726	0,527	0,791	**	0,713	0,509	0,806	**
r ²	0,726	0,528	0,002	**	-0,656	0,430	0,003	*
μ_{mA}/V_{FA}	0,601	0,362	0,209	*	0,553	0,306	0,218	ns
μ_{mB}/V_{FB}	0,480	0,231	0,002	ns	0,404	0,163	0,003	ns
V	-0,839	0,704	34,571	**	-0,852	0,727	33,218	**

P – probabilidade calculada após análise de variância ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$; ns – diferenças não significativas

Vários autores têm vindo a confirmar que os constituintes da parede celular não têm todos a mesma digestibilidade. Por exemplo, e em relação aos

dois glúcidos estruturais que são considerados neste trabalho, as hemiceluloses existentes em fenos de luzerna, de prado natural e de várias gramíneas, apresentam valores de digestibilidade *in vitro* superiores aos que se verificam para as celuloses (SUSMEL e STEFANON, 1993; COLLINS, 1988; JUNG e VAREL, 1988).

Determinámos, para o NDF, correlações negativas com o V_{FA} ($r=-0,931$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=-0,878$; $P<0,01$) e o V ($r=-0,839$; $P<0,01$), para o ADF com o V_{FA} ($r=-0,958$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=-0,886$; $P<0,01$) e o V ($r=-0,852$; $P<0,01$), para a hemicelulose com o V_{FA} ($r=-0,867$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=-0,840$; $P<0,01$) e o V ($r=-0,795$; $P<0,01$) e para a celulose com o V_{FA} ($r=-0,955$; $P<0,01$), o μ_{mA} ($r=-0,873$; $P<0,01$) e o V ($r=-0,844$; $P<0,01$). Encontrámos correlações positivas, em alguns casos mais baixas, entre o NDF e o V_{FB} ($r=0,712$; $P<0,01$), o μ_{mB} ($r=0,726$; $P<0,01$) e o λ ($r=0,757$; $P<0,01$), o ADF e o V_{FB} ($r=0,757$; $P<0,01$), o μ_{mB} ($r=0,713$; $P<0,01$) e o λ ($r=0,704$; $P<0,01$), a hemicelulose e o V_{FB} ($r=0,634$; $P<0,01$), o μ_{mB} ($r=0,718$; $P<0,01$) e o λ ($r=0,798$; $P<0,01$) e a celulose e o V_{FB} ($r=0,770$; $P<0,01$), o μ_{mB} ($r=0,724$; $P<0,01$) e o λ ($r=0,711$; $P<0,01$).

Quadro 7.12 – Coeficientes de correlação e de determinação entre a hemicelulose e a celulose da amostra e os diferentes parâmetros obtidos após aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética da fermentação *in vitro* ($n=12$).

	Hemicelulose				Celulose			
	r	r ²	EPM	P	r	r ²	EPM	P
V_{FA}	-0,867	0,751	39,866	**	-0,955	0,911	24,217	**
μ_{mA}	-0,840	0,706	3,871	**	-0,873	0,762	3,204	**
λ	0,798	0,636	2,751	**	0,711	0,506	3,205	**
V_{FB}	0,634	0,401	22,967	*	0,770	0,593	18,947	**
μ_{mB}	0,718	0,516	0,801	**	0,724	0,524	0,794	**
r ²	-0,791	0,625	0,002	**	-0,637	0,406	0,002	*
μ_{mA}/V_{FA}	0,641	0,412	0,201	*	0,545	0,297	0,219	ns
μ_{mB}/V_{FB}	0,559	0,313	0,002	ns	0,409	0,167	0,003	ns
V	0,795	0,704	38,520	**	0,844	0,712	34,094	**

P – probabilidade calculada após análise de variância ** - $P<0,01$; * - $P<0,05$; ns – diferenças não significativas

No Quadro 7.1 estão indicados os valores da composição química dos alimentos utilizados. Como seria de esperar, nas amostras em que se adicionou a polpa de citrinos como suplemento, o NDF, o ADF, a hemicelulose e a celulose do substrato apresentaram valores mais baixos, correspondendo a uma menor quantidade de glúcidos da parede celular, insolúveis e revelando capacidade fermentativa limitada ou mesmo não degradáveis. Constatou-se o aumento do volume de gás produzido na primeira fase de fermentação e da taxa máxima de fermentação da primeira fase, contribuindo assim para o aumento do volume total de gás produzido durante o período de incubação de 96 horas.

Observando a Figura 7.6 verificamos que, pese embora o coeficiente de correlação elevado entre o V_{FA} e o NDF da amostra ($r=-0,931$; $P<0,01$), a intercepção da equação de regressão é significativamente diferente de zero ($P<0,01$). Isto parece indicar que ocorre a degradação de uma quantidade substancial de NDF que não é contabilizada para a produção de gás na primeira fase de fermentação. Ao mesmo tempo, constatamos que por cada g de NDF da amostra são produzidos 0,329 ml de gás.

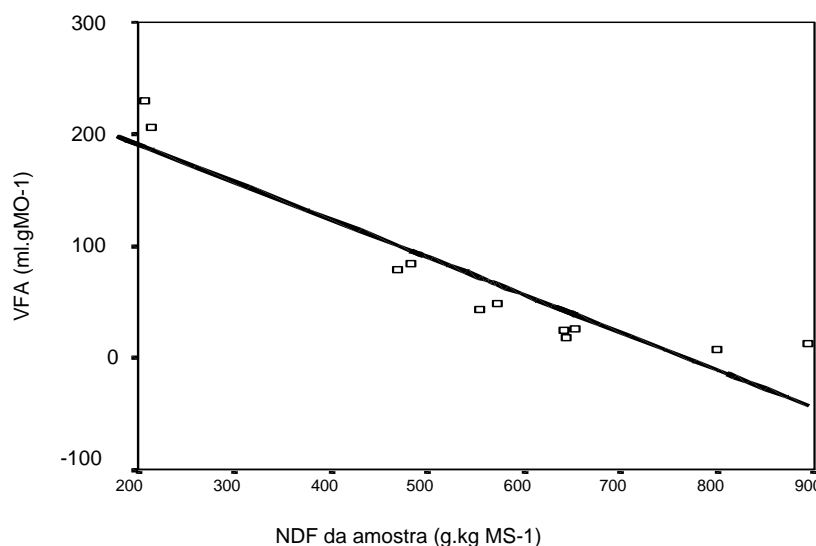


Figura 7.6 -. Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação (V_{FA}) ($r^2=0,866$) ($V_{FA} = 255,4312 - 0,32996 \text{ NDF}$).

Pelo contrário (Figura 7.7), o V_{FB} apresenta um coeficiente de correlação com o NDF mais baixo ($r=0,712$; $P<0,01$). Também neste caso, o ponto de intercepção da recta com o eixo dos Y é significativamente diferente de zero

($P < 0,01$) parecendo ser necessária a degradação de menor quantidade de NDF antes de haver produção de gás na segunda fase de fermentação. Neste caso verificamos que, por cada g de NDF da amostra, são produzidos 0,0937 ml de gás, quantidade muito inferior à que se obteve na primeira fase de fermentação.

Maior quantidade de NDF corresponde a maior quantidade de glúcidos estruturais com capacidade fermentativa limitada, mais dificilmente degradados na primeira fase de fermentação. No entanto, nesta fase, a degradação de 1 g de NDF permite a produção de maior volume de gás devido à presença, no substrato, de glúcidos citoplásmicos e parietais facilmente fermentescíveis que são degradados rapidamente.

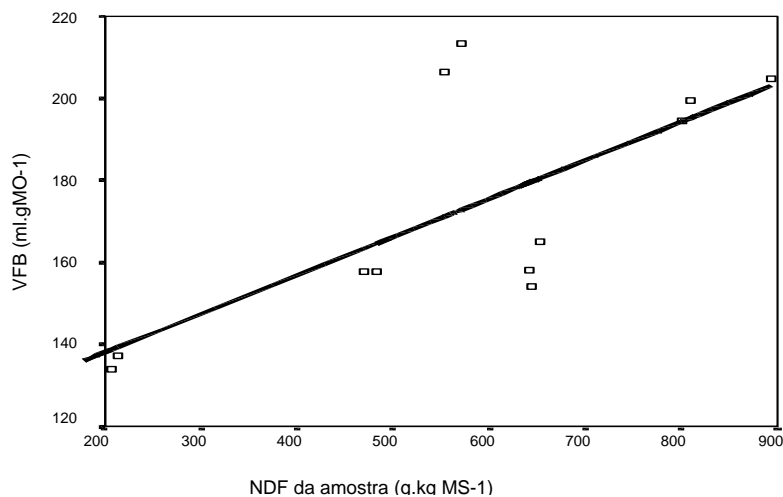


Figura 7.7 -. Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o volume de gás produzido na segunda fase de fermentação (V_{FB}) ($r^2=0,507$) ($V_{FB} = 119,344 + 0,0937 \text{ NDF}$).

A correlação positiva encontrada entre o NDF da amostra e a produção de gás da segunda fase e a taxa máxima de produção de gás da segunda fase de fermentação, indica-nos a presença de uma maior quantidade de glúcidos incluídos na fracção insolúvel que chegam à segunda fase. Esta situação vai originar um atraso no processo de degradação inicial dos alimentos e, conseqüentemente, uma maior quantidade de substrato a ser fermentado na segunda fase de fermentação.

De realçar que, para o ADF, para a hemicelulose e para a celulose foram calculadas correlações positivas com o V_{FB} , e o μ_{mB} (Quadros 7.11 e 7.12).

Também se determinou uma correlação positiva entre a taxa específica de digestão da primeira fase de fermentação e o NDF ($r=0,601$; $P<0,05$) e a hemicelulose ($r=0,641$; $P<0,05$) da amostra, indicando um aumento da fracção insolúvel que é degradada mais lentamente pela população microbiana do rúmen, embora não ocorresse qualquer correlação entre o μ_{mB}/V_{FB} e o NDF, o ADF, a hemicelulose e a celulose.

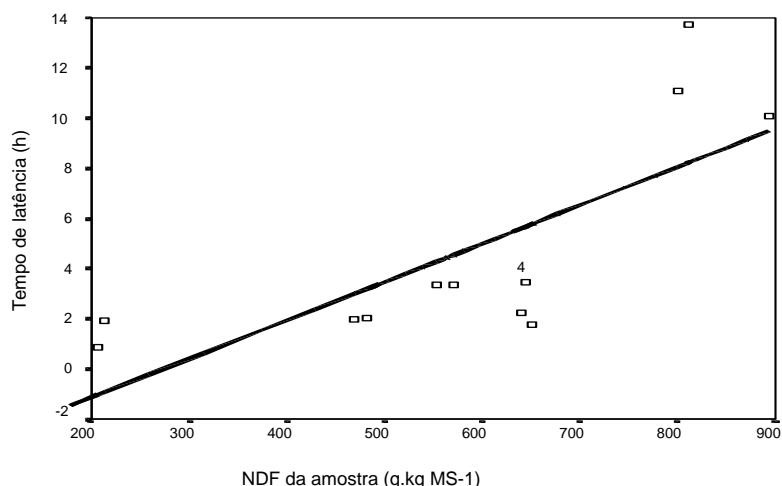


Figura 7.8 -. Representação gráfica da equação de regressão linear entre o NDF das amostras e o tempo de latência (λ) ($r^2=0,573$) ($\lambda = -4,187 + 0,0153$ NDF).

Ao analisarmos a relação existente entre o tempo de latência e o conteúdo da amostra em glúcidos da parede celular encontrámos coeficientes de correlação ($P<0,01$) que variaram entre 0,798 para a hemicelulose e 0,704 para o ADF. Na Figura 7.8, e a título de exemplo, está representada a recta de regressão entre o NDF da amostra e o tempo de latência que lhe está associado. O aumento do tempo de latência com o aumento do NDF da amostra justifica-se, uma vez que o tempo de latência corresponde ao período em que ocorrem diferentes processos como a hidratação do alimento, a fermentação dos glúcidos solúveis e o ataque e colonização do substrato insolúvel pelos microrganismos (CHENG *et al.*, 1981).

Durante a mastigação e depois ruminação, os alimentos são fraccionados e, já no rúmen, separados em fracção solúvel e insolúvel em água. Como a população microbiana do rúmen varia em termos de composição, quantidade e identidade, uma parte actua rapidamente sobre a fracção solúvel e a outra vai actuar posteriormente, e de forma mais lenta,

sobre a fracção insolúvel em água. Quanto maior for o conteúdo em NDF da amostra maior será o tempo de latência.

7.4.4 - VOLUME DE GÁS PRODUZIDO E SUBSTRATO EFECTIVAMENTE DEGRADADO

KRISHNAMOORTHY *et al.* (1991) afirmam que o volume de gás produzido durante as fermentações *in vitro* está directamente relacionado com a produção de biomassa microbiana.

No entanto, esta ideia não é partilhada por outros autores. BLÜMMEL *et al.* (1997b), BLÜMMEL e BULLERDIECK (1997), MAKKAR *et al.* (1995), BLÜMMEL (1994), BLÜMMEL *et al.* (1993) citados por BLÜMMEL *et al.* (1997a) e BLÜMMEL (1992) têm vindo a demonstrar que o método da produção de gás reflecte principalmente a produção de ácidos gordos voláteis. Pode mesmo existir uma correlação negativa entre a quantidade de ácidos gordos voláteis produzidos e a produção de biomassa bacteriana, principalmente quando ambas estão relacionadas com a unidade de substrato efectivamente degradado. Tem-se verificado que substratos com proporcionalmente maior volume de gás produzido apresentam, comparativamente, menor produção de biomassa microbiana.

BLÜMMEL *et al.* (1997b) sugerem que as determinações da produção de gás sejam complementadas com a correspondente determinação da quantidade de substrato efectivamente degradado *in vitro*, utilizando a solução detergente neutra no tratamento do resíduo (GOERING e VAN SOEST, 1970). Com este método, pode-se evitar a selecção de alimentos para ruminantes com proporcionalmente maior produção de ácidos gordos voláteis e, conseqüentemente, menor produção de biomassa microbiana por unidade de substrato degradado.

Menor volume de gás produzido por unidade de substrato efectivamente degradado poderá ser indicador de menor produção de ácidos gordos voláteis e, conseqüentemente, maior produção de biomassa microbiana (BLÜMMEL *et al.*, 1997b; BLÜMMEL, 1994). Provavelmente, isto acontecerá porque maior quantidade da matéria fermentada é incorporada nas células microbianas,

aumentando a quantidade de proteína microbiana que chega ao intestino do animal (BLÜMMEL e BULLERDIECK, 1997). Uma quantidade proporcionalmente maior de substrato incorporado nas células, está parcialmente ligada a maiores taxas de degradação do substrato. Assim, uma vez que as necessidades de manutenção da população microbiana existente diminuem, há maior disponibilidade de ATP para o crescimento celular (TEMPEST e NEIJSSSEL, 1984).

BLÜMMEL *et al.* (1997a), utilizando os resultados obtidos após a incubação de 42 amostras de forragens, encontraram um coeficiente de correlação negativo elevado ($r=-0,67$; $P<0,0001$) entre o volume de gás produzido e a quantidade de biomassa bacteriana, sempre que a unidade utilizada foi o substrato efectivamente degradado.

Os valores médios dos diferentes parâmetros obtidos após a aplicação do modelo logístico de duas fases à cinética de fermentação *in vitro* do substrato total (ST) e do substrato efectivamente degradado (SED) são apresentados no Quadro 7.6. Os parâmetros μ_{mA} ($P<0,05$), V_{FB} ($P<0,01$), μ_{mB} ($P<0,01$) e V ($P<0,01$) aumentaram do ST para o SED. Os parâmetros V_{FA} e λ tiveram um aumento não significativo enquanto que os parâmetros r^2 e μ_{mA}/V_{FA} tiveram uma diminuição não significativa do ST para o SED. A taxa específica de digestão da segunda fase (μ_{mB}/V_{FB}) não sofreu qualquer alteração. Em termos globais verificou-se que a maior variação ocorreu em relação à produção total de gás e aos parâmetros associados à segunda fase de fermentação.

A correlação existente entre a produção total de gás *in vitro* e a quantidade de substrato efectivamente degradado dos 12 alimentos considerados ($n=48$), está representada na Figura 7.9. Determinou-se uma correlação positiva elevada ($r=0,957$; $P<0,01$) entre o volume total de gás produzido ao fim de 96 horas de fermentação e a quantidade de substrato efectivamente degradado. Valores idênticos foram obtidos por BLÜMMEL *et al.* (1997a) e BLÜMMEL (1994), autores que encontraram um coeficiente de correlação $r=0,96$ entre o volume total de gás produzido e o substrato efectivamente degradado durante, respectivamente, 96 e 24 horas de fermentação de diversas forragens. BLÜMMEL *et al.* (1997b), trabalhando com

61 forragens diferentes, determinaram uma correlação positiva ligeiramente mais baixa ($r=0,92$) entre os mesmos parâmetros.

Na Figura 7.9, verifica-se também que a intercepção do eixo dos Y pela recta de regressão é significativamente ($P<0,01$) diferente de zero e uma quantidade razoável de substrato (186,129 mg) parece ter sido degradada sem ter contribuído para a produção de gás. Este valor, é muito superior aos 68,5 mg obtidos por BLÜMMEL *et al.* (1997b), no trabalho acima citado. Estes autores verificaram também que, para a produção de 1 ml de gás, foram necessários entre 2,74 e 4,65 mg do mesmo substrato.

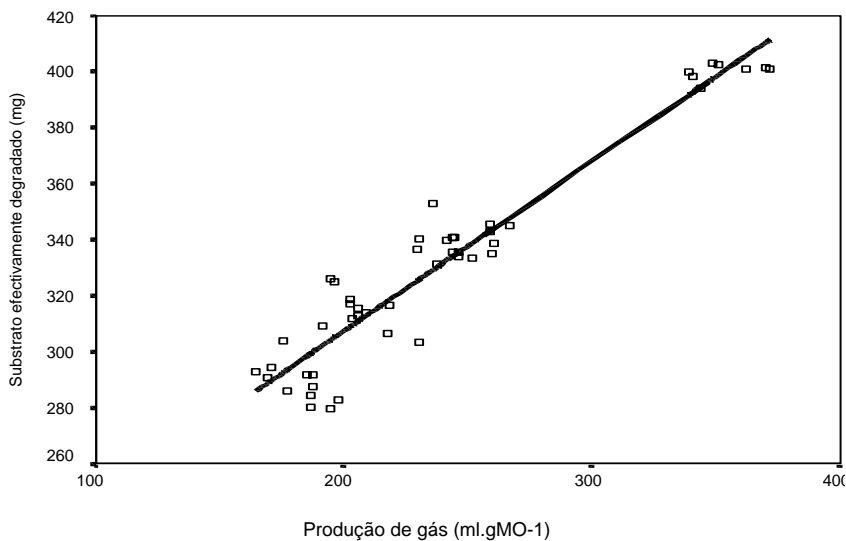


Figura 7.9 - Representação gráfica da equação de regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado (SED) e o volume total de gás produzido durante 96 horas de incubação (V) ($r^2=0,916$) (SED = 186,129 + 0,607 V).

Após 24 horas de incubação de diferentes forragens tropicais desidratadas (BLÜMMEL, 1994), determinou uma quantidade ainda mais baixa de 55,8 mg de substrato que foi degradado sem ter contribuído para a produção de gás. Também encontrou um r elevado entre a produção de gás e a quantidade de substrato efectivamente degradado ($r=0,96$; $P<0,0001$) e verificou que eram necessários 3,1 mg de substrato para a produção de 1 ml de gás.

Curiosamente, no trabalho que realizámos, determinámos valores mais baixos para a quantidade de substrato efectivamente degradado, necessário para a produção de 1 ml de gás. Isto parece indicar que os alimentos com que trabalhámos foram mais eficientemente utilizados para a produção de gás. A

quantidade de substrato efectivamente degradado, necessária para a produção de 1 ml de gás foi em média de 1,4 ($\pm 0,17$) mg.ml⁻¹ variando entre 1,1 mg.ml⁻¹ no substrato UP e 1,7 mg.ml⁻¹ no substrato 2FU (Quadro 7.13).

Se tivermos em consideração o que é referido por alguns autores (BLÜMMEL *et al.*, 1997a; BLÜMMEL *et al.*, 1997b; BLÜMMEL, 1994), podemos inferir dos nossos resultados que, nos substratos em que se utilizou a polpa de citrinos e em que houve maior produção total de gás, terá havido menor produção de biomassa bacteriana por mg de substrato efectivamente degradado.

Quadro 7.13 – Substrato efectivamente degradado (mg.ml⁻¹) necessário para a produção de 1 ml de gás na primeira fase de fermentação (V_{FA}) na segunda fase de fermentação (V_{FB}) e no período total de 96 horas de incubação (V).

	V_{FA}	V_{FB}	V
F	10,9 ($\pm 1,44$)	1,7 ($\pm 0,05$)	1,4 ($\pm 0,06$)
FU	12,1 ($\pm 1,75$)	1,8 ($\pm 0,09$)	1,5 ($\pm 0,10$)
FUP	4,0 ($\pm 0,08$)	2,1 ($\pm 0,16$)	1,4 ($\pm 0,07$)
2FU	17,1 ($\pm 2,20$)	1,9 ($\pm 0,08$)	1,7 ($\pm 0,07$)
2FUP	4,3 ($\pm 0,28$)	2,1 ($\pm 0,08$)	1,4 ($\pm 0,04$)
Pa	24,1 ($\pm 3,90$)	1,5 ($\pm 0,10$)	1,4 ($\pm 0,08$)
PaU	45,2 ($\pm 4,08$)	1,6 ($\pm 0,05$)	1,5 ($\pm 0,05$)
PaUP	7,2 ($\pm 0,77$)	1,6 ($\pm 0,04$)	1,3 ($\pm 0,02$)
2PaU	-	1,5 ($\pm 0,07$)	1,5 ($\pm 0,07$)
2PaUP	8,1 ($\pm 1,58$)	1,6 ($\pm 0,03$)	1,3 ($\pm 0,03$)
UP	1,7 ($\pm 0,20$)	3,0 ($\pm 0,61$)	1,1 ($\pm 0,03$)
2UP	1,9 ($\pm 0,14$)	2,9 ($\pm 0,28$)	1,1 ($\pm 0,01$)

Também determinámos uma correlação negativa elevada ($r=-0,955$; $P<0,01$) entre a quantidade de substrato efectivamente degradado necessária para a produção de 1 ml de gás e as digestibilidades *in vitro* da MS dos alimentos. Como seria de esperar, verificou-se um aumento da eficiência de utilização do substrato efectivamente degradado para a produção de gás, à medida que ia aumentando a digestibilidade *in vitro* dos alimentos (Figura 7.10).

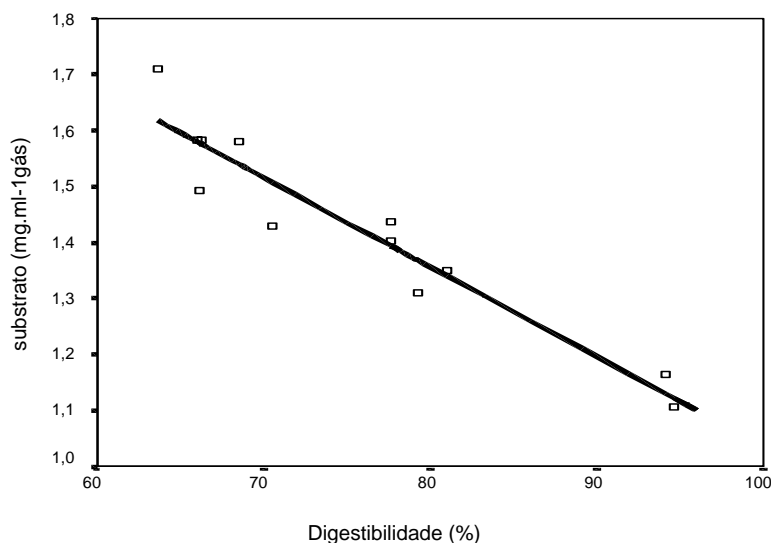


Figura 7.10 - Representação gráfica da equação de regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado necessário para a produção de 1 ml de gás (SED) e a digestibilidade *in vitro* (Dig48) da matéria seca ($r^2=0,912$) (SED = 2,635 – 0,0160 Dig48).

Ao analisarmos a relação existente entre o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação e o substrato efectivamente degradado de cada amostra, encontrámos uma correlação positiva elevada ($r=0,907$; $P<0,01$). A quantidade de substrato utilizado para a produção de gás foi em média de 12,4 ($\pm 12,36$) mg.ml⁻¹, variando entre 1,7 mg.ml⁻¹ no alimento UP e 45,2 mg.ml⁻¹ no substrato PaU (Quadro 7.13). Tal como tinha acontecido com o volume total de gás produzido, também neste caso determinámos uma correlação negativa entre a quantidade de substrato efectivamente degradado para a produção de 1 ml de gás e a digestibilidade *in vitro* da MS dos alimentos ($r=-0,579$; $P<0,01$). Esta ocorrência demonstra que os alimentos com maior digestibilidade têm maior rendimento para a produção de gás na primeira fase de fermentação como consequência do maior volume de gás produzido e de uma taxa máxima

de produção de gás mais elevada (GETACHEW *et al.*, 1998; SCHOFIELD e PELL, 1995). A maior proporção da fracção solúvel, facilmente fermentescível, existente nos alimentos mais digestíveis, origina uma maior quantidade de gás produzido por unidade de substrato digerido. Ou seja, nesta fase, com o aumento da digestibilidade *in vitro* da MS da amostra, aumenta também a eficiência de conversão do substrato efectivamente degradado, em gás.

Na segunda fase de fermentação, a quantidade de substrato efectivamente degradado, necessário para a produção de 1 ml de gás, diminuiu em todas as amostras, com excepção dos dois substratos constituídos por polpa de citrinos+ureia em que aumentou. Foi em média de 1,9 ($\pm 0,53$) mg.ml⁻¹, variando entre 3,0 mg.ml⁻¹ no substrato UP e 1,5 mg.ml⁻¹ nos substratos Pa e 2PaU. Para esta fase de fermentação determinámos uma correlação positiva entre a quantidade de substrato efectivamente degradado para a produção de gás e a digestibilidade dos alimentos ($r=0,755$; $P<0,01$). Na segunda fase de fermentação são essencialmente fermentados os glúcidos constituintes da parede celular, fracção insolúvel revelando capacidade fermentativa limitada (RODRIGUES, 1999; STEFANON *et al.*, 1996; SCHOFIELD e PELL, 1995). À medida que aumenta a digestibilidade *in vitro* da MS da amostra, aumenta também a quantidade de substrato efectivamente degradado que é necessário para a produção de 1ml de gás. Quanto maior for a digestibilidade da amostra maior será a quantidade de substrato que é efectivamente degradado na primeira fase de fermentação, restando para a segunda fase proporcionalmente maior quantidade de substrato com menor capacidade fermentativa e menor eficiência em termos de produção de gás. Consequentemente, maior quantidade de substrato efectivamente degradável será necessário para a produção de 1 ml de gás.

Em relação à segunda fase de fermentação determinámos uma correlação negativa muito baixa ($r=-0,365$; $P<0,01$) entre o peso do substrato efectivamente degradado e a produção de gás. Esta relação poderá indicar-nos que quanto maior for a quantidade de substrato efectivamente degradado, menor será a produção de gás na segunda fase de fermentação.

Verificámos também que a quantidade de substrato efectivamente degradado, necessário para a produção de 1 ml de gás, diminuiu nas amostras

em que havia sido elevado na primeira fase e aumentou nas amostras em que havia sido baixo na primeira fase. Esta ocorrência pode ser confirmada observando os valores obtidos para o alimento PaU. Na primeira fase de fermentação foram necessários 45,2 mg para a produção de 1 ml de gás e na segunda fase apenas 1,6 mg.ml⁻¹ de gás.

Pelo contrário, o substrato UP, o mais digestível do conjunto dos 12 alimentos utilizados (94,66 % de Dig48), teve na primeira fase de fermentação grande eficiência (1,7 mg.ml⁻¹ gás), diminuindo na segunda fase para 3,0 mg de substrato efectivamente degradável, necessário para a produção de 1 ml de gás.

Devido à grande heterogeneidade das amostras utilizadas, não foi possível encontrar uma correlação elevada entre o tempo de latência (λ) e a quantidade de substrato efectivamente degradado. No entanto, detectou-se uma ligeira tendência ($r=-0,303$; $P<0,01$) para o aumento do tempo de latência com a diminuição da quantidade de substrato efectivamente degradado.

7.5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao verificarmos que os valores médios obtidos para as digestibilidades *in vitro* dos diferentes substratos, após 48 e 96 horas de incubação, não foram significativamente diferentes entre si, pusemos a hipótese de determinarmos a digestibilidade *in vitro* a partir do resíduo existente ao fim de 96 horas de incubação, período de tempo utilizado para incubação do substrato no método da produção de gás.

No entanto, quando analisámos caso a caso as digestibilidades *in vitro* dos diferentes substratos às 48 e 96 horas de incubação, encontramos diferenças significativas em 58,3% dos casos. Isto levou-nos a concluir que, enquanto não existir um maior número de resultados que atestem a hipótese apresentada, a digestibilidade da MS e do NDF deve ser sempre calculada após 48 horas de incubação. Esta opinião foi reforçada após termos obtido os coeficientes de correlação e determinação existentes entre os parâmetros que definem a cinética de fermentação e a digestibilidade da MS e do NDF das

amostras ao fim de 48 e 96 horas de incubação. Verificámos que, para todos os parâmetros, os coeficientes de correlação e de determinação foram mais elevados em relação aos resultados da digestibilidade *in vitro* ao fim de 48 horas de incubação. Reforçando o que foi dito, determinámos coeficientes de correlação mais elevados quando relacionámos o conteúdo em NDF, ADF, hemicelulose e celulose das amostras com a digestibilidade *in vitro* após 48 horas de incubação do que com a digestibilidade *in vitro* após 96 horas de incubação.

Calculámos coeficientes de correlação elevados entre a digestibilidade *in vitro* da MS e da fracção NDF ao fim de 48 horas de incubação e o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação, a taxa máxima de produção de gás da primeira fase e o volume total de gás produzido durante 96 horas de incubação. Tendo em conta os coeficientes de determinação muito elevados entre a digestibilidade *in vitro* da MS e os parâmetros que definem a cinética de fermentação já referidos, determinámos três equações de regressão com r^2 variando entre 0,969 e 0,852. Concluimos que as equações calculadas poderão ser utilizadas para estimar, com rigor, a digestibilidade da MS dos alimentos a partir dos parâmetros que definem a cinética de fermentação *in vitro* durante 96 horas de incubação.

Não tendo encontrado qualquer relação entre a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF ao fim de 48 horas de incubação e os parâmetros que definem a segunda fase de fermentação, concluimos que o aumento da digestibilidade *in vitro* da amostra influencia, de forma determinante, os parâmetros inerentes à primeira fase de fermentação, tendo pouca influência ou influenciando negativamente os parâmetros associados à segunda fase. Quanto maior for a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF dos alimentos, maior será a proporção de gás produzido na primeira fase de fermentação em relação ao total de gás produzido. No nosso trabalho, a utilização da polpa de citrinos confirma isso mesmo.

A partir dos coeficientes de correlação negativos elevados, determinados entre a fracção ADL das amostras e a digestibilidade *in vitro* da MS ($r=-0,901$) e do NDF ($r=-0,622$), concluimos que a lenhina influenciou negativamente a

digestibilidade dos substratos, à semelhança do que tem sido referido por outros autores.

Em relação à eficácia do modelo utilizado para descrever a cinética de fermentação, podemos concluir que o modelo logístico de duas fases permitiu estimar com precisão os parâmetros que definem a cinética da fermentação *in vitro*. Mesmo utilizando substratos com uma composição química muito diferente, o modelo logístico foi eficaz para estimar o tempo de latência e todos os outros parâmetros associados à primeira fase e à segunda fase de fermentação.

Os coeficientes de determinação calculados foram muito elevados ($0,998 < r^2 > 0,989$), permitindo a descrição de uma fase inicial da curva de produção de gás, em que ocorre a fermentação do material facilmente fermentescível, e de uma segunda fase de produção de gás, em que ocorre a fermentação dos constituintes da parede celular mais dificilmente fermentescíveis.

As curvas estimadas pelo modelo, praticamente se sobrepuseram às curvas observadas para os três substratos que serviram de exemplo. No entanto, pensamos que se verificou uma ligeira tendência para a diminuição da eficácia do modelo logístico de duas fases ao estimar a fase inicial da curva de produção de gás, nos substratos com maior tempo de latência e nos substratos com maior quantidade de proteína bruta resultante da adição de fontes azotadas rapidamente fermentescíveis.

Verificámos que o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação, a taxa máxima de produção de gás da primeira fase e o volume total de gás produzido durante as 96 horas de incubação estiveram sempre correlacionados negativamente ($P < 0,01$) com a quantidade de NDF, ADF, hemicelulose e celulose presentes na amostra. No entanto, e pelo contrário, estes constituintes da parede celular estiveram sempre positivamente correlacionados com os parâmetros que definem a segunda fase de fermentação. Os resultados apontam para o facto de que estes glúcidos estruturais, sendo mais dificilmente degradados na primeira fase de fermentação, vão constituir o material celular insolúvel que chega à segunda fase de fermentação.

O tempo de latência está positivamente correlacionado com o aumento da quantidade de NDF, ADF, ADL, hemicelulose e celulose presente na amostra. Esta relação justifica-se, uma vez que o tempo de latência corresponde ao período em que ocorrem diferentes processos como a hidratação do alimento, a fermentação dos glúcidos solúveis e o ataque e colonização do substrato insolúvel pelos microrganismos.

Vários autores têm sugerido que as determinações da produção de gás sejam complementadas com a correspondente determinação da quantidade de substrato efectivamente degradado *in vitro*, utilizando a solução detergente neutra no tratamento do resíduo. Com este procedimento pretende-se evitar a selecção de alimentos para ruminantes com proporcionalmente maior produção de ácidos gordos voláteis e, conseqüentemente, menor produção de biomassa microbiana por unidade de substrato efectivamente degradado.

Ao aplicarmos a mesma técnica ao nosso trabalho, verificámos existir um coeficiente de correlação positivo elevado ($P < 0,01$) entre a quantidade de substrato efectivamente degradado, e o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação e a produção total de gás *in vitro* durante as 96 horas de incubação. Ao mesmo tempo, determinámos valores muito baixos de substrato efectivamente degradado, necessário para a produção de 1 ml de gás. Este facto parece indicar que, de um modo geral, os alimentos que utilizámos foram muito eficientes para a produção de gás. Se tivermos em consideração o que é referido por alguns autores, podemos inferir dos nossos resultados que, nos substratos em que se utilizou a polpa de citrinos e em que houve maior produção total de gás, terá havido menor produção de biomassa bacteriana por mg de substrato efectivamente degradado.

Em relação à segunda fase de fermentação, determinámos uma correlação negativa ($P < 0,01$) entre a quantidade do substrato efectivamente degradado e a produção de gás. Esta relação indica-nos uma ligeira tendência para uma menor produção de gás na segunda fase de fermentação com o aumento da quantidade de substrato efectivamente degradado. A eficiência de utilização do substrato efectivamente degradado para a produção de gás melhorou com o aumento da digestibilidade *in vitro* dos alimentos.

7.6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos afirmar que, embora os valores médios determinados para as digestibilidades *in vitro* dos diferentes substratos após 48 e 96 horas de incubação não tenham sido significativamente diferentes, a digestibilidade *in vitro* da MS e do NDF deve ser calculada após 48 horas de incubação.

Os elevados coeficientes de determinação verificados entre a digestibilidade *in vitro* da MS após 48 horas de incubação e o volume de gás produzido na primeira fase, a taxa máxima de produção de gás na primeira fase e o volume total de gás durante 96 horas de incubação, permitem-nos afirmar que as equações de regressão calculadas podem ser utilizadas para estimar a digestibilidade *in vitro* da MS de alimentos a partir de alguns valores que definem a cinética de fermentação *in vitro*.

O modelo logístico de duas fases, utilizado para tratar os valores registados durante as 96 horas de incubação dos alimentos, foi eficaz ao estimar com precisão os parâmetros que definem a cinética da fermentação *in vitro*, mesmo quando utilizámos substratos com composição química muito diferente, resultante de misturas de alimentos.

Os teores em NDF, ADF, hemicelulose e celulose das amostras estiveram sempre correlacionados negativamente com o volume de gás produzido na primeira fase de fermentação, com a taxa máxima de produção de gás da primeira fase e com o volume total de gás, e positivamente correlacionados com os parâmetros que definem a segunda fase de fermentação durante o período de incubação.

Ao analisarmos a quantidade de substrato efectivamente degradado necessário para a produção de 1 ml de gás, verificámos existir um aumento da eficiência de utilização do substrato com o aumento da digestibilidade *in vitro* dos alimentos. Determinámos uma correlação elevada entre a quantidade de substrato efectivamente degradado e os volumes de gás produzidos na primeira fase de fermentação e durante todo o período de incubação. A quantidade de substrato efectivamente degradado que foi necessário para a

produção de 1 ml de gás na segunda fase de fermentação, diminuiu nas amostras em que havia sido elevado na primeira fase e aumentou nas amostras em que havia sido baixo na primeira fase.

CAPÍTULO 8 – BIBLIOGRAFIA

- ADAMU, A. M., RUSSELL, J. R., MCGILLIARD, A. D. e TRENKLE, A., 1988. Effects of added dietary urea on the utilization of maize stover silage by growing beef cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **22**: 227-236.
- ADESOGAN, A. T., OWEN, E. e GIVENS, D. I., 1998. Prediction of the *in vitro* digestibility of whole crop wheat from *in vitro* digestibility, chemical composition, *in situ* degradability, *in vitro* fermentation and near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **74**: 259-272.
- ADESOGAN, A. T., OWEN, E. e GIVENS, D. I., 1999. Prediction of metabolizable energy value of whole-crop wheat from laboratory-based measurements. *Anim. Sci.*, **68**: 427-439.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC), 1993. Technical Committee on Responses to Nutrients, Report nº5. Nutritive Requirements of Ruminant Animals. *Energy Nutr. Abs. & Rev.*, Series B, **60**: 729-804.
- AKIN, D.E. e RIGSBY, L.L., 1985. Influence of phenolic acids on rumen fungi. *Agron. J.*, **77**:180-182.

- ALBERSHEIM, P., BAUER, W. D., KEESTRA, K. e TALMADGE, K. W., 1973. The Structure of the Wall of Suspension-Cultured Sycamore Cells. In Frank Loewus (ed.). *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Academic Press, New York. pp-117-147.
- ÅMAN, P., 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.183-189.
- ANDREESEN, J. R., 1994. Glycine metabolism in anaerobes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**: 223-237.
- AREGHEORE, E. M. e IKHATUA, U. J., 1999. Nutritional evaluation of some tropical crop residues: *in vitro* organic matter, neutral detergent fiber, true dry matter digestibility and metabolizable energy using the Hohenheim gas test. *Australasian J. Anim. Sci.*, **12**: 747-751.
- ASANUMA, N., IWAMOTO, M. e HINO, T., 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, **82**: 780-787.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1990. *Official Methods of Analysis*. 14th, Edition, Vol. 1, AOAC, Washington DC, USA, 684 p.
- BARRIOS URDANETA, A., CASTRILLO, C., FONDEVILA, M. e BALCELLS, J., 1999. Efecto de la sustitucion de cebada por pulpa de citricos en dietas mixtas para ovejas en lactacion. *ITEA Produccion Animal*, **20**: 577-579.
- BAUCHOP, T., 1989. Colonization of plant fragments by protozoa and fungi. In J. V. Nolan, R. A. Leng, D. I. Demeyer (eds). *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Penambul Books, Armidale, pp. 83-96.
- BECKER, M., VINCENT, C. e REID, J.S.G., 1992. UDP-glucose:(1-3, 1-4)- β -glucan glucosyltransferase in barley (*Hordeum vulgare*). In M.M.A. Sassen, J.W.M. Derksen, A.M.C. Emons and A.M.C. Wolters-Arts (eds.)

- Book of Abstracts-Sixth Cell Wall Meeting*. Nijmegen. University Press, Nijmegen, pp. 77.
- BELIBASAKIS, N. G. e TSIRGOGIANNI, D., 1995. Effects of dried citrus pulp on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **60**: 87-92.
- BEN-GHEDALIA, D., YOSEF, E., MIRON, J. e EST, Y., 1989. The effects of starch and pectin rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **24**: 289-298.
- BERGEN, W. G. e YOKOYAMA, M. T., 1977. Productive limits to rumen fermentation. *J. Anim. Sci.*, **46**: 573-584.
- BERNALIER, A., FONTY, G., BONNEMOY, F. e GOUET, Ph., 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.*, **25**: 143-148.
- BEUVINK, J. M. W. e SPOELSTRA, S. F., 1992. Interaction between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**: 505-509.
- BEUVINK, J. M. W., SPOELSTRA, S. F. e HOGENDORP, R. J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agric. Sci.*, **40**: 401-407.
- BEUVINK, J.M.W. e KOGUT, K., 1993. Modelling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *J. Anim. Sci.*, **71**: 1041-1046.
- BEUVINK, J.M.W., 1993. *Measuring and Modelling in vitro Gas Production Kinetics to Evaluate Ruminal Fermentation of Feedstuffs*. PhD Thesis, IVVO-DLO Lelystad.
- BLÜMMEL, M. e BULLERDIECK, P., 1997. The need to complement *in vitro* gas production measurements with residue determinations from *in sacco*

- degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays *Anim. Sci.*, **64**: 71-75.
- BLÜMMEL, M. e ØRSKOV, E.R., 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **40**:109-119.
- BLÜMMEL, M., 1992. Improving the utilization of maize stover and other crop residues as ruminant feeds. In R. De Jong, T. Nolan e J. Van Bruchem (eds.). *Natural Resource Development and Utilization*. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, pp 82.
- BLÜMMEL, M., 1994. *Relationship Between Kinetics of Stover Fermentation as Described by the Hohenheim in vitro Gas Production Test and Voluntary Feed Intake of 54 Cereal Stovers*. Ph. D. Thesis. Universität Hohenheim, 104 pp.
- BLÜMMEL, M., MAKKAR, H. P. S. e BECKER, K., 1997b. In vitro gas production: a technique revisited. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **77**: 24-34.
- BLÜMMEL, M., STEINGAB, H. e BECKER, K., 1997a. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implication for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.*, **77**: 911-921.
- BORBA, A. E. S., GONÇALVES, P. M. B. O., VOUZELA, C. F. M., REGO, O. A. e BORBA, F. R. S., 2000. Efeito da alimentação do dador na utilização de fontes de inóculo alternativas na previsão da digestibilidade pelo método da produção de gás. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano VII, **1**: 43-50.
- BORNEMAN, W. S. e AKIN, D. E., 1990. Lignocellulose degradation by rumen fungi and bacteria: ultrastructure and cell wall degrading enzymes. In D. E. Akin, L. C. Ljungdahl, J. R. Wilson e P. J. Harris (eds.) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*. Elsevier Science, New York, pp. 325-340.

- BROCK, F. M., FORSBERG, C. W. e BUCHANAN-SMITH, J. G., 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 561-569.
- BROCK, T. D. e MADIGAN, M. T., 1991. *Biology of microorganisms*. 6th Ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- BRODERICK, G. A., WALLACE, R. J. e MCKAIN, N., 1988. Uptake of small neutral peptides by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.*, **42**: 109-118.
- BROWNLEADER, M. D., AHMED, N., TREVAN, M., CHAPLIN, M. E DEY, P. M., 1994. A study of extensin and extensin peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter*, nº 4, September, LABV Newsletters.
- BUXTON, D. R. e RUSSELL, J. R., 1988. Lignin constituents and cell wall digestibility of grass and legumes stems. *Crop Sci.*, **28**: 553-558.
- CARPITA, N.C., 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**:445-476.
- CARVALHO, M. P., BOIN, C., LANNA, D. P. D., TEDESCHI, L. O., 1998. Substituição parcial do milho por subprodutos energéticos em dietas de novilhos com base em bagaço de cana tratado à pressão e vapor: digestibilidade, parâmetros ruminais e degradação *in situ*. *Rev. Bras. Zootec.*, **27**: 1182-1192.
- CASSAB, G. I. e VARNER, J. E., 1988. Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**: 321-353.
- CASTRO, A. M. e ZANETTI, M. A., 1998. Estudo da inclusão de fibra na dieta de bezerros da raça Holandesa. *Rev. Bras. Zootec.*, **27**: 1193-1198.
- CHAMBERLAIN, A. T. e WILKINSON, J. M., 1996. *Feeding the dairy cow*. Chalcombe Publication, Lincoln, UK.
- CHEN, G. E RUSSELL, J. B., 1988. Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal Peptostreptococcus. *Appl Environ Microbiol.*, **54**: 2742-2749.

- CHEN, G. E. RUSSELL, J. B., 1989. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Appl Environ Microbiol.*, **55**: 1052-1057.
- CHEN, G. e RUSSELL, J. B., 1991. Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation and deamination by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **69**: 2196-2203.
- CHEN, G., RUSSELL, J. B. e SNIFFEN, C. J., 1987. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, **70**: 1211-1219.
- CHENG, K. J., McCOWAN, R. P. e COSTERTON, J. W., 1981. Distribution and enzyme activity of the bacterial population adherent to the epithelium of the bovine rumen. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, **80**: 105.
- CHESSON, A. e FORSBERG, C. W., 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In P.N. Hobson and C.5. Stewart (eds.) *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London. pp. 329-381.
- CHESSON, A., FORSBERG, C. W. e GRENET, E. 1995. Improving the digestion of plant cell walls and fibrous feed. In M. Journet, E. Grenet, M.-H. Farce, M. Thériez e C. Demarquilly (eds.) *Recent Developments in the Nutrition of Herbivores*. Proceedings of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, INRA Editions, Paris pp 249-277.
- CHURCH, D. C., 1988. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Englewood Clifft, Prentice Hall, N. J.
- COLL, J.B., RODRIGO, C.N., GARCÍA; B.S. e TAMAS, R.S., 1992. *Fisiología Vegetal*. Sexta edición. Ediciones Pirámide, S. A., Madrid.
- COLLINS, M., 1988. Composition and fibre digestion in morphological components of an alfalfa-timothy sward. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **19**:135-143.

- COLONNA, P., BULÉON, A., LELOUP, V., THIBAUT, J.-F., RENARD, C., LAHAYE, M. e VIROBEN, G., 1995. Constituants des céréales, des graines, des fruits et de leurs sous-produits. In R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce e M. Journet (eds.) *Nutrition des Ruminants Domestiques-Ingestion et Digestion*. INRA, Paris, pp. 84-121.
- CONE, J. W., VAN GELDER, A. H., VISSCHER, G. J. W. e OUDSHOORN, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **61**: 113-128.
- CONE, J. W., BEUVINK, J. M. W. e RODRIGUES, M. A. M., 1994. Use and application of an automated time related gas production test for the *in vitro* study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, **1**: 25-37.
- CONE, J. W., VAN GELDER, A. H. e DRIEHUIS, F., 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **66**: 31-45.
- CORDESSE, R. e TABA-TABAI, M., 1981. Alimentation d'agneaux à partir d'une paille traitée à l'ammoniac. II – Cinétique biochimique de la dégradation dans le rumen de la paille traitée. *Ann. Zootech.* **30**: 299-312.
- CORREIA, A. A. D. e CORREIA, J. H., 1985. *Bioquímica Animal*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- COULTATE, T.P., 1996. *Food. The Chemistry of its Components*. Third edition. Royal Society of Chemistry Paperbacks, Cambridge.
- CZERKAWSKI, J. W., 1978. Reassessment of efficiency of synthesis of microbial matter in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **61**: 1261-1273.
- DATT, C. e SINHG, G. P., 1995. Effect of protein supplementation on *in vitro* digestibility and gas production of wheat straw. *Indian J. Dairy Sci.*, **48**: 357-361.

- DAWSON, K. A., PREZIOSI, M. C. e CALDWELL, D. R., 1979. Some effects of uncouplers and inhibition on growth and electron transport in rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, **139**: 384-392.
- DEHORITY, B.A., 1993. Microbial cell wall fermentation. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.425-453.
- DEMEYER, D. I. E VAN NEVEL, C. J., 1975. Methanogenesis, na integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In I. W. McDonald e A. C. I. Warner (eds.). *Digestion and Metabolism of the Ruminant*. University of New England Pub. Unit, Australia, pp. 366-382.
- DEMEYER, D. I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In J.-P. Jouany (ed.). *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 217-237.
- DEPARDON, N., DEBROAS, D. E BLANCHART, G., **1995**. Breakdown of peptides from a soya protein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and of two physico-chemical parameters: molecular weight and hydrophobicity. *J. Sci. Food Agric.*, **68**: 25-31.
- DEPARDON, N., DEBROAS, D. E BLANCHART, G., 1996. Breakdown of peptides from a casein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and physicochemical parameters. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**: 457-466.
- EDELMANN, H. G. e FRY, S. C., 1992. Effect of cellulose synthesis inhibition on growth and the distribution of xyloglucan between different cell wall fractions. In M. M. A. Sassen, J. W. M. Derksen, A. M. C. Emons e A. M. C. Wolters-Arts (eds.) *Book of Abstracts-Sixth Cell Wall Meeting*. Nimejen. University Press. Nijmeien. Pp 15.

- ENGELS, F. M. e SCHURMANS, J. L. L., 1992. Relationship between structural development of cell walls and degradation of tissues in maize stems. *J. Sci. Food Agric.*, **59**: 45-51.
- ERASO, F. e HARTLEY, R.D., 1990. Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls-possible factors influencing wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.*, **51**: 163-170.
- ERDMAN, R. A., PROCTOR, G. H. e VANDERSALL, J. H., 1986. Effects of rumen ammonia concentration on *in situ* rate and extent of digestion of feedstuffs. *J. Dairy Sci.*, **69**: 2312-2320.
- FANUTTI, C., PONYI, T., BLACK, G. W., HAZLEWOOD, G. P. e GILBERT, H. J., 1995. The conserved non-catalytic 40-residue sequences in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.*, **270**: 29314-29322.
- FEGEROS, K., ZERVAS, G., STAMOULI, S. e APOSTOLAKI, E., 1995. Nutritive value of dried citrus pulp its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. *J. Dairy Sci.*, **78**: 1116-1121.
- FICK, K. R., AMMERMAN, C. B., MCGOWAN, C. H., LOGGINS, P. E. e CORNELL, J. A., 1973. Influence of supplemental energy and biuret nitrogen on the utilization of low quality roughage by sheep. *J. Anim. Sci.*, **36**: 137-143.
- FINCHER, G.B., STONE, B.A. e CLARKE, A.E., 1983. Arabinogalactan proteins: structure, biosynthesis, and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **34**:47-70.
- FONDEVILA, M. e DEHORITY, V. A., 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**: 541-548.
- FONDEVILA, M., 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrages de baja calidad. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, **15**: 87-106.
- FONDEVILA, M., MUÑOZ, G., CASTRILLO, C., VICENTE, F. e MARTÍN-ORÚE, S. M., 1997. Differences in microbial fermentation of

barley straw induced by its treatment with anhydrous ammonia. *Anim. Sci.*, **65**: 111-119.

FONSECA, A. J. M., 1997. *Ingestão Voluntária e Suplementação Energética de Alimentos Fibrosos em Ovinos*. Tese de Doutorado, UTAD, Vila Real, 279 pp.

FONTY, G. e GOUET, P., 1994. Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. In R. A. Prins; C. S. Stewart (eds.). *Microorganisms in Ruminant Digestion*. Nottingham University Press, pp. 97-112.

FONTY, G. e JOBLIN, K. N., 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In T. Tsuda, Y. Sasaki e R. Kawashima (eds.). *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 655-679.

FONTY, G., JOUANY, J.-P., FORANO, E. e GOUET, Ph. 1995. L'écosystème microbien de réticulo-rumen. In R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, M. Journet (eds.). *Nutrition des Ruminants Domestiques - Ingestion et Digestion*. INRA, Paris, pp 299-347.

FORANO, E., 1998. Les enzymes microbiennes du rumen impliquées dans la dégradation des parois végétales. *C. R. Académie d'Agriculture de France*, **84**, 1, 149-158.

FORANO, E.; BROUSSOLLE, V. e DURAND, R. (1996). DEGRADATION OF PLANT CELL WALL POLYSACCHARIDES BY RUMEN BACTERIA AND FUNGI. *ANN. ZOOTECH.*, **45**, SUPPL.: 291-295.

FRANCE, J. e THORNLEY, J. H. M., 1987. Growth functions. In J. France e J. H. M. Thornley (eds.). *Mathematical Models in Agriculture*. Butterworths, London, pp. 75-94.

FRANCE, J., DHANOA, M. S., THEODOROU, M. K, LISTER, S J., DAVIES, D. R. e ISAC, D., 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theoret. Biol.* **163**: 99-111.

- FRY, S. C., 1991. Cell wall-bound proteins. In P.M. Dey (ed.) *Methods in Plant Biochemistry-Carbohydrates*. Vol. 5. Academic Press, New York. pp. 307-331.
- GETACHEW, G., BLÜMMEL, M., MAKKAR, H. P. S. e BECKER, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **72**:261-281.
- GIGER-REVERDIN, S., 1995. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **55**: 295-334.
- GOERING, H. K., and VAN SEST, P. J., 1970. Forage fiber analyses. Apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agriculture Handbook N° 379*. Agricultural Research Service, USDA, 20pp.
- GORDON, A. H., LOMAX, J. A., DALGARNO, K. e CHESSON, A., 1985. Preparation and composition of mesophyll, epidermis and fibre cell walls from leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). *J. Sci. Food Agric.*, **36**: 509-519.
- GORDON, A.J. e NEUDOERFFER, T. S., 1973. Chemical and *in vivo* evaluation of a brown midrib mutant of *Zea mays*. I. Fibre, lignin and aminoacid composition and digestibility for sheep. *J. Sci Food Agric.*, **24**: 565-577.
- GRENET, E. e BESLE, J. M., 1991. Microbes and fiber degradation. In J.-P. Jouany (ed.). *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 107-129.
- GRENET, E., JAMOT, J., FONTY, G. e BERNALIER, A., 1989. Kinetic study of the degradation of wheat straw and maize stem by pure cultures of anaerobic rumen fungi observed by scanning electron microscopy. *AJAS*, **2**: 456-457.
- GRISWOLD, K. E., HOOVER, W. H., MILLER, T. K. e THAYNE, W. V., 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, **74**: 483-491.

- GROOT, J. C. J., CONE, J. W., WILLIAMS, B. A., DEBERSAQUES, F. M. A. e LANTINGA, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **64**: 77-89.
- HALL, M. B., PELL, A. N. e CHASE, L. E., 1998. Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **70**: 23-39.
- HALUK, J. P., 1994. Composition chimique du bois. In P. Jodin (ed.). *Le Bois Matériau d'Ingénierie*. Association Pour la Recherche Sur le Bois en Lorraine – ENGREF, France, pp. 53-89.
- HARRISON, D. G. e McALLAN, A. B., 1980. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen. In Y. Ruckebusch e P. Thivend (eds.). *Digestive and Metabolism in Ruminants*. MTP Press, Lancaster, pp. 205-226.
- HARTLEY, R.D., 1990. Phenolic monomers and dimers of the plant cell wall and their effects on fiber utilisation. In D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson e P.J. Harris (eds.) *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilisation by Ruminants*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., USA, pp.183-194.
- HATFIELD, R. D., 1993. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.285-313.
- HATFIELD, R. D., 1989. Structural polysaccharides in forages and their degradability. *Agron. J.*, **81**: 39-46.
- HENRIQUE, W., LEME, P. R., LANNA, D. P. D., COUTINHO FILHO, J. L. V., PERES, R. M., JUSTO, C. L., SIQUEIRA, P. A. E ALLEONI, G. F., 1998. Substituição de amido por pectina em dietas com diferentes níveis de

- concentrado. 1-Desempenho animal e características da carcaça. *Rev. Bras. Zootec.*, **27**: 1206-1211.
- HEREDIA, A., GUILLÉN, R., JIMÉNEZ e FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., 1993. Review: Plant cell wall structure. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **33**: 113-131.
- HOOD, 1992. Cellular and molecular biology of maize extensin. In M.M.A. Sassen, J.W.M. Derksen, A.M.C. Emons e A.M.C. Wolters-Arts (eds.) *Book of Abstracts-Sixth Cell Wall Meeting*. Nijmegen. University Press, Nijmegen, pp 238.
- INRAP, 1984. *Alimentation des bovins*. I. T. E. B., Paris, France.
- IYO, A H. e FORSBERG, C. W., 1996. Endoglucanase G from *Fibrobacter succinogenes* S85 belongs to a class of enzymes characterized by a basic C-terminal domain. *Can. J. Microbiol.*, **42**: 934-943.
- JARRIGE, R., 1981. Constituants glucidiques des fourrages: variations, digestibilité et dosage. In C. Demarquilly (ed.) *Prévision de la Valeur Nutritive des Aliments des Ruminants*. INRA Publications, Versailles, pp 19- 40.
- JARRIGE, R., GRENET, E., DEMARQUILLY, C., BESLE, J.-M., 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, M. Journet (eds.) *Nutrition des Ruminants Domestiques-Ingestion et Digestion*. INRA, Paris, pp 25-- 81.
- JENKINSON, H. F. e WOODBINE, M., 1979. Growth and energy production in *Bacteroides amylophilus*. *Arch. Microbiol.*, **120**: 275-281.
- JOHNSON, R. R., 1976. Influence of carbohydrate solubility on non-protein nitrogen utilization in the ruminant. *J. Anim. Sci.*, **43**: 184-191.
- JOUANY, J.-P. e USHIDA, K., 1994. Plant cell-wall degradation by rumen protozoa. In R. A. Prins e C. S. Stewart (eds.). *Microorganisms in Ruminant Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 69-78.

- JOUANY, J.-P., BROUDISCOU, L., PRINS, R.A. e KOMISARCZUK-BONY, S., 1995. Métabolism et nutrition de la population microbienne du rumen. In R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, M. Journet (eds.) *Nutrition des Ruminants Domestiques-Ingestion et Digestion*. INRA, Paris, pp. 349-381.
- JOUANY, J.-P., IVAN, M., PAPON, Y. e LASSALAS, B., 1992. Effects of *Isotricha*, *Eudiplodinium*, *Epidinium* + *Entodinium* and a mixed population of rumen protozoa on the *in vitro* degradation of fish-meal, soybean and casein. *Can. J. Anim. Sci.*, **72**:, 871-880.
- JUNG, H.G. e DEETZ, D.A., 1993. Cell wall lignification and degradability. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.315-346.
- JUNG, H.G. e VAREL, V.H., 1988. Influence of forage type on ruminal bacterial populations and subsequent *in vitro* fiber digestion. *J. Dairy Sci.*, **71**:1526-1535.
- JUNG, H.G., 1989. Forage lignin and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.*, **81**: 33-38.
- KAYOULI, C., USHIDA, K., De SMET, S., JOUANY, J.-P. e DEMEYER, D. I., 1988. Influence des protozoaires cilies du rumen sur la dégradation in sacco de la paille de blé et de la luzerne. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **28**: Suppl. 1, 87-88.
- KEEGSTRA, K., TALMADGE, K. W.,BAUER, W. D. e ALBERSHEIM, P., 1973. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension cultured sycamore cells based on interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.*, **51**: 188-196.
- KENKLIES, J., ZIEHN, R., FRITSCHKE, K., PICH, A. e ANDREESEN, J. R., 1999. Proline biosynthesis from L-ornithine in *Clostridium sticklandii*: purification of delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase, and sequence and expression of the encoding gene, proC. *Microbiology*, **145**: 819-826.

- KENNEDY, P. M. e MILLIGAN, L. P., 1978. Effects of cold exposure on digestion, microbial synthesis and nitrogen transformation in sheep. *Br. J. Nutr.*, **39**: 105-117.
- KHAZAAL, K. e ØRSKOV, E. R., 1994. The in vitro gas production technique: na investigation on its potential use with insoluble polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **47**: 305-320.
- KHAZAAL, K., DENTINHO, M. T., RIBEIRO, J. M. e ØRSKOV, E. R., 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.*, **57**: 105-112.
- KIRB, J., MARTIN, J. C., DANIEL, A. S. e FLINT, H. J., 1997. Dockerin-like sequences in cellulases and xylanases from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters*, **149**: 213-219.
- KÖSTER, H. H., COCHRAN, R. C., TITGEMEYER, E. C., VANZANT, E. S., ABDELGADIR, I. e ST-JEAN, G., 1996. Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tall-grass-prairie forage by beef cows. *J. Anim. Sci.*, **74**: 2473-2481.
- KRISHNAMOORTHY, U., STEINGASS, H. e MENKE, K. H., 1991. Preliminary observation on the relationship between gas production and microbial protein synthesis in vitro. *Arch. Anim. Nutr.*, **41**: 521-526.
- KROOP, J. R., JOHNSON, R. R., MALES, J. R. e OWENS, F. N., 1977. Microbial protein synthesis with low-quality roughage ration: level and source of nitrogen. *J. Anim. Sci.*, **46**: 844-854.
- LAPIERRE, C., 1993. Application of new methods for the investigation of ligninstructure. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of

Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.133-166.

LENG, R. A. e NOLAN, J. V., 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, **67**: 1072-1089.

LENG, R. A., 1982. Modification of rumen fermentation. In J. B. Hacker (ed.). *Nutritional Limits to Animal Production from Pastures*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, UK, pp. 427-453.

MADSEN, J., 1985. The basis for the proposed Nordic protein evaluation system for ruminants: the AAT-PBV system. *Acta Agric. Scand.* **25** (Suppl.), 9-20.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; ABEL, HJ e SZEGLETTI, C., 1995. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC. *J. Sci. Food Agric.*, **69**: 495-500.

MALBURG, S. R., MALBURG, L. M. JR, LIU, T., IYO, A H. E FORSBERG, C. W., 1997. Catalytic properties of the cellulose-binding endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 898-906.

MALES, J. R., PRITCHARD, R. H. e WIEMEIER, R. D., 1981. Fibre sources for cattle in the Pacific northwest region of the USA. In J. A. Kategile, A. N. Said, F. Sundstol, (eds.). *Utilization of Low-Quality Roughages in Africa*. AAS, Norway, pp. 125-130.

MARTIN, S. A., 1992. Factors affecting glucose uptake by the ruminal bacterium *Bacteroides ruminicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**:104-108.

MATHIS, C. P., COCHRAN, R. C., HELDT, J. S., WOODS, B. C., ABDELGADIR, I. E. O., OLSON, K. C., TITGEMEYER, E. C. e VANZANT, E. S., 2000. Effects of supplemental degradable intake protein on utilization of medium to low-quality forages. *J. Anim. Sci.*, **78**: 224-232.

- McCOLLUM, F. T. e HORN, G. W., 1990. Protein supplementation of grazing livestock: a review. *Prof. Anim. Sci.* **6**: 1-16.
- McDOUGALL, G., MORRISON, I.M., STEWART, D. e HILLMAN, J.R., 1996, Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J.Sci. Food Agric.*, **70**: 133-150.
- McNEILL, M., DARVILL, A.G., FRY, S.C. e ALBERSHEIM, P., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 625-663.
- MEHREZ, A. Z. e ØRSKOV, E. R., 1977. A study on the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.*, **88**: 645-650.
- MEHREZ, A. Z., ØRSKOV, E. R. e McDONALD, I., 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.*, **38**: 437-443.
- MENKE, K. H., RAAB, L., SALEWSKI, A., STEINGASS, H., FRITZ, D. e SCHENEIDER, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.*, **93**: 217-999.
- MONTEIRO, A. L. G., GARCIA, C. A., NERES, M. A. e PRADO, O. R., 1998. Desempenho e características quantitativas das carcaças de cordeiros alimentados com polpa cítrica em substituição ao milho. *UNIMAR Ciências*, **7**: 65-70.
- MONTIES, B., 1991. Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **32**: 159-175.
- MORRISON, I. M., 1980. Hemicellulosic contamination of acid detergent residues and their replacement by cellulose residues in cell wall analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **31**: 639-645.

- MOSS, A. R., GIVENS, D. I. e PHIPPS, R. H., 1992. Digestibility and energy value of combinations of forage mixtures. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, **39**: 151-172.
- MOUNE, S., MANAC'H, N., HIRSCHLER, A., CAUMETTE, P., WILLISON, J. C. e MATHERON, R., 1999. *Haloanaerobacter salinarius* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**: 103-112.
- NAGA, M. A. e HARMEYER, J. H., 1975. Gas and volatile fatty acid production at different rates of rumen microbial protein synthesis *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **40**: 374-379.
- NOLAN, J. V. e LENG, R. A., 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* **27**: 177-194.
- NOLAN, J. V. e STACHIW, S., 1979. Fermentation and nitrogen dynamics in Merino sheep given a low-quality-roughage diet. *Br. J. Nutr.* **42**: 63-80.
- NSAHLAI, I. V., SIAW, D. E. K. A. e OSUJI, P. O., 1994. The relationship between gas production and chemical composition of 23 browses of the genus *Sesbania*. *J. Sci. Food Agric.*, **65**: 13-20.
- NUGENT, J. H. A. e MANGAN, J. L., 1978. Rumen proteolysis of fraction I leaf protein, casein and bovine serum albumin. *Proc. Nutr. Soc.* **37**: 2, 48A.
- OBST, J. R., 1993. Analysis of plant cell walls-session synopsis. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.167-182.
- ORPIN, C. G.; 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, **10**: 121-143.

- ØRSKOV, E. R. e McDONALD, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rates of passage. *J. Agric. Sci.*, **92**: 499-503.
- OTTON, J. F. e DOREAU, M., 1996. Influence of niacin on *in vitro* ruminal fermentation and microbial synthesis depending on dietary factors. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **58**: 187-199.
- PEDRONA, R., ZANNETTI, G. e TRENTI, F., 1994. La sindrome alcalosi ruminale: pododermatite asettica diffusa del bovino. *Proc. 18th World Buiatrics Congress, Bologna, Italy, Vol. 1*: 439-442.
- PELL, A. N. e SCHOFIELD, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, **76**: 1063-1073.
- PELL, A. N., SCHOFIELD, P. e STONE, W. C., 1993. Rates of digestion of feeds measured *in vitro* with computers. *Proceeding of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufactures 55th Meeting, Cornell University, Ithaca, N. Y.*, pp. 74-81.
- PRASAD, C. S., WOOD, C. D. e SAMPATH, K. T., 1994. Use of *in vitro* gas production to evaluate rumen fermentation of untreated and urea treated finger millet straw (*Eleusine coracana*) supplemented with different levels of concentrate. *J. Sci. Food Agric.*, **65**: 457-464.
- PRITCHARD, R. H. e MALES, J. R., 1985. Effect of crude protein and ruminal ammonia-N on digestibility and ruminal outflow in beef cattle fed wheat straw. *J. Anim. Sci.*, **60**: 822-831.
- RALPH, J. e HELM, R.F., 1993. Lignin/hydroxynnamie acid/polyssacharide complexes: synthetic models for regiochemical characterisation. In H. G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.201-246.

- RANI, L. N., CHOUDHURI, P. C. e SUNDAR, S. N., 1998. Physico-chemical and microbial changes of rumen liquor in buffaloes during experimentally induced rumen alkalosis. *Cheiron*, **27**: 116-120.
- RÉMOND, D., CHAISE, J. P., DELVAL, E. e PONCET, C., 1993a. Net flux of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with orchardgrass hay. *J. Anim. Sci.*, **71**: 2529-2538.
- RÉMOND, D., CHAISE, J. P., DELVAL, E. e PONCET, C., 1993b. Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep. *J. Anim. Sci.*, **71**: 2785-2792.
- RÉMOND, D.; MESCHY, F. e BOIVIN, R., 1996. Metabolites, water and mineral exchanges across the rumen wall: mechanisms and regulation. *Ann. Zootech.*, **45**: 97-119.
- RIHANI, N., GARRETT, W. N. e ZINN, R. A., 1993a. Effect of source of supplemental nitrogen on the utilization of citrus pulp-based diets by sheep. *J. Anim. Sci.*, **71**: 2310-2321.
- RIHANI, N., GARRETT, W. N. e ZINN, R. A., 1993b. Influence of level of urea and method of supplementation on characteristics of digestion of high-fiber diets by sheep. *J. Anim. Sci.*, **71**: 1657-1665.
- ROBERT, D. e ROLAND, J. C., 1989. *Biologie végétale. I organisation cellulaire*. Doin, Paris.
- ROBERTSON, J.B. e VAN SOEST, P.J., 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. In W.P.T. James e O. Theander (eds.) *The Analysis of Dietary Fibers*. Marcell Dekker, New York, pp. 123-158.
- ROCHA FILHO, R. R., MACHADO, P. F., D'ARCE, R. D. e FRANCISCO Jr, J. C., 1999. Polpa de citinos e de milho e a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen. *Scientia Agrícola*, **56**: 471-477.
- RODRIGUES, M. A., 1999. *O Ruminante e a Biodegradação da Fibra – Alguns Aspectos da Estrutura da Parede Celular, da Aderência Bacteriana e do*

- Efeito da Lenhina e dos Ácidos Fenólicos na Degradação e Fermentação de Alimentos Fibrosos*. Tese de Doutorado, UTAD, Vila Real, 289 pp.
- RODRIGUES, M. A., CERDEIRA, C. M. E SEQUEIRA, C. A., 1999. Cinética de degradação em fenos de prado natural. Estudo comparativo de três metodologias. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, ano **VI**, nº2: 69-85.
- RONQUILLO, M. G., FONDEVILA, M., BARRIOS URDANETA, A. e NEWMAN, Y., 1998. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilization and the season of growth. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **72**: 19-32.
- RUSSELL, J. B. e BALDWIN, R. L., 1979. Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 537-543.
- RUSSELL, J. B. e COOK, G. M., 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.*, **59**: 48-62.
- RUSSELL, J. B. e DOMBROWSKI, D. B., 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 604-610.
- RUSSELL, J. B. e HINO, T., 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that leads to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* **68**: 1712-1721.
- RUSSELL, J. B. e WALLACE, R. J., 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In P. N. Hobson e C. S. Stewart (eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 246-381.
- RUSSELL, J. B., 1986. Heat production by ruminal bacteria in continuous culture and its relationship to maintenance energy. *J. Bacteriol.*, **168**: 694-701.
- RUSSELL, J. B., O'CONNOR, J. D., FOX, D. G., VAN SOEST, P. J. e SNIFFEN, C. J., 1992. A net carbohydrate and protein system for

- evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.*, **70**: 3551-3561.
- SAHU, S., BASAK, D. N., MUKHERJEE, B. N. e CHAKRABARTI, A., 1994. Urea induced alkaline indigestion in goats: a clinical study. *Indian Vet. J.*, **71**: 1125-1127.
- SAHU, S., CHAKRABARTI, A., PAN, S., BASAK, D. N., MUKHERJEE, B. N., 1993. Physico-biochemical changes in rumen liquor in urea induced ruminal alkalosis in goats. *Indian J. Vet. Med.*, **13**: 61-63.
- SASSEN, M.M.A., 1992. Interpretation of cell wall structures. In M.M.A. Sassen, J.W.M. Derksen, A.M.C. Emons e A.M.C. Wolters-Arts (eds.) *Book of Abstracts-Sixth Cell Wall Meeting*. Nijmegen. University Press, Nijmegen, pp 61.
- SCALBERT, A., MONTIES, B., LALLEMAND, J.Y., GNITTET, E. e ROLANDO, C., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, **24**:1359-1362.
- SCHOFIELD, P. e PELL, A. N., 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.*, **73**: 3455-3463.
- SCHOFIELD, P., PITT, R. E. e PELL, A. N., 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.*, **72**: 2980-2991.
- SCOTT, R. R. e HIBBERD, C. A., 1990. Incremental levels of supplemental ruminal degradable protein for beef cows fed low quality native grass hay. Okla. State Univ. Anim. Sci. Res. Rep. MP **129**: 57-63.
- SELINGER, L. B., FORSBERG, C. W. e CHENG, K. J., 1997. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, **2**, 263-284.
- SELVENDRAN, R. R., 1983. The chemistry of plant cell walls. In G.G. Burch e K.J. Parker (eds.) *Dietary Fiber*. Appl. Sci. Publ., New York, pp 95-147.

- SEQUEIRA, C. A., 1988. *Efeito da adição de sais sódicos ao rúmen na utilização digestiva da fibra*. Tese de Doutorado, UTAD, Vila Real, 233pp.
- SHILOACH, J. e BAUER, R. A. S., 1975. High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**: 227-239.
- SHOWALTER, A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins, *Plant Cell*, **5**: 9-23.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1980. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. 2nd edition, McGraw-HW, Inc.
- STEFANON, B., PELL, A. N. e SCHOFIELD, P., 1996. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *J. Anim. Sci.*, **74**:1104-1115.
- STEWART, C. S., FLINT, H. J. E BRYANT, M. P., 1997. The rumen bacteria. In P. N. Hobson, C. S. Stewart (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 10-72.
- STOUTHAMER, A. H. e BETTENHAUSSEN, C., 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **301**: 53-70.
- STOUTHAMER, A. H., 1979. The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. In J. R. Quayle (ed.). *International Review of Biochemistry and Microbial Biochemistry*. University Park Press, Baltimore, pp. 1-47.
- STRITZLER, N. P., WOLSTRUP, J., EGGUM, B. O. e JENSEN, B. B., 1992. Factors affecting degradation of barley straw *in sacco* and microbial activity in the rumen of cows fed fiber-rich diets. I: The source of supplemental nitrogen. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **38**: 263-280.
- STRITZLER, N. P., WOLSTRUP, J., EGGUM, B. O. e JENSEN, B. B., 1998. Factors affecting degradation of barley straw *in sacco* and microbial

activity in the rumen of cows fed fiber-rich diets. II: The level of supplemental fishmeal. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **70**: 11-22.

SUSMEL, P. e STEFANON, B., 1993. Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. *J. Biotechnol.*, **39**:141-148.

TAMMINGA, S., 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.*, **49**: 1615-1630.

TANIGUCHI, K., ZHAO, Y., UCHIKAWA, H. e OBITSU, T. 1999. Digestion site and extent of carbohydrate fractions in steers offered by-product diets, as determined by detergent and enzymatic methods. *Anim. Sci.*, **68**: 173-182.

TEMPEST, D. W. e NEIJSSEL, O. M., 1978. Eco-physiological aspects of microbial growth in aerobic nutrient-limited environments. *Adv. Microb. Ecol.* **2**: 105-153.

TEMPEST, D. W. e NEIJSSEL, O. M., 1984. The status of Y_{ATP} and maintenance energy as biologically interpretabel phenomena. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 459-486.

THEANDER, O. e ÅMAN, P., 1977. The chemistry of fibre components of forage and their determination. *In Proceedings of the NJF Roughage Symposium, Quality of Forage*. Uppsalla, pp. 1-26.

THEANDER, O., WESTERLUND, E., AMAN, P. e GRAHAM, H., 1989. Plant cell walls and monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **23**: 205-225.

THEODOROU, M. K., WILLIAMS, B. A., DHANOA, M. S., McALLEN, A. B., e FRANCE, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anirn. Feed Sci. Technol.*, **48**: 185-197.

THIBAUT, J. F. e COLONNA, P., 1986. Bases moléculaires des phénomènes de gélification des polysaccharides. Monographie APRIA, pp. 77-113.

- THOMAS R.J., 1983, The plant cell wall-wood anatomy and permeability. In E.J. Solt (ed.) *Wood and Agricultural Residues-Research on use for feed, fuels, and chemicals*. Academic Press, New York, pp 1-32.
- THOMPSON, J.A., 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microb.Rev.*, **104**: 65-82.
- TILLEY, J. M. A. e TERRY, R. A., 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forrage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, **18**: 104-111.
- TOMME, P., BORASTON, A., McLEAN; B., KORMOS, J., CREAGH, A. L., STURCH, K., GILKES, N. R., HAYNES, C. A., WARREN, R. A. e KILBURN, D. G., 1998. Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **715**(1): 283-296.
- TOMME, P., CREAGH, A L., KILBURN, D. G. e HAYNES, C. A., 1996. Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC.1. binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry*, **35**: 13885-13894.
- TOMME, P., WARREN, R. A. e GILKES, N. R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.*, **37**: 1-81.
- USHIDA, K. e JOUANY, J.-P., 1986. Influence des protozoaires sur la dégradation des protéines mesuré *in vitro* et *in sacco*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **26**: 293-294.
- USHIDA, K., KAYOULI, C. SMET, S. e JOUANY, J.-P., 1990. Effect of defaunation on proteis and fiber digestion in sheep fed on ammonia-treated straw based diets with or without maize. *Br. J. Nutr.*, **64**: 765-775.
- VAN NEVEL, C. J. e DEMEYER, D. I. (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monitoring Assessm.*, **42**: 73-97.
- VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B. e LEWIS, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, **74**: 3583-3597.

- VAN SOEST, P.J., 1993. Cell wall matrix interactions and degradation-session synopsis. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield e J. Ralph (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA, pp.377-396.
- VAN SOEST, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd edition. Cornell University Press, New York.
- VAREL, V. H., YEN, J. T. e KREIKMEIER, K. K., 1995. Addition of cellulolytic clostridia to the bovine rumen and pig intestinal tract. *Appl. Environmental Microbiol.*, **61**: 1116.
- VARNER, J. E. e LIN, L.S., 1989. Plant cell wall architecture. *Cell*. **56**: 231-239.
- VAZ PORTUGAL, A., 1978. The rumen and the ruminant. *Cong. Mundial de Alimentacion Animal*, Madrid, pp 13-37.
- VENKATESWARLU, M., CHOUDHURI, P. C. e REDDY, J. S., 1998. Biochemical changes in rumen liquor and blood in clinical cases of alkaline indigestion in buffaloes. *Indian Vet. J.*, **75**: 438-440.
- WAGHORN, G. C. E STAFFORD, K. J., 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *N. Z. J. Agric. Res.*, **36**: 493-497.
- WALLACE, G., 1989. *A Study of Phenolic-Carbohydrate Linkages in the Gramineae*. Ph. D. Thesis. University of Glasgow, 227 pp.
- WALLACE, R. J., 1983. Hydrolysis of ¹⁴C-labelled proteins by rumen microorganisms and by proteolytic enzymes prepared from rumen bacteria. *Br. J. Nutr.*, **50**: 345-355.
- WALLACE, R. J. e COTTA, M. A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In P. N. Hobson (ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 217-249.
- WALLACE, R. J. e JOBLIN, K. N., 1985. Proteolytic activity of rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.*, **29**: 19-25.

- WALLACE, R. J. e McKAIN, N., 1991. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. *J. General Microbiol.*, **137**: 2259-2264.
- WALLACE, R. J. e McPHERSON, C. A., 1987. Factors affecting the rate of breakdown of bacterial protein in rumen fluid. *Brit. J. Nutr.*, **58**: 313-323.
- WALLACE, R. J., 1991. Rumen proteolysis and its control. In J.-P. Jouany (ed.). *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 131-150.
- WALLACE, R. J., 1996. The proteolytic systems of ruminal microorganisms. *Ann. Zootech.*, **45**, Suppl.: 301-308.
- WALLACE, R. J., McKAIN, N. e NEWBOLD, C. J., 1990a. Metabolism of small peptides in rumen fluid. Accumulation of intermediates during hydrolysis of alanine oligomers, and comparison of peptidolytic activities of bacteria and protozoa. *J. Sci. Food Agric.*, **50**: 191-199.
- WALLACE, R. J., NEWBOLD, C. J. e McKAIN, N., 1990b. Patterns of peptide metabolism by rumen microorganisms. In S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato, H. Itabashi (eds.). *The Rumen Ecosystem. The Microbial Metabolism and its Regulations*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, pp. 43-49.
- WALLACE, R. J., ONODERA, R. e COTTA, M. A., 1997. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In P. N. Hobson e C. S. Stewart (eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 282-328.
- WEBSTER, J., 1993. *Understanding the dairy cow*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.
- WEIMER, P.J., 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy. Sci.*, **79**:1496-1502.
- WESTLAKE, K. e MACKIE, R. I., 1990. Peptide and amino acid transport in *Streptococcus bovis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**: 97-102.

- WHITE, B. A., MACKIER, R. I. e DOERNER, K. C., 1993. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In H. G. Jung, D.R. Buxton, R. D. Hatfield e J. Ralph (eds.). *Forage Cell Wall Structure and Digestability*. American Society of Agronomy - Crop Science Society of America-Soil Science Society of America, Madison, USA, pp. 455-484.
- WIEDMEIER, R. D., MALES, J. R. e GASKINS, C. T., 1983. Effect of dietary crude protein on the dry matter digestibility of wheat straw diets in cattle. *J. Anim. Sci.*, **57**: 1568-1575.
- WILKINSON, L., HILL, M., WELMA, J.P. e BIERKENNBEUEL, G.K., 1992. *Systat for windows: Statiftics*. 5th ed., Evanston, I.L., Systat Inc., 750 pp.
- WILLIAMS, A. G. e COLEMAN, G. S., 1988. The rumen protozoa. In P. N. Hobson (ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 77-128.
- WILLIAMS, A. G. e COLEMAN, G. S., 1991. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag, New York.
- WILLIAMS, A. G., WITHERS, S. E. e COLEMAN, G. S., 1984. Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Curr. Microbiol.* **10**: 287-294.
- WILSON, J.R. e MERTENS, D.R., 1995. Cell wall acessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.*, **35**: 251-259.
- WILSON, P. N. e BRIGSTOCKE, T. D. A., 1981. *Improved feeding of cattle and sheep*. Granada Publishing Limited, London, UK.
- WINTERHALTER, C., HEINRICH, P., CANDUSSIO, A., WICH, G. e LIEBL, W., 1995. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol.*, **15**: 431-444.
- WOOD, C. D. e MANYUCHI, B., 1997. Use of na in vitro gas production method to investigate interactions between veld hay and Napier hay or groundnut hay supplements. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, **67**: 265-278.

- YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D e BOLAND, M. P., 1999. Effects of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, **51**: 1259-1266.
- ZEOULA, L. M., MARTINS, A. S., PRADO, I. N., ALCALDE, C. R., BRANCO, A. F. e SANTOS, G. T., 1999. Solubilidade e degradabilidade ruminal do amido de diferentes alimentos. *Rev. Bras. Zootec.*, **28**: 898-905.

ANEXOS

Quadro 1.A – Composição química dos alimentos utilizados (g.kg MS⁻¹)
(MO - matéria orgânica; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL – lenhina de detergente ácido; Hemic - Hemiceluloses; Celul - celulose).

Alimento	MO	PB	NDF	ADF	ADL	Hemic	Celul
F	944,40	80,10	649,40	413,20	62,90	236,200	350,300
F	937,90	79,80	657,10	420,60	60,50	236,500	360,100
F	935,40	78,60	654,60	405,40	58,40	249,200	347,000
F	948,30	83,90	646,00	413,80	63,10	232,200	350,700
FU	954,22	115,55	642,05	388,35	56,81	253,701	331,532
FU	950,40	120,52	638,70	384,54	61,20	254,163	323,333
FU	-	120,76	642,97	390,54	60,28	252,430	330,262
FU	-	121,13	640,32	389,15	60,28	251,161	328,876
FUP	943,20	117,69	485,87	324,11	37,71	161,764	286,394
FUP	940,53	119,40	478,91	319,58	39,11	159,327	280,476
FUP	-	122,56	483,20	330,14	40,03	153,060	290,108
FUP	-	121,47	481,93	324,11	42,70	157,819	281,404
2FU	950,23	159,71	650,01	383,53	57,71	266,475	325,822
2FU	945,56	159,34	637,74	385,75	58,88	251,989	326,873
2FU	-	160,69	643,47	391,83	57,24	251,638	334,584
2FU	-	160,08	644,87	381,31	60,16	263,555	321,148
2FUP	949,78	160,63	481,67	324,17	37,58	157,504	286,592
2FUP	956,52	161,24	466,48	325,68	38,62	140,803	287,056
2FUP	-	161,12	469,50	327,77	38,16	141,730	289,608
2FUP	-	159,90	460,80	333,68	38,74	127,116	294,943
Pa	944,50	50,90	908,80	510,70	65,70	398,100	445,000
Pa	951,20	52,50	869,00	530,20	75,30	338,800	454,900
Pa	952,20	47,70	901,40	531,70	77,40	369,700	454,300
Pa	950,90	49,70	896,40	514,60	72,80	381,800	441,800
PaU	954,74	117,73	809,01	472,76	62,56	336,255	410,198
PaU	957,86	119,42	794,52	475,63	66,93	318,890	408,703
PaU	-	120,75	797,74	470,57	56,92	327,169	413,648
PaU	-	119,42	797,40	460,68	57,96	336,714	402,723
PaUP	944,17	120,18	575,21	389,10	52,23	186,116	336,870
PaUP	943,00	121,04	556,25	378,51	51,65	177,741	326,865
PaUP	-	121,77	578,70	386,42	53,97	192,281	332,449
PaUP	-	119,33	572,89	376,42	53,04	196,468	323,377
2PaU	928,08	166,47	813,56	489,49	61,93	324,074	427,560
2PaU	929,37	153,17	811,07	487,59	62,04	323,482	425,547
2PaU	-	160,88	812,85	484,99	60,74	327,863	424,245
2PaU	-	159,76	804,09	485,93	60,03	318,154	425,902
2PaUP	954,86	160,07	557,00	367,95	44,20	189,052	323,742
2PaUP	954,66	159,71	548,57	366,56	43,63	182,011	322,934
2PaUP	-	160,43	552,96	371,64	42,93	181,319	328,705
2PaUP	-	160,46	553,77	377,06	43,63	176,702	333,437
UP	946,38	120,53	207,74	142,94	24,32	64,800	118,618
UP	933,64	118,52	207,50	129,45	23,60	78,045	105,851
UP	-	122,53	208,69	147,95	20,50	60,744	127,447
UP	-	121,65	202,96	134,35	24,68	68,618	109,669
2UP	926,49	163,50	217,50	131,48	22,52	86,022	108,958
2UP	926,99	160,34	209,79	143,77	23,60	66,019	120,165
2UP	-	160,85	218,58	132,44	22,51	86,143	109,928
2UP	-	160,59	209,55	139,07	23,68	70,478	115,391

Quadro 2.A – Análise de variância da fração MO dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2109,727	11	191,793	11,202	,000
Dentro	272,947	16	17,122		
Total	2383,674	27			

Quadro 3.A – Análise de variância da fração PB dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	55513,025	11	5046,639	1018,887	,000
Dentro	178,311	36	4,953		
Total	55691,336	47			

Quadro 4.A – Análise de variância da fração NDF dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2034812,416	11	184982,947	3453,354	,000
Dentro	1928,382	36	53,566		
Total	2036740,798	47			

Quadro 5.A – Análise de variância da fração ADF dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	641566,755	11	58324,250	1647,708	,000
Dentro	1274,299	36	35,397		
Total	642841,054	47			

Quadro 6.A – Análise de variância da fração ADL dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	11138,430	11	1012,585	177,527	,000
Dentro	205,338	36	5,704		
Total	11343,768	47			

Quadro 7.A – Análise de variância da fração hemicelulose dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	417821,611	11	37983,783	362,896	,000
Dentro	3768,071	36	104,669		
Total	421589,682	47			

Quadro 8.A – Análise de variância da fração celulose dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	492046,851	11	44731,532	1504,960	,000
Dentro	1070,018	36	29,723		
Total	493116,869	47			

Quadro 9.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Alimento	V_{FA}	μ_{mA}	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	μ_{mA}/V_{FA}	μ_{mB}/V_{FB}	V
F	23,679	4,201	1,130	163,353	3,599	0,992	0,177	0,022	187,032
F	23,989	8,821	2,597	163,083	3,994	0,992	0,368	0,024	187,072
F	30,374	9,564	1,129	166,883	3,917	0,995	0,315	0,023	197,257
F	27,568	7,958	2,280	166,714	4,298	0,995	0,289	0,026	194,282
FU	23,500	3,345	1,946	161,343	3,060	0,989	0,142	0,019	184,843
FU	25,531	6,208	2,338	160,826	3,283	0,988	0,243	0,020	186,357
FU	20,216	6,977	2,343	150,311	3,556	0,991	0,345	0,024	170,527
FU	26,542	6,334	2,394	160,005	4,007	0,994	0,239	0,025	186,547
FUP	86,555	13,650	2,687	149,020	3,580	0,998	0,158	0,024	235,575
FUP	87,446	13,824	2,015	156,998	3,592	0,998	0,158	0,023	244,444
FUP	83,190	13,324	1,659	168,493	3,257	0,996	0,160	0,019	251,683
FUP	80,920	12,816	1,731	156,418	3,679	0,995	0,158	0,024	237,338
2FU	18,753	5,120	2,915	158,239	2,928	0,989	0,273	0,019	176,992
2FU	17,995	4,112	3,408	157,164	3,205	0,988	0,229	0,020	175,159
2FU	17,992	4,348	3,788	146,592	3,609	0,991	0,242	0,025	164,584
2FU	14,308	4,657	3,686	155,054	3,845	0,990	0,325	0,025	169,362
2FUP	85,976	14,680	3,869	155,675	3,788	0,998	0,171	0,024	241,651
2FUP	78,243	12,656	1,268	150,740	3,199	0,996	0,162	0,021	228,983
2FUP	73,688	12,392	2,723	156,679	3,185	0,996	0,168	0,020	230,367
2FUP	76,092	11,176	0,000	167,690	3,750	0,994	0,147	0,022	243,782

Quadro 10.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	16947,192	4	4236,798	356,837	,000
Dentro	178,098	15	11,873		
Total	17125,290	19			

Quadro 11.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	261,821	4	65,455	30,346	,000
Dentro	32,355	15	2,157		
Total	294,176	19			

Quadro 12.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	7,112	4	1,778	2,308	,106
Dentro	11,557	15	,770		
Total	18,668	19			

Quadro 13.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	246,699	4	61,675	1,758	,190
Dentro	526,157	15	35,077		
Total	772,856	19			

Quadro 14.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,778	4	,194	1,731	,196
Dentro	1,685	15	,112		
Total	2,463	19			

Quadro 15.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,660E-04	4	4,150E-05	12,513	,000
Dentro	4,975E-05	15	3,317E-06		
Total	2,158E-04	19			

Quadro 16.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,735E-02	4	1,434E-02	4,687	,012
Dentro	4,588E-02	15	3,059E-03		
Total	,103	19			

Quadro 17.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	9,700E-06	4	2,425E-06	,399	,807
Dentro	9,125E-05	15	6,083E-06		
Total	1,010E-04	19			

Quadro 18.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo feno de prado natural.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	16768,620	4	4192,155	90,935	,000
Dentro	691,510	15	46,101		
Total	17460,130	19			

Quadro 19.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Alimento	V_{FA}	μ_{mA}	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	μ_{mA}/V_{FA}	μ_{mB}/V_{FB}	V
Pa	15,015	10,205	10,011	203,187	6,004	0,991	0,680	0,030	218,202
Pa	11,564	12,289	10,398	194,167	5,778	0,991	1,063	0,030	205,731
Pa	10,899	9,065	8,984	219,129	6,361	0,996	0,832	0,029	230,028
Pa	14,894	6,707	10,950	202,334	6,029	0,993	0,450	0,030	217,228
PaU	7,807	5,307	11,000	194,722	5,302	0,989	0,680	0,027	202,529
PaU	7,230	5,781	10,932	188,988	5,781	0,990	0,800	0,031	196,218
PaU	6,990	6,130	11,253	198,222	5,859	0,993	0,877	0,030	205,212
PaU	6,255	5,668	11,120	195,937	5,668	0,992	0,906	0,029	202,192
PaUP	52,549	12,406	4,576	214,074	5,507	0,998	0,236	0,026	266,623
PaUP	51,734	11,799	2,847	207,330	4,680	0,998	0,228	0,023	259,064
PaUP	42,118	11,020	3,756	216,715	4,656	0,997	0,262	0,021	258,833
PaUP	44,614	9,728	2,236	215,214	5,443	0,996	0,218	0,025	259,828
2PaU	-	-	15,712	203,065	5,908	0,988	-	0,029	203,065
2PaU	-	-	15,448	191,304	6,125	0,988	-	0,032	191,304
2PaU	-	-	11,940	194,149	6,088	0,988	-	0,031	194,149
2PaU	-	-	11,896	208,787	6,134	0,993	-	0,029	208,787
2PaUP	50,098	10,862	4,118	209,855	5,358	0,998	0,217	0,026	259,953
2PaUP	42,338	9,738	2,166	203,856	4,561	0,997	0,230	0,022	246,194
2PaUP	32,297	9,568	3,673	211,478	4,527	0,997	0,296	0,021	243,775
2PaUP	45,360	10,474	3,508	200,452	5,270	0,996	0,231	0,026	245,812

Quadro 20.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5043,160	3	1681,053	75,888	,000
Dentro	265,820	12	22,152		
Total	5308,980	15			

Quadro 21.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	69,232	3	23,077	12,750	,000
Dentro	21,720	12	1,810		
Total	90,952	15			

Quadro 22.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	357,568	4	89,392	64,306	,000
Dentro	20,851	15	1,390		
Total	378,419	19			

Quadro 23.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	822,054	4	205,513	4,409	,015
Dentro	699,152	15	46,610		
Total	1521,205	19			

Quadro 24.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,528	4	1,132	10,356	,000
Dentro	1,640	15	,109		
Total	6,168	19			

Quadro 25.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,047E-04	4	5,118E-05	15,276	,000
Dentro	5,025E-05	15	3,350E-06		
Total	2,550E-04	19			

Quadro 26.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,201	3	,400	20,450	,000
Dentro	,235	12	1,957E-02		
Total	1,436	15			

Quadro 27.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,748E-04	4	4,370E-05	12,667	,000
Dentro	5,175E-05	15	3,450E-06		
Total	2,265E-04	19			

Quadro 28.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo palha de trigo.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	12535,485	4	3133,871	63,505	,000
Dentro	740,222	15	49,348		
Total	13275,707	19			

Quadro 29.A – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Alimento	V_{FA}	μ_{mA}	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	μ_{mA}/V_{FA}	μ_{mB}/V_{FB}	V
UP	270,674	19,639	0,000	100,932	2,045	0,993	0,073	0,020	371,606
UP	225,678	24,105	1,002	136,539	3,598	0,998	0,107	0,026	362,217
UP	217,692	22,487	0,920	152,030	3,400	0,997	0,103	0,022	369,722
UP	204,573	22,223	1,570	146,258	4,206	0,997	0,109	0,029	350,831
2UP	227,134	26,249	2,844	121,134	3,051	0,999	0,116	0,025	348,268
2UP	207,798	23,198	1,285	135,457	3,640	0,999	0,112	0,027	343,255
2UP	198,375	23,131	1,994	142,043	3,348	0,998	0,117	0,024	340,418
2UP	188,502	20,003	1,656	150,064	4,385	0,997	0,106	0,029	338,566

Quadro 30.A – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1171,474	1	1171,474	2,141	,194
Dentro	3283,594	6	547,266		
Total	4455,068	7			

Quadro 31.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,129	1	2,129	,429	,537
Dentro	29,751	6	4,958		
Total	31,880	7			

Quadro 32.A – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,297	1	2,297	5,309	,061
Dentro	2,597	6	,433		
Total	4,894	7			

Quadro 33.A – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	20,927	1	20,927	,062	,812
Dentro	2025,353	6	337,559		
Total	2046,280	7			

Quadro 34.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,173	1	,173	,298	,605
Dentro	3,477	6	,579		
Total	3,649	7			

Quadro 35.A – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	8,000E-06	1	8,000E-06	2,743	,149
Dentro	1,750E-05	6	2,917E-06		
Total	2,550E-05	7			

Quadro 36.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,351E-04	1	4,351E-04	2,817	,144
Dentro	9,268E-04	6	1,545E-04		
Total	1,362E-03	7			

Quadro 37.A – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	8,000E-06	1	8,000E-06	,756	,418
Dentro	6,350E-05	6	1,058E-05		
Total	7,150E-05	7			

Quadro 38.A – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos substratos contendo polpa de citrinos desidratada.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	879,251	1	879,251	16,480	,007
Dentro	320,121	6	53,354		
Total	1199,373	7			

Quadro 1.B – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás dos substratos utilizados.

Alimento	V_{FA}	μ_{mA}	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	μ_{mA}/V_{FA}	μ_{mB}/V_{FB}	V
F	23,679	4,201	1,130	163,353	3,599	0,992	0,177	0,022	187,032
F	23,989	8,821	2,597	163,083	3,994	0,992	0,368	0,024	187,072
F	30,374	9,564	1,129	166,883	3,917	0,995	0,315	0,023	197,257
F	27,568	7,958	2,280	166,714	4,298	0,995	0,289	0,026	194,282
FU	23,500	3,345	1,946	161,343	3,060	0,989	0,142	0,019	184,843
FU	25,531	6,208	2,338	160,826	3,283	0,988	0,243	0,020	186,357
FU	20,216	6,977	2,343	150,311	3,556	0,991	0,345	0,024	170,527
FU	26,542	6,334	2,394	160,005	4,007	0,994	0,239	0,025	186,547
FUP	86,555	13,650	2,687	149,020	3,580	0,998	0,158	0,024	235,575
FUP	87,446	13,824	2,015	156,998	3,592	0,998	0,158	0,023	244,444
FUP	83,190	13,324	1,659	168,493	3,257	0,996	0,160	0,019	251,683
FUP	80,920	12,816	1,731	156,418	3,679	0,995	0,158	0,024	237,338
2FU	18,753	5,120	2,915	158,239	2,928	0,989	0,273	0,019	176,992
2FU	17,995	4,112	3,408	157,164	3,205	0,988	0,229	0,020	175,159
2FU	17,992	4,348	3,788	146,592	3,609	0,991	0,242	0,025	164,584
2FU	14,308	4,657	3,686	155,054	3,845	0,990	0,325	0,025	169,362
2FUP	85,976	14,680	3,869	155,675	3,788	0,998	0,171	0,024	241,651
2FUP	78,243	12,656	1,268	150,740	3,199	0,996	0,162	0,021	228,983
2FUP	73,688	12,392	2,723	156,679	3,185	0,996	0,168	0,020	230,367
2FUP	76,092	11,176	0,000	167,690	3,750	0,994	0,147	0,022	243,782
Pa	15,015	10,205	10,011	203,187	6,004	0,991	0,680	0,030	218,202
Pa	11,564	12,289	10,398	194,167	5,778	0,991	1,063	0,030	205,731
Pa	10,899	9,065	8,984	219,129	6,361	0,996	0,832	0,029	230,028
Pa	14,894	6,707	10,950	202,334	6,029	0,993	0,450	0,030	217,228
PaU	7,807	5,307	11,000	194,722	5,302	0,989	0,680	0,027	202,529
PaU	7,230	5,781	10,932	188,988	5,781	0,990	0,800	0,031	196,218
PaU	6,990	6,130	11,253	198,222	5,859	0,993	0,877	0,030	205,212
PaU	6,255	5,668	11,120	195,937	5,668	0,992	0,906	0,029	202,192
PaUP	52,549	12,406	4,576	214,074	5,507	0,998	0,236	0,026	266,623
PaUP	51,734	11,799	2,847	207,330	4,680	0,998	0,228	0,023	259,064
PaUP	42,118	11,020	3,756	216,715	4,656	0,997	0,262	0,021	258,833
PaUP	44,614	9,728	2,236	215,214	5,443	0,996	0,218	0,025	259,828
2PaU	-	-	15,712	203,065	5,908	0,988	-	0,029	203,065
2PaU	-	-	15,448	191,304	6,125	0,988	-	0,032	191,304
2PaU	-	-	11,940	194,149	6,088	0,988	-	0,031	194,149
2PaU	-	-	11,896	208,787	6,134	0,993	-	0,029	208,787
2PaUP	50,098	10,862	4,118	209,855	5,358	0,998	0,217	0,026	259,953
2PaUP	42,338	9,738	2,166	203,856	4,561	0,997	0,230	0,022	246,194
2PaUP	32,297	9,568	3,673	211,478	4,527	0,997	0,296	0,021	243,775
2PaUP	45,360	10,474	3,508	200,452	5,270	0,996	0,231	0,026	245,812
UP	270,674	19,639	0,000	100,932	2,045	0,993	0,073	0,020	371,606
UP	225,678	24,105	1,002	136,539	3,598	0,998	0,107	0,026	362,217
UP	217,692	22,487	0,920	152,030	3,400	0,997	0,103	0,022	369,722
UP	204,573	22,223	1,570	146,258	4,206	0,997	0,109	0,029	350,831
2UP	227,134	26,249	2,844	121,134	3,051	0,999	0,116	0,025	348,268
2UP	207,798	23,198	1,285	135,457	3,640	0,999	0,112	0,027	343,255
2UP	198,375	23,131	1,994	142,043	3,348	0,998	0,117	0,024	340,418
2UP	188,502	20,003	1,656	150,064	4,385	0,997	0,106	0,029	338,566

Quadro 2.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	237471,617	10	23747,162	210,236	,000
Dentro	3727,512	33	112,955		
Total	241199,129	43			

Quadro 3.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1555,648	10	155,565	61,242	,000
Dentro	83,825	33	2,540		
Total	1639,473	43			

Quadro 4.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	832,192	11	75,654	77,805	,000
Dentro	35,005	36	,972		
Total	867,196	47			

Quadro 5.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	35246,985	11	3204,271	35,486	,000
Dentro	3250,662	36	90,296		
Total	38497,647	47			

Quadro 6.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	52,965	11	4,815	25,485	,000
Dentro	6,802	36	,189		
Total	59,767	47			

Quadro 7.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,805E-04	11	4,368E-05	13,383	,000
Dentro	1,175E-04	36	3,264E-06		
Total	5,980E-04	47			

Quadro 8.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,401	10	,240	28,163	,000
Dentro	,281	33	8,526E-03		
Total	2,683	43			

Quadro 9.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,210E-04	11	3,827E-05	7,362	,000
Dentro	1,871E-04	36	5,199E-06		
Total	6,081E-04	47			

Quadro 10.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	161381,283	11	14671,026	301,485	,000
Dentro	1751,854	36	48,663		
Total	163133,137	47			

Quadro 11.B – Variação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e do NDF após 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação dos diferentes substratos.

Alimento	Dig48		Dig96	
	MS	NDF	MS	NDF
F	65,80	48,50	64,64	46,82
F	66,00	48,90	65,66	48,38
F	65,70	48,50	63,40	44,91
F	66,90	50,30	62,72	43,87
FU	66,00	49,43	65,40	48,52
FU	65,90	49,29	62,61	44,30
FU	65,95	49,36	66,00	49,43
FU	65,95	49,36	63,67	45,90
FUP	77,75	56,84	80,02	61,47
FUP	77,62	56,59	77,16	55,66
FUP	77,65	56,64	75,37	52,01
FUP	77,65	56,64	74,81	50,88
2FU	63,67	45,91	64,36	46,96
2FU	63,57	45,76	68,80	53,70
2FU	63,57	45,76	66,08	49,57
2FU	63,57	45,76	65,58	48,82
2FUP	77,62	56,40	76,80	54,72
2FUP	77,47	56,11	76,14	53,39
2FUP	77,62	56,40	76,96	55,07
2FUP	77,59	56,35	77,09	55,31
Pa	69,40	65,40	72,23	69,17
Pa	71,30	67,60	71,94	68,85
Pa	70,70	66,80	69,04	65,60
Pa	70,70	66,80	69,70	66,34
PaU	68,52	62,58	71,97	66,72
PaU	68,45	62,49	73,45	68,50
PaU	68,52	62,58	70,57	65,04
PaU	68,48	62,52	71,67	66,35
PaUP	79,25	66,71	78,49	65,45
PaUP	79,25	66,71	78,08	64,76
PaUP	79,17	66,59	78,61	65,65
PaUP	79,22	66,67	76,13	61,51
2PaU	66,28	60,55	68,45	63,11
2PaU	66,18	60,43	67,67	62,19
2PaU	66,28	60,55	72,03	67,34
2PaU	66,25	60,52	68,93	63,68
2PaUP	80,99	68,36	80,75	67,94
2PaUP	80,99	68,36	79,62	65,98
2PaUP	80,99	68,36	79,98	66,61
2PaUP	80,97	68,32	80,03	66,69
UP	94,71	83,79	93,89	80,24
UP	94,61	83,35	93,79	79,80
UP	94,71	83,79	94,05	80,91
UP	94,61	83,35	94,23	81,68
2UP	94,20	80,74	95,35	85,97
2UP	94,10	80,27	93,00	75,27
2UP	94,15	80,50	94,12	80,38
2UP	94,12	80,38	94,49	82,05

Quadro 12.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,248	1	,248	,002	,961
Dentro	9612,064	94	102,256		
Total	9612,312	95			

Quadro 13.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,126	1	1,126	,008	,927
Dentro	12501,132	94	132,991		
Total	12502,257	95			

Quadro 14.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento F ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	7,960	1	7,960	7,934	,030
Dentro	6,020	6	1,003		
Total	13,980	7			

Quadro 15.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,682	1	4,682	3,848	,097
Dentro	7,300	6	1,217		
Total	11,982	7			

Quadro 16.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,370	1	1,370	,498	,507
Dentro	16,506	6	2,751		
Total	17,876	7			

Quadro 17.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento 2FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	13,624	1	13,624	7,747	,032
Dentro	10,552	6	1,759		
Total	24,176	7			

Quadro 18.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento 2FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,370	1	1,370	14,952	,008
Dentro	,550	6	9,160E-02		
Total	1,919	7			

Quadro 19.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento Pa ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	8,201E-02	1	8,201E-02	,051	,828
Dentro	9,559	6	1,593		
Total	9,641	7			

Quadro 20.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	23,427	1	23,427	33,216	,001
Dentro	4,232	6	,705		
Total	27,659	7			

Quadro 21.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	3,892	1	3,892	5,837	,052
Dentro	4,001	6	,667		
Total	7,893	7			

Quadro 22.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento 2PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	18,271	1	18,271	9,991	,020
Dentro	10,972	6	1,829		
Total	29,243	7			

Quadro 23.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento 2PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,584	1	1,584	14,136	,009
Dentro	,672	6	,112		
Total	2,257	7			

Quadro 24.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,898	1	,898	44,446	,001
Dentro	,121	6	2,020E-02		
Total	1,019	7			

Quadro 25.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do alimento 2UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,901E-02	1	1,901E-02	,040	,848
Dentro	2,852	6	,475		
Total	2,871	7			

Quadro 26.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento F ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	18,666	1	18,666	7,858	,031
Dentro	14,252	6	2,375		
Total	32,918	7			

Quadro 27.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	10,788	1	10,788	3,871	,097
Dentro	16,719	6	2,787		
Total	27,507	7			

Quadro 28.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,595	1	5,595	,492	,509
Dentro	68,248	6	11,375		
Total	73,842	7			

Quadro 29.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento 2FU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	31,442	1	31,442	7,764	,032
Dentro	24,300	6	4,050		
Total	55,743	7			

Quadro 30.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento 2FUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,722	1	5,722	15,214	,008
Dentro	2,256	6	,376		
Total	7,978	7			

Quadro 31.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento Pa ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,411	1	1,411	,701	,434
Dentro	12,077	6	2,013		
Total	13,488	7			

Quadro 32.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	33,784	1	33,784	33,146	,001
Dentro	6,116	6	1,019		
Total	39,900	7			

Quadro 33.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	10,835	1	10,835	5,834	,052
Dentro	11,143	6	1,857		
Total	21,978	7			

Quadro 34.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento 2PaU ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	25,454	1	25,454	9,975	,020
Dentro	15,310	6	2,552		
Total	40,764	7			

Quadro 35.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento 2PaUP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,774	1	4,774	14,171	,009
Dentro	2,021	6	,337		
Total	6,795	7			

Quadro 36.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	16,965	1	16,965	46,008	,001
Dentro	2,212	6	,369		
Total	19,178	7			

Quadro 37.B – Análise de variância da digestibilidade *in vitro* do NDF do alimento 2UP ao fim de 48 horas (Dig48) e 96 horas (Dig96) de incubação.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,396	1	,396	,040	,848
Dentro	59,115	6	9,853		
Total	59,511	7			

Quadro 38.B – Variação dos parâmetros resultantes da aplicação do modelo logístico de duas fases na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado.

Alimento	V_{FA}	μ_{mA}	λ	V_{FB}	μ_{mB}	r^2	μ_{mA}/V_{FA}	μ_{mB}/V_{FB}	V
F	31,437	15,314	2,215	241,112	5,620	0,993	0,487	0,023	272,549
F	34,633	12,735	2,597	235,441	5,766	0,992	0,368	0,024	270,074
F	40,112	11,651	2,208	251,656	6,495	0,995	0,290	0,026	291,768
F	38,153	9,945	2,084	253,430	6,559	0,995	0,261	0,026	291,583
FU	32,553	9,787	3,369	235,603	4,754	0,992	0,301	0,020	268,156
FU	29,554	7,963	2,131	252,190	5,237	0,990	0,269	0,021	281,744
FU	27,561	9,599	2,329	217,076	5,126	0,991	0,348	0,024	244,637
FU	36,339	8,734	2,189	241,967	6,076	0,993	0,240	0,025	278,306
FUP	104,760	16,521	2,687	180,363	4,333	0,998	0,158	0,024	285,123
FUP	109,308	17,281	2,015	196,247	4,490	0,998	0,158	0,023	305,555
FUP	106,169	17,005	1,659	215,036	4,157	0,996	0,160	0,019	321,205
FUP	103,952	16,464	1,731	200,937	4,726	0,995	0,158	0,024	304,889
2FU	31,290	10,366	3,515	224,775	4,255	0,988	0,331	0,019	256,065
2FU	28,070	6,886	1,740	218,992	4,030	0,983	0,245	0,018	247,062
2FU	20,559	10,154	3,525	237,257	3,926	0,949	0,494	0,017	257,816
2FU	22,667	8,919	3,804	212,514	5,285	0,991	0,393	0,025	235,181
2FUP	107,951	18,432	3,869	195,462	4,756	0,998	0,171	0,024	303,413
2FUP	98,985	16,012	1,268	190,703	4,047	0,996	0,162	0,021	289,688
2FUP	92,334	15,529	2,723	196,342	3,991	0,996	0,168	0,020	288,676
2FUP	95,221	13,986	0,000	209,846	4,693	0,994	0,147	0,022	305,067
Pa	22,332	10,821	10,146	271,389	8,075	0,959	0,485	0,030	293,721
Pa	26,358	10,023	11,591	249,428	7,596	0,955	0,380	0,030	275,786
Pa	20,159	11,695	8,371	299,643	8,738	0,945	0,580	0,029	319,802
Pa	15,015	10,552	10,288	284,199	8,338	0,975	0,703	0,029	299,214
PaU	9,532	8,481	12,717	261,935	7,855	0,990	0,890	0,030	271,467
PaU	10,509	7,865	10,105	249,995	7,247	0,989	0,748	0,029	260,504
PaU	9,558	9,092	11,261	272,152	8,040	0,993	0,951	0,030	281,710
PaU	15,337	10,690	12,059	258,319	7,645	0,993	0,697	0,030	273,656
PaUP	64,782	15,292	4,576	263,931	6,790	0,998	0,236	0,026	328,713
PaUP	64,080	14,615	2,847	256,808	5,797	0,998	0,228	0,023	320,888
PaUP	51,856	13,568	3,756	266,817	5,732	0,997	0,262	0,021	318,673
PaUP	56,504	12,320	2,236	272,576	6,893	0,996	0,218	0,025	329,080
2PaU	-	-	18,189	278,199	9,275	0,990	-	0,033	278,199
2PaU	-	-	15,448	266,440	8,530	0,988	-	0,032	266,440
2PaU	-	-	11,939	256,659	8,048	0,988	-	0,031	256,659
2PaU	-	-	10,690	288,083	7,812	0,994	-	0,027	288,083
2PaUP	60,392	13,094	4,118	252,972	6,459	0,998	0,217	0,026	313,364
2PaUP	51,689	11,890	2,166	248,874	5,568	0,997	0,230	0,022	300,563
2PaUP	47,781	11,634	3,673	257,133	5,504	0,997	0,243	0,021	304,914
2PaUP	55,121	12,728	3,508	243,597	6,404	0,996	0,231	0,026	298,718
UP	281,821	20,447	0,000	105,089	2,130	0,993	0,073	0,020	386,910
UP	235,191	25,121	1,002	142,294	3,749	0,998	0,107	0,026	377,485
UP	226,343	23,381	0,920	158,073	3,535	0,997	0,103	0,022	384,416
UP	212,356	23,068	1,570	151,827	4,367	0,997	0,109	0,029	364,183
2UP	233,251	26,955	2,844	124,395	3,134	0,999	0,116	0,025	357,646
2UP	217,869	24,322	1,285	142,021	3,816	0,999	0,112	0,027	359,890
2UP	205,923	24,011	1,994	147,452	3,475	0,998	0,117	0,024	353,375
2UP	195,048	20,697	1,656	155,273	4,537	0,997	0,106	0,029	350,321

Quadro 39.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	242095,814	10	24209,581	193,351	,000
Dentro	4131,947	33	125,211		
Total	246227,761	43			

Quadro 40.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1126,996	10	112,700	47,151	,000
Dentro	78,875	33	2,390		
Total	1205,871	43			

Quadro 41.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	868,574	11	78,961	43,860	,000
Dentro	64,811	36	1,800		
Total	933,385	47			

Quadro 42.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	98263,418	11	8933,038	48,539	,000
Dentro	6625,341	36	184,037		
Total	104888,759	47			

Quadro 43.B – Análise de variância do parâmetro na μ_{mB} cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	129,561	11	11,778	36,869	,000
Dentro	11,501	36	,319		
Total	141,062	47			

Quadro 44.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,796E-03	11	5,269E-04	11,242	,000
Dentro	1,687E-03	36	4,687E-05		
Total	7,483E-03	47			

Quadro 45.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,836	10	,184	35,313	,000
Dentro	,172	33	5,200E-03		
Total	2,008	43			

Quadro 46.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,300E-04	11	4,818E-05	8,813	,000
Dentro	1,968E-04	36	5,467E-06		
Total	7,268E-04	47			

Quadro 47.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás do substrato efectivamente degradado dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	61352,701	11	5577,518	41,636	,000
Dentro	4822,526	36	133,959		
Total	66175,228	47			

Quadro 48.B – Análise de variância do parâmetro V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2571,159	1	2571,159	,454	,502
Dentro	487426,890	86	5667,755		
Total	489998,048	87			

Quadro 49.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	168,306	1	168,306	5,087	,027
Dentro	2845,344	86	33,085		
Total	3013,650	87			

Quadro 50.B – Análise de variância do parâmetro λ na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,251	1	,251	,013	,909
Dentro	1800,581	94	19,155		
Total	1800,832	95			

Quadro 51.B – Análise de variância do parâmetro V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	65303,277	1	65303,277	42,811	,000
Dentro	143386,405	94	1525,387		
Total	208689,682	95			

Quadro 52.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	41,828	1	41,828	19,578	,000
Dentro	200,829	94	2,136		
Total	242,657	95			

Quadro 53.B – Análise de variância do parâmetro r^2 na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	3,190E-04	1	3,190E-04	3,711	,057
Dentro	8,081E-03	94	8,597E-05		
Total	8,400E-03	95			

Quadro 54.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mA}/V_{FA} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,573E-05	1	4,573E-05	,001	,977
Dentro	4,690	86	5,454E-02		
Total	4,690	87			

Quadro 55.B – Análise de variância do parâmetro μ_{mB}/V_{FB} na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,197E-10	1	1,197E-10	,000	,998
Dentro	1,335E-03	94	1,420E-05		
Total	1,335E-03	95			

Quadro 56.B – Análise de variância do parâmetro V na cinética de produção de gás do substrato total (Quadro 1.B) e do substrato efectivamente degradado (Quadro 38.B) dos alimentos utilizados.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	92472,507	1	92472,507	37,907	,000
Dentro	229308,364	94	2439,451		
Total	321780,871	95			

Quadro 57.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	54452,185	1	54452,185	57,440	,000
Dentro	9479,849	10	947,985		
Total	63932,034	11			

Quadro 58.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	449,013	1	449,013	74,655	,000
Dentro	60,145	10	6,015		
Total	509,159	11			

Quadro 59.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	45,408	1	45,408	2,792	,126
Dentro	162,640	10	16,264		
Total	208,048	11			

Quadro 60.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1269,295	1	1269,295	1,683	,224
Dentro	7542,451	10	754,245		
Total	8811,746	11			

Quadro 61.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,375	1	1,375	1,159	,307
Dentro	11,866	10	1,187		
Total	13,241	11			

Quadro 62.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	8,404E-05	1	8,404E-05	23,289	,001
Dentro	3,609E-05	10	3,609E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 63.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	8,951E-02	1	8,951E-02	1,499	,249
Dentro	,597	10	5,973E-02		
Total	,687	11			

Quadro 64.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,218E-06	1	1,218E-06	,117	,739
Dentro	1,040E-04	10	1,040E-05		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 65.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	39094,285	1	39094,285	312,495	,000
Dentro	1251,036	10	125,104		
Total	40345,321	11			

Quadro 66.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	35094,264	1	35094,264	12,170	,006
Dentro	28837,770	10	2883,777		
Total	63932,034	11			

Quadro 67.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	282,102	1	282,102	12,424	,005
Dentro	227,056	10	22,706		
Total	509,159	11			

Quadro 68.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,134	1	,134	,006	,938
Dentro	207,914	10	20,791		
Total	208,048	11			

Quadro 69.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	31,790	1	31,790	,036	,853
Dentro	8779,956	10	877,996		
Total	8811,746	11			

Quadro 70.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,207	1	,207	,159	,699
Dentro	13,035	10	1,303		
Total	13,241	11			

Quadro 71.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,331E-05	1	4,331E-05	5,638	,039
Dentro	7,682E-05	10	7,682E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 72.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,498E-03	1	4,498E-03	,066	,803
Dentro	,682	10	6,823E-02		
Total	,687	11			

Quadro 73.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,300E-05	1	1,300E-05	1,410	,263
Dentro	9,224E-05	10	9,224E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 74.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	33013,573	1	33013,573	45,028	,000
Dentro	7331,748	10	733,175		
Total	40345,321	11			

Quadro 75.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	53195,341	1	53195,341	49,545	,000
Dentro	10736,693	10	1073,669		
Total	63932,034	11			

Quadro 76.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	414,591	1	414,591	43,841	,000
Dentro	94,568	10	9,457		
Total	509,159	11			

Quadro 77.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	25,923	1	25,923	1,423	,260
Dentro	182,124	10	18,212		
Total	208,048	11			

Quadro 78.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1160,005	1	1160,005	1,516	,246
Dentro	7651,741	10	765,174		
Total	8811,746	11			

Quadro 79.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,864	1	,864	,698	,423
Dentro	12,377	10	1,238		
Total	13,241	11			

Quadro 80.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,968E-05	1	6,968E-05	13,813	,004
Dentro	5,045E-05	10	5,045E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 81.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{MA}/V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	7,257E-02	1	7,257E-02	1,182	,303
Dentro	,614	10	6,142E-02		
Total	,687	11			

Quadro 82.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{MB}/V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,043E-10	1	6,043E-10	,000	,994
Dentro	1,052E-04	10	1,052E-05		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 83.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	38644,603	1	38644,603	227,225	,000
Dentro	1700,718	10	170,072		
Total	40345,321	11			

Quadro 84.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	27478,663	1	27478,663	7,538	,021
Dentro	36453,371	10	3645,337		
Total	63932,034	11			

Quadro 85.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{MA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	205,942	1	205,942	6,792	,026
Dentro	303,216	10	30,322		
Total	509,159	11			

Quadro 86.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,456	1	4,456	,219	,650
Dentro	203,592	10	20,359		
Total	208,048	11			

Quadro 87.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,345	1	,345	,000	,985
Dentro	8811,401	10	881,140		
Total	8811,746	11			

Quadro 88.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,725	1	,725	,580	,464
Dentro	12,516	10	1,252		
Total	13,241	11			

Quadro 89.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,500E-05	1	2,500E-05	2,627	,136
Dentro	9,513E-05	10	9,513E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 90.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,338E-08	1	1,338E-08	,000	1,000
Dentro	,687	10	6,868E-02		
Total	,687	11			

Quadro 91.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,528E-05	1	2,528E-05	3,161	,106
Dentro	7,997E-05	10	7,997E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 92.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	27284,162	1	27284,162	20,890	,001
Dentro	13061,159	10	1306,116		
Total	40345,321	11			

Quadro 93.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	382604,123	1	382604,12	30,342	,000
Dentro	126098,841	10	12609,884		
Total	508702,963	11			

Quadro 94.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	153308,972	1	153308,97	4,314	,065
Dentro	355393,992	10	35539,399		
Total	508702,963	11			

Quadro 95.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	351505,798	1	351505,798	22,361	,001
Dentro	157197,166	10	15719,717		
Total	508702,963	11			

Quadro 96.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em NDF da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	97154,720	1	97154,720	2,361	,155
Dentro	411548,243	10	41154,824		
Total	508702,963	11			

Quadro 97.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	119755,365	1	119755,365	29,470	,000
Dentro	40636,324	10	4063,632		
Total	160391,689	11			

Quadro 98.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	54786,813	1	54786,813	5,188	,046
Dentro	105604,876	10	10560,488		
Total	160391,689	11			

Quadro 99.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	113913,611	1	113913,611	24,509	,001
Dentro	46478,078	10	4647,808		
Total	160391,689	11			

Quadro 100.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADF da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	38757,125	1	38757,125	3,186	,105
Dentro	121634,564	10	12163,456		
Total	160391,689	11			

Quadro 101.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2258,254	1	2258,254	42,904	,000
Dentro	526,354	10	52,635		
Total	2784,608	11			

Quadro 102.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1078,526	1	1078,526	6,322	,031
Dentro	1706,081	10	170,608		
Total	2784,608	11			

Quadro 103.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2201,851	1	2201,851	37,783	,000
Dentro	582,757	10	58,276		
Total	2784,608	11			

Quadro 104.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em ADL da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	798,813	1	798,813	4,023	,073
Dentro	1985,794	10	198,579		
Total	2784,608	11			

Quadro 105.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	74253,069	1	74253,069	24,585	,001
Dentro	30202,334	10	3020,233		
Total	104455,403	11			

Quadro 106.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	24800,877	1	24800,877	3,114	,108
Dentro	79654,525	10	7965,453		
Total	104455,403	11			

Quadro 107.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	65213,729	1	65213,729	16,618	,002
Dentro	39241,674	10	3924,167		
Total	104455,403	11			

Quadro 108.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em hemicelulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	13186,080	1	13186,080	1,445	,257
Dentro	91269,322	10	9126,932		
Total	104455,403	11			

Quadro 109.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	89123,618	1	89123,618	26,299	,000
Dentro	33888,094	10	3388,809		
Total	123011,713	11			

Quadro 110.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 48 horas de incubação (Dig48).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	40491,461	1	40491,461	4,907	,051
Dentro	82520,251	10	8252,025		
Total	123011,713	11			

Quadro 111.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	84440,817	1	84440,817	21,892	,001
Dentro	38570,896	10	3857,090		
Total	123011,713	11			

Quadro 112.B – Análise de variância da regressão linear entre o conteúdo em celulose da amostra e a digestibilidade *in vitro* do NDF ao fim de 96 horas de incubação (Dig96).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	28427,649	1	28427,649	3,006	,114
Dentro	94584,064	10	9458,406		
Total	123011,713	11			

Quadro 113.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o NDF da amostra (Figura 7.6).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	55383,507	1	55383,507	64,787	,000
Dentro	8548,526	10	854,853		
Total	63932,034	11			

Quadro 114.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	392,550	1	392,550	33,664	,000
Dentro	116,608	10	11,661		
Total	509,159	11			

Quadro 115.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o NDF da amostra (Figura 7.8).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	119,149	1	119,149	13,403	,004
Dentro	88,899	10	8,890		
Total	208,048	11			

Quadro 116.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o NDF da amostra (Figura 7.7).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4466,672	1	4466,672	10,280	,009
Dentro	4345,074	10	434,507		
Total	8811,746	11			

Quadro 117.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,976	1	6,976	11,136	,008
Dentro	6,265	10	,626		
Total	13,241	11			

Quadro 118.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,340E-05	1	6,340E-05	11,176	,007
Dentro	5,673E-05	10	5,673E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 119.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,249	1	,249	5,674	,038
Dentro	,438	10	4,382E-02		
Total	,687	11			

Quadro 120.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	2,428E-05	1	2,428E-05	2,999	,114
Dentro	8,096E-05	10	8,096E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 121.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o NDF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	28393,544	1	28393,544	23,757	,001
Dentro	11951,776	10	1195,178		
Total	40345,321	11			

Quadro 122.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	58678,840	1	58678,840	111,701	,000
Dentro	5253,194	10	525,319		
Total	63932,034	11			

Quadro 123.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	399,516	1	399,516	36,438	,000
Dentro	109,642	10	10,964		
Total	509,159	11			

Quadro 124.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	103,122	1	103,122	9,828	,011
Dentro	104,926	10	10,493		
Total	208,048	11			

Quadro 125.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5045,645	1	5045,645	13,398	,004
Dentro	3766,101	10	376,610		
Total	8811,746	11			

Quadro 126.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,736	1	6,736	10,356	,009
Dentro	6,505	10	,650		
Total	13,241	11			

Quadro 127.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5,167E-05	1	5,167E-05	7,548	,021
Dentro	6,846E-05	10	6,846E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 128.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,211	1	,211	4,420	,062
Dentro	,476	10	4,763E-02		
Total	,687	11			

Quadro 129.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,720E-05	1	1,720E-05	1,953	,192
Dentro	8,805E-05	10	8,805E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 130.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o ADF da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	29310,965	1	29310,965	26,563	,000
Dentro	11034,356	10	1103,436		
Total	40345,321	11			

Quadro 131.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	48038,870	1	48038,870	30,226	,000
Dentro	15893,163	10	1589,316		
Total	63932,034	11			

Quadro 132.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	359,307	1	359,307	23,978	,001
Dentro	149,852	10	14,985		
Total	509,159	11			

Quadro 133.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	132,367	1	132,367	17,490	,002
Dentro	75,681	10	7,568		
Total	208,048	11			

Quadro 134.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	3536,466	1	3536,466	6,704	,027
Dentro	5275,280	10	527,528		
Total	8811,746	11			

Quadro 135.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,826	1	6,826	10,640	,009
Dentro	6,415	10	,642		
Total	13,241	11			

Quadro 136.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	7,507E-05	1	7,507E-05	16,661	,002
Dentro	4,506E-05	10	4,506E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 137.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,283	1	,283	7,002	,024
Dentro	,404	10	4,039E-02		
Total	,687	11			

Quadro 138.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	3,290E-05	1	3,290E-05	4,548	,059
Dentro	7,234E-05	10	7,234E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 139.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o conteúdo em hemicelulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	25507,131	1	25507,131	17,190	,002
Dentro	14838,189	10	1483,819		
Total	40345,321	11			

Quadro 140.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FA} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	58435,017	1	58435,017	106,303	,000
Dentro	5497,017	10	549,702		
Total	63932,034	11			

Quadro 141.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	396,327	1	396,327	35,126	,000
Dentro	112,832	10	11,283		
Total	509,159	11			

Quadro 142.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro λ e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	105,288	1	105,288	10,246	,009
Dentro	102,760	10	10,276		
Total	208,048	11			

Quadro 143.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V_{FB} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	5221,688	1	5221,688	14,545	,003
Dentro	3590,059	10	359,006		
Total	8811,746	11			

Quadro 144.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	6,934	1	6,934	10,994	,008
Dentro	6,307	10	,631		
Total	13,241	11			

Quadro 145.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro r^2 e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	4,880E-05	1	4,880E-05	6,842	,026
Dentro	7,133E-05	10	7,133E-06		
Total	1,201E-04	11			

Quadro 146.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mA}/V_{FA} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,204	1	,204	4,222	,067
Dentro	,483	10	4,829E-02		
Total	,687	11			

Quadro 147.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro μ_{mB}/V_{FB} e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	1,757E-05	1	1,757E-05	2,004	,187
Dentro	8,767E-05	10	8,767E-06		
Total	1,052E-04	11			

Quadro 148.B – Análise de variância da regressão linear entre o parâmetro V e o conteúdo em celulose da amostra.

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	28720,797	1	28720,797	24,707	,001
Dentro	11624,524	10	1162,452		
Total	40345,321	11			

Quadro 149.B – Análise de variância da regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado (SED) e o parâmetro V (Figura 7.9).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	60023,089	1	60023,089	501,370	,000
Dentro	5507,040	46	119,718		
Total	65530,129	47			

Quadro 150.B – Análise de variância da regressão linear entre a quantidade de substrato efectivamente degradado (SED) necessário para a produção de 1 ml de gás e a digestibilidade *in vitro* (Dig48) da matéria secam (Figura 7.10).

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F	Sig.
Entre	,319	1	,319	104,192	,000
Dentro	3,065E-02	10	3,065E-03		
Total	,350	11			