

**SUPLEMENTAÇÃO COM MILHO E MINERAIS ORGÂNICOS
EM DIETAS COM ALTO TEOR DE POLPA CÍTRICA PARA
VACAS EM LACTAÇÃO**

SANDRO CÉSAR SALVADOR

2006

SANDRO CÉSAR SALVADOR

**SUPLEMENTAÇÃO COM MILHO E MINERAIS ORGÂNICOS
EM DIETAS COM ALTO TEOR DE POLPA CÍTRICA PARA
VACAS EM LACTAÇÃO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutor”.

**Prof. Marcos Neves Pereira
Orientador**

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos
Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Salvador, Sandro César

Suplementação com milho e minerais orgânicos em dietas com alto teor de polpa cítrica para vacas em lactação / Sandro César Salvador. -- Lavras : UFLA, 2006.

105 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Bovino. 2. Nutrição animal. 3. Mineral orgânico. 4. Polpa cítrica. 5. Milho. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.20855

SANDRO CÉSAR SALVADOR

**SUPLEMENTAÇÃO COM MILHO E MINERAIS ORGÂNICOS
EM DIETAS COM ALTO TEOR DE POLPA CÍTRICA PARA
VACAS EM LACTAÇÃO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 06 de março de 2006

Prof. Doutor Gustavo Augusto de Andrade - UNIFENAS

Prof. Doutor João Chrysostomo de Resende Júnior - UFLA

Prof. Doutor Ronaldo Braga Reis - UFMG

Prof. Doutor Sandra Gesteira Coelho - UFMG

**Prof. Doutor Marcos Neves Pereira
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

A smuheres da minha vida, Sônia, Sarah,
Raquele Esther.

Dedico

Ao Grande "Eu Sou".

O **fereço**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo querer e efetuar,

Ao Prof. Marcos Neves Pereira, pelo ensinamento inestimável para a profissão e para a vida,

Aos alunos do grupo do leite pelo empenho na condução do experimento,

A TORTUGA Companhia Zootécnica Agrária, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto,

As queridas mulheres da minha vida, pela compreensão e apoio,

Ao Departamento de Medicina Veterinária pela liberação que permitiu meu aprimoramento,

Ao Valério Vilela, pelo apoio fundamental na fase de análises laboratoriais.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1. O alimento polpa cítrica.....	03
2.1.1 Caracterização e composição.....	03
2.1.2 Produção de leite com polpa cítrica comparativamente a milho ..	12
2.1.3 Produção de gordura com polpa cítrica comparativamente a milho	16
2.1.4 Produção de proteína com polpa cítrica comparativamente a milho	20
2.1.5 Síntese ruminal de proteína microbiana.....	22
2.1.5.1 A via glicolítica de Entner-Doudoroff.	22
2.1.5.2 Rendimento do peso dos carbonos disponíveis pelo peso molecular	25
2.1.5.3 Economia de aminoácidos gliconeogênicos	31
2.1.6 Fermentação ruminal.....	32
2.1.7 Consumo de matéria seca.....	34
2.1.7.1 Redução de CMS em dietas com polpa de beterraba substituindo milho.....	36
2.1.7.2 Capacidade de retenção de água e CMS	37
2.2. Minerais no rúmen	37
2.2.1 Introdução	37
2.2.2 Efeito dos minerais sobre o metabolismo ruminal.....	40
2.2.2.1 Fósforo	40
2.2.2.2 Enxofre.....	41
2.2.2.3 Magnésio.....	43

2.2.2.4 Cobalto	45
2.2.2.5 Cromo.....	46
2.2.2.6 Zinco	47
2.2.3 Metabolismo dos minerais orgânicos no rúmen	49
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5 CONCLUSÕES	91
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

RESUMO

SALVADOR, Sandro César. **Suplementação com milho e minerais orgânicos em dietas com alto teor de polpa cítrica para vacas em lactação**. 2006. 105 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Dietas para vacas leiteiras formuladas com alta inclusão de polpa cítrica em substituição ao milho em grão podem aumentar a eficiência financeira da produção de leite no Sudeste Brasileiro. Entretanto, a substituição total de amido de milho por pectina, fibra e sacarose de polpa cítrica pode induzir mudanças no perfil fermentativo e na síntese de proteína microbiana no rúmen. Este experimento avaliou a resposta de vacas leiteiras à baixa inclusão de milho maduro finamente moído em dietas com alto conteúdo de polpa cítrica peletizada. Concomitantemente, foi avaliada a substituição total de fontes inorgânicas de Cu, Mn, Se, Zn e Cr por fontes orgânicas destes microminerais. Um arranjo fatorial dos dois fatores resultou em quatro dietas isoprotéicas e com teor similar de FDN oriundo de silagem de milho: MO (milho e mineral orgânico), MI (milho e mineral inorgânico), PO (polpa e mineral orgânico) e PI (polpa e mineral inorgânico). O teor de milho na MS dietética foi 10% e o de polpa foi 24% nos tratamentos MO e MI e o teor de polpa cítrica foi 33% nos tratamentos PO e PI. Uma sequência dos quatro tratamentos foi oferecida simultaneamente a dezesseis vacas lactantes em Quadrados Latinos 4x4 com períodos de 21 dias, um quadrado foi formado por vacas fistuladas no rúmen. Não ficou claro o efeito sobre a resposta de curto prazo em desempenho animal e digestão decorrente da substituição de fontes inorgânicas por fontes orgânicas de microminerais, as dietas não foram similares em teores de P, Ca, Co, I e Mn. O consumo diário de matéria seca foi 19,4 kg nas dietas com polpa cítrica como concentrado energético único e 20,5 kg nas dietas com algum milho ($P=0,03$). Este fato, acoplado à menor digestibilidade aparente da matéria orgânica no trato digestivo total nas dietas com alta polpa cítrica ($P=0,05$), reduziu o consumo de matéria orgânica digestível nestes tratamentos ($P<0,01$). Houve tendência de queda na taxa fracional de degradação ruminal *in situ* da MS da silagem de milho ($P=0,11$) e de aumento no tamanho da fração indigestível ($P=0,15$) nas dietas com milho, sugerindo que a degradabilidade ruminal das forragens não foi o determinante da queda de consumo nas dietas com alta polpa cítrica. A produção diária de leite foi 27,5 kg nas dietas só com polpa e 28,4 kg nas dietas com milho ($P=0,04$). A eficiência de utilização energética, mensurada pela secreção diária de energia líquida no leite dividida pelo consumo de matéria

¹ Comitê Orientador: Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Prof. José Camisão de Souza – UFLA.

orgânica digestível, não variou entre tratamentos. A inclusão de amido à dieta com polpa aumentou o teor e a produção de proteína no leite ($P<0,03$) e não afetou a secreção de gordura ($P>0,24$). A concentração de derivados de purinas na urina foi numericamente maior nas dietas onde o milho substituiu parcialmente a polpa cítrica, sugerindo que a inclusão de milho à dieta teve efeito positivo sobre a síntese de proteína microbiana no rúmen. Apesar do menor custo alimentar por vaca por dia nas dietas com polpa cítrica como concentrado energético único, as dietas com milho foram vantajosas financeiramente quando um sistema de bonificação por qualidade foi adotado para definir o preço do leite. Dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica podem funcionar quando o pagamento do leite é feito exclusivamente com base no volume produzido, mas alguma inclusão de amido de milho parece ser benéfica quando a meta é maximizar o consumo e a produção de sólidos no leite.

ABSTRACT

SALVADOR, Sandro César. **Supplementation with corn and organic minerals of high citrus pulp content diets for lactating cows.** 2006. 105 p. Thesis (Doctor in Program in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.²

Lactating cow diets formulated with high inclusion of citrus pulp in substitution to corn grain may increase the financial efficiency of dairy production in Southeast Brazil. However, the complete substitution of corn starch by pectin, fiber and sucrose from citrus pulp may induce changes in rumen fermentation profile and microbial protein synthesis. This experiment evaluated the response of dairy cows to a low inclusion of finely ground mature corn to diets with high pelleted citrus pulp content. The complete substitution of inorganic sources of Cu, Mn, Se, Zn and Cr by organic sources of these trace minerals was simultaneously evaluated. A factorial arrangement of the two factors resulted in four diets similar in crude protein and corn silage NDF content: MO (corn and organic mineral), MI (corn and inorganic mineral), PO (citrus pulp and organic mineral) and PI (citrus pulp and inorganic mineral). For treatments MO and MI the dietary content of corn was 10% and of citrus pulp was 24% and for treatments PO and PI citrus pulp content was 33%. A sequence of the four treatments was simultaneously offered to sixteen lactating cows in 4x4 Latin Squares with 21-day periods, a square was formed with rumen fistulated cows. The short term response in animal performance and digestion to the substitution of inorganic by organic trace mineral sources was not conclusive, diets were not similar in P, Ca, Co, I and Mn content. Daily dry matter intake was 19,4 kg for diets with citrus pulp as the only energy concentrate and 20,5 kg for diets with some corn ($P=0.03$). This fact, coupled to the lower total tract apparent digestibility of the organic matter for the high citrus pulp diets ($P=0.05$), decreased the intake of digestible organic matter in these treatments ($P<0,01$). There was a trend for a decreased fractional rate of *in situ* ruminal degradation of corn silage dry matter ($P=0,11$) and for increased size of the indigestible fraction ($P=0,15$) in diets with corn, suggesting that the ruminal degradation of forages was not the determining factor for the lower intake of the high citrus pulp diets. Daily milk production was 27,5 kg for diets with citrus pulp alone and 28,4 kg for diets with corn ($P=0,04$). The efficiency of energy use, measure by the daily secretion of milk net energy divided by the intake of digestible organic matter, did not vary between treatments. The inclusion of starch to the citrus pulp diet increased milk protein content and production ($P<0,03$) and had

² Graduate Committee: Marcos Neves Pereira – UFLA (Major Professor), José Camisão de Souza – UFLA.

no effect on milk fat secretion ($P>0.24$). The concentration of purine derivatives in urine was numerically greater for the diets in which corn partially substituted citrus pulp, suggesting that the inclusion of corn to the diet had a positive effect on rumen microbial protein synthesis. Despite the lower feed cost per cow per day for the diets with citrus pulp as the only energy concentrate, diets with corn were financially advantageous when a quality payment system was adopted to define milk price. Diets formulated exclusively with citrus pulp may function when milk payment is based exclusively on the volume produced, but some corn starch inclusion seems to be beneficial when the goal is to maximize intake and production of milk solids.

1 INTRODUÇÃO

A polpa cítrica é um subproduto fibroso da indústria de suco de laranja (Arthington et al., 2002). O Brasil tem papel de destaque na produção mundial deste alimento, sendo que a maior parte da produção nacional é utilizada internamente na alimentação animal (Abecitrus, 2005). A polpa é um concentrado energético rico em sacarose, pectina e fibra de boa digestibilidade (Hall et al., 1999; Miron et al., 2001). Entretanto, a digestão ruminal destes carboidratos difere da digestão do amido em potencial de síntese de proteína microbiana no rúmen (Dusková & Marounek, 2001; Hall & Herejk, 2001), logo a substituição de milho por polpa cítrica pode afetar negativamente o desempenho de vacas leiteiras de alta produção, principalmente a produção de proteína no leite (Broderick et al., 2002; Leiva et al., 2000; Solomon et al., 2000). A substituição total de milho por polpa cítrica, apesar de atrativa financeiramente, requer avaliação do seu efeito sobre a digestão e o desempenho de vacas leiteiras.

A função ruminal pode ser determinada pelo suprimento de macro e microminerais (Martinez & Church, 1970). Suplementos contendo microminerais complexados a moléculas orgânicas (Association of American Feed Control Officials, 1999) têm sido desenvolvidos industrialmente com base na teoria da maior biodisponibilidade que a de fontes inorgânicas (Pereira, 2002). A indústria preconiza que minerais orgânicos teriam maior solubilidade, estrutura química estável e natureza eletricamente neutra no trato digestivo. Logo estes não participariam de reações que poderiam transformar o íon metálico livre em complexos insolúveis indesejáveis. Foi observado que a substituição crescente de fonte inorgânica de minerais por um suplemento contendo minerais orgânicos aumentou o consumo de matéria seca e a digestibilidade em bovinos consumindo dietas de baixo valor nutritivo

(Langwinski et al., 2001; Langwinski & Ospina, 2001; Ospina et al., 2000). O efeito da substituição total de fontes inorgânicas por fontes orgânicas sobre a digestão e a resposta de curto prazo em desempenho de vacas leiteiras de alta produção consumindo dietas adequadas à expressão do seu potencial produtivo requer avaliação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de baixa inclusão de amido de milho em dietas com alta inclusão de polpa cítrica como concentrado energético único sobre a digestão e o desempenho de vacas leiteiras de alta produção. Concomitantemente, se avaliou a substituição total de fontes inorgânicas de Cu, Mn, Se, Zn e Cr por fontes orgânicas destes minerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O alimento polpa cítrica

2.1.1 Caracterização e composição

O farelo de polpa cítrica peletizado é o resíduo do esmagamento de frutas cítricas para produção de suco. Existem referências da utilização deste subproduto na alimentação de ruminantes desde 1911, em fazendas leiteiras da Califórnia, EUA (Arthington et al., 2002). O subproduto tem casca, polpa e sementes de frutas cítricas, majoritariamente a laranja. No Brasil, a colheita da fruta é feita de Maio a Janeiro. Existe variação de período produtivo entre as diferentes variedades de laranja, existindo variedades precoces (Hamlin), de meia estação (Pêras) e tardias (Natal e Valência). O Brasil produziu na safra compreendida entre 1 de Julho de 2002 e 30 de Junho de 2003 aproximadamente 7.400.000 toneladas de polpa cítrica peletizada, correspondendo a 25% da produção global de 29.400.000 toneladas, colocando o país como o maior produtor mundial. Na safra 2004/2005 foi estimada uma produção de 11.083.000 toneladas de polpa cítrica, sendo que aproximadamente 89% deste total foi consumida no mercado interno (Abecitrus, 2005).

Nos anos de 1996 e 1997, os valores oriundos da exportação do farelo de polpa cítrica pelo Brasil ultrapassaram 100 milhões de dólares, valor que caiu para menos de 20 milhões em 1998. Neste ano a detecção de dioxina, uma substância potencialmente cancerígena, em partidas de farelo exportadas para a Europa, induziu a suspensão das exportações para a Comunidade Européia. Mesmo com a posterior liberação das exportações para a Europa, após ser detectada a fonte de contaminação, as exportações de polpa cítrica não

alcançaram o bom desempenho dos anos de 96 e 97, em volume físico e em divisas geradas. Concomitantemente, o preço internacional mais estável, entre 70 a 80 dólares por tonelada, favoreceu o uso no mercado doméstico, principalmente pelo crescimento da demanda para rações animais (Conab, 2006).

A extração do suco de laranja gera 52,1% do subproduto polpa cítrica fresca. A polpa fresca, com 73 a 83% de umidade, é constituída por cerca de 60 a 65% de casca, 30 a 35% de bagaço e 10% de sementes na matéria natural. Segundo Arthington et al. (2002), ocorre variação significativa nos teores de casca, bagaço e sementes na polpa em função da variedade da laranja. Laranjas frescas descartadas pela indústria também são acrescidas à polpa cítrica fresca. Como a polpa fresca é de alta perecibilidade, tem alto custo de transporte por unidade de matéria seca (MS) e inviabiliza o uso do alimento por fábricas de concentrados para animais, a desidratação acoplada à peletização foram, então, adotadas pela indústria de sucos.

O processamento do resíduo cítrico (casca, polpa e semente) tem início com a adição de 0,3 a 0,6% de óxido de cálcio. O óxido de cálcio reage com a molécula de água, formando uma solução de hidróxido de cálcio, facilitando a liberação de água durante a posterior prensagem da polpa fresca. Imediatamente após a adição do óxido a polpa é prensada mecanicamente. O líquido é separado da fração sólida. Tanto a fração sólida como a fração líquida são então submetidos ao aquecimento para promover a evaporação da água. Da evaporação da fração sólida resulta a polpa seca e da evaporação da fração líquida resulta o melaço com 72% de MS na matéria natural. Da fração líquida ainda retira-se óleo. Após a evaporação, o melaço é misturado à polpa seca antes da peletização ou pode servir como substrato na indústria de bebidas alcoólicas. Normalmente o melaço adicionado representa 34% do peso de matéria natural da polpa cítrica peletizada. De cada 100 kg de frutas, retira-se em média 7 kg de

polpa seca e 4 kg de melaço. A temperatura de peletização pode variar de 100 a 160°C. A temperatura parece variar em função da indústria de suco, não existindo padrões rígidos de processamento para esta variável. A temperatura excessiva de peletização pode provocar a carbonização da polpa cítrica. A temperatura de peletização é responsável pela coloração dos peletes, que variam de amarelo ouro até preto (Arthington et al., 2002).

O resíduo líquido do esmagamento da polpa fresca ao ser evaporado contem Brix ao redor de 720 (72% dos sólidos solúveis medidos como açúcares). Estes valores são médios, apresentando aumento com a maturação da laranja ao longo da safra de colheita. Após a extração mecânica do suco de laranja este passa por uma etapa de padronização, realizado por “finishers” ou turbo-filtros. Os “finishers” são cilindros de aço com armações internas contendo telas de tecido sintético, fazendo o papel de filtros. O ajuste é feito em acordo com o cliente, mas em geral o teor de polpa do suco é padronizado em 4%. O “pulp-wash” é o resíduo da padronização da polpa do suco. O “pulp-wash” é concentrado em evaporadores para perder água e a polpa exaurida é reincorporada ao melaço. O suco, com seu teor de polpa ajustado, vai então para as etapas de concentração e pasteurização. A padronização do suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) é realizada em evaporadores a vácuo de múltiplo efeito (*TASTE-Thermally Accelerated Short Time Evaporator*). O suco entra com sólidos solúveis totais entre 10 a 12° Brix e sai com 65° Brix, que é o padrão internacional do SLCC ou FCOJ (frozen concentrated orange juice). No processo de evaporação são perdidos óleos essenciais, de alto valor comercial. Por isso, os evaporadores têm sistema de recuperação de essências. No processo de concentração são obtidos sucos com concentrações diferentes. É comum a mistura de produtos diferentes para uniformizar o que já foi produzido (Yamanaka, 2005). Portanto, a padronização do açúcar do suco ocorre na etapa de padronização da polpa do suco. O excesso de açúcares é reincorporado ao

melaço depois de sofrer evaporação. A variação da concentração de açúcares na laranja ao longo da safra vai influenciar a porcentagem de acréscimo de “pulp-wash” no melaço, e conseqüentemente, o teor de sacarose da polpa cítrica peletizada.

A composição química da polpa cítrica desidratada foi analisada em três amostras oriundas dos EUA, em três oriundas da Espanha e em três de Israel (Miron et al., 2001). A composição média foi 91,5% \pm 1,65 de MS, 6,7% \pm 0,14 de PB, 21,6% \pm 0,32 de FDN, 21,2% \pm 0,53 de FDA, 0,31% \pm 0,03 de lignina e 1,56% \pm 0,06 de FDN associado a fenólicos (média \pm desvio padrão). A FDN da polpa tem baixíssimo conteúdo de hemicelulose, é rica em celulose e é de baixa lignificação. A digestibilidade *in vitro* da FDN da polpa cítrica foi 70,4% \pm 1,28. A digestibilidade da FDN do resíduo de cervejaria foi 76,5% \pm 0,95, do farelo de glúten de milho foi 83,4% \pm 0,57, da polpa de beterraba foi 74,4% \pm 0,55, da casquinha de soja foi 83,0% \pm 0,62 e do farelo de trigo foi 50,8% \pm 0,51. Comparativamente aos outros subprodutos fibrosos analisados, a digestibilidade da fibra da polpa cítrica foi intermediária. Não obstante, a digestibilidade da MS da polpa cítrica foi 91,5%, a maior dentre os alimentos avaliados. A digestibilidade dos ácidos urônicos, identificados pelos autores como ácidos galacturônicos no caso da polpa cítrica, foi 97,7%. A digestibilidade do total de carboidratos na polpa cítrica foi 92,3%, também a maior dentre os subprodutos avaliados. A maior digestibilidade da MS sugere que, embora a FDN apresente digestibilidade intermediária, a digestibilidade dos carboidratos não fibrosos é alta neste alimento. A digestibilidade dos monossacarídeos foi semelhante entre subprodutos, com exceção dos ácidos urônicos. A alta digestibilidade ruminal da pectina determinou a maior digestibilidade da polpa proporcionalmente aos outros subprodutos. Titgemeyer et al. (1992) observaram que a digestibilidade ruminal *in situ* da pectina da alfafa foi virtualmente de 100%.

Os monossacarídeos de maior porcentagem na polpa cítrica foram a glicose (29% da MS), a galactose (6,5% da MS) e os ácidos urônicos (21,5% da MS) (Miron et al., 2001). O teor de pectina, definida como ácidos urônicos solúveis em detergente neutro, e de glicose solúvel em detergente neutro, foram 20,7 e 16,2% da MS, respectivamente. Apesar da polpa cítrica não ter amido (Hall et al., 1999), a glicose tem participação significativa na composição deste subproduto. Na polpa, a glicose solúvel em detergente neutro é majoritariamente originária do melão adicionado à polpa seca antes da peletização, já que este monossacarídeo representa apenas 1,4 a 2,4% do peso molecular total da pectina (Titgemeyer et al., 1992). Miron et al. (2001) ainda encontraram 10% de frutose como porcentagem da MS, certamente também originário de sacarose adicionada à polpa como melão. Estes números evidenciam a importância do melão na composição química da polpa cítrica. Assumindo que a relação entre o peso molecular da glicose e o peso molecular da frutose é 1,5:1 na molécula de sacarose, pode ser inferido que a concentração de sacarose na polpa cítrica seria 25% da MS. Estes cálculos corroboram com Hall et al. (1999), que encontraram 25,8% de oligossacarídeos na polpa cítrica. Considerando que a sacarose constitui o principal oligossacarídeo da polpa cítrica, a porcentagem de oligossacarídeo pode ser interpretada com a porcentagem de sacarose. Estes números estimam a importância da sacarose na composição química e na fermentação ruminal da polpa de citros. A diferença entre os 15% de glicose inferidos pela concentração de frutose e os 16% de glicose solúvel podem refletir a presença de glicose na pectina. A pectina tem entre 1,5 e 2,5% de glicose.

Hall et al. (1999) propõem a classificação das substâncias pécicas como fibra solúvel em detergente neutro (FSDN). A FSDN é mensurada por fracionamento dos carboidratos solúveis em detergente neutro (CSDN) com solução aquosa de etanol. Os CSDN seriam divididos em dois grupos: a) aqueles

que sofrem ação enzimática no intestino dos mamíferos (ácidos orgânicos, açúcares simples, oligossacarídeos e amido); b) aqueles não digestíveis no intestino (frutanos, pectina e (1-3) (1-4) α glucanos), classificados como fibra por não sofrerem digestão enzimática. A FSDN, apesar de indigestível por sistemas enzimáticos de mamíferos, é rapidamente fermentada no rúmen (Van Soest, 1994). Hall et al. (1997) compararam a fermentação *in vitro* da FSDN com a fermentação da pectina e observaram resultados semelhantes em produção de AGV, digestibilidade, taxa de degradação e produção de gás. Concluíram ser representativo a análise da FSDN como um parâmetro da concentração de substâncias pécnicas no alimento. Uma amostra de polpa cítrica com 20,5% de FDN e 63,4% de carboidratos não fibrosos na MS, apresentou 4,4% de ácidos orgânicos na MS, 25,8% de mono e oligossacarídeos solúveis em solução de etanol, supostamente representativos de sacarose neste alimento, 0% de amido, e 35,6% de pectina (Hall et al., 1999).

Outra definição aceita e utilizada pelo NRC (2001) classifica os carboidratos não estruturais (açúcares, ácidos orgânicos e outros açúcares de reserva, analisados pelo método enzimático de Smith (1981)) e a pectina como carboidratos não fibrosos. O cálculo dos carboidratos não fibrosos baseia-se na diferença com outras análises adotadas como rotina nos laboratórios, a saber: $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%Cinzas)$. O conceito de CNF tem a vantagem de não implicar em adoção de análises não realizadas rotineiramente nos laboratórios, em gastos ou análises complementares e ainda parece representar um parâmetro eficiente e prático no balanceamento de dietas (Hoover & Stokes, 1991). Calculando o CNF a partir da fórmula acima com os valores médios de Tabela de composição de alimentos do NRC (2001) para polpa cítrica (380 análises), encontramos o valor 57,2%; próximo dos valores somados de mono e oligossacarídeos na fração solúvel em solução de etanol (25,8%) e a FSDN (35,6%) encontrados por Hall et al. (1999), totalizando

61,4%. Se considerarmos os ácidos orgânicos (4,4%) o total seria 65,8%. A proximidade dos números sugere que a mensuração dos carboidratos pela solubilidade em etanol gera valores superiores mas próximos aos calculados como CNF.

A parede celular dos vegetais é uma estrutura biológica complexa, contendo diferentes moléculas, cuja biossíntese é controlada por enzimas produzidas e reguladas geneticamente (Van Soest, 1994). A Fibra (FDN ou FDA) é um produto analítico com características nutricionais particulares como as baixas solubilidade e digestibilidade comparativamente ao amido. Em certos casos, como em gramíneas maduras e subprodutos fibrosos oriundos de grãos de cereais, a concentração de parede celular e FDN são semelhantes, enquanto que em leguminosas temperadas e outros subprodutos fibrosos, como a polpa cítrica, a polpa de beterraba e a casca de soja, a estimativa analítica da FDN é numericamente inferior à concentração de parede celular. Esta disparidade acontece primariamente pela solubilidade da pectina na solução de detergente neutro, fazendo com que este carboidrato, um constituinte da parede celular, não faça parte do resíduo de digestão dos alimentos em solução de detergente neutro. A pectina ocorre na lâmina média (espaço entre as células) e em outras camadas da parede celular como cimentante. Sua deposição acontece na fase primária de crescimento da parede celular, juntamente com xilano, celulose e ácidos fenólicos, porém não existe deposição de lignina nesta fase (Jung & Allen, 1995). A hemicelulose não lignificada pode ocorrer nos vegetais e pode ser confundida com pectina. Alguns químicos evitam os termos pectina e hemicelulose não lignificada, classificando-os como polissacarídeos não celulosídicos da parede celular, denominação pouco descritiva sob o aspecto nutricional (Van Soest, 1994). Xilanos não lignificados, outro constituinte da parede celular, também podem ser solúveis em detergente neutro. Estes fatos questionam o uso do termo FDN, nutricionalmente representativo de

carboidratos de lenta degradabilidade e que podem ocupar espaço no rúmen, como sendo sinônimo de parede celular de vegetais (Jung & Allen, 1995).

A pectina contida na parede celular não tem ligação covalente com a lignina e por isso é muito disponível à fermentação ruminal, semelhantemente aos carboidratos não estruturais, sendo portanto classificada como carboidrato não-fibroso em dietas para ruminantes (NRC, 2001). Não obstante, se espera destes compostos atributos relativos aos carboidratos fibrosos, como a não produção de ácido láctico, o pouco efeito associativo negativo sobre a fermentação da FDN e um menor potencial de inibição da fermentação por indução de baixo pH ruminal. Segundo Van Soest (1994), a pectina é o carboidrato complexo mais rapidamente fermentado no rúmen, independentemente da origem, enquanto a degradação do amido e da celulose é dependente da fonte e do processamento do alimento.

A figura central da molécula de pectina é uma cadeia linear de ácido galacturônico ($C_6H_{10}O_7$) (poligalacturonato ou pectato), normalmente modificada no grupo ácido por metil ésteres (metoxil poligalacturonato ou pectina) ou íons de cálcio; interrompida por resíduos de L-ramnose ($C_6H_{12}O_5$), responsáveis por desvios abruptos da estrutura molecular. A composição da molécula de pectina varia em função da origem, mas geralmente tem 75% ou mais de ácido galacturônico. A pectina é uma molécula heterogênea e o grau de metilação é variável. A pectina da maçã tem 36,8% de esterificação, enquanto a pectina cítrica pode apresentar entre 65 e 73,4% de ácidos galacturônicos com metil éster (Kopečný & Hodrová, 1995; Silley, 1985). Aproximadamente 50% do resíduo de ramnose é substituído no carbono 4, esporadicamente no carbono 3, por resíduos de oligossacarídeos, principalmente arabinose ($C_5H_{10}O_5$) e galactose ($C_6H_{12}O_6$). Os açúcares neutros podem ser representativos no peso molecular e já foram descritas ligações covalentes destes com ácido ferúlico. Não obstante, arabinose e galactose também compõem outros polissacarídeos,

inclusive da parede celular (Miron et al., 2001). Como o amido, a pectina tem ligações C1-4, porém difere na ligação axial do carbono 4 (equatorial no amido), não sendo portanto susceptível à ação da amilase (Van Soest, 1994).

O conteúdo de CNF da polpa é invariavelmente superior a 60% da MS, predominantemente pectina. Estas características, associadas ao baixo teor protéico, enquadram a polpa como alimento concentrado energético. Entretanto, diferentemente do milho, ao qual é um eventual substituto, a polpa cítrica requer a presença no trato digestivo de sistemas anaeróbicos fermentativos para que seja digerida. Fibra e pectina não são digeridas por enzimas produzidas e secretadas por vertebrados e requerem enzimas de origem microbiana, presentes em quantidade significativa apenas no rúmen e no intestino grosso de herbívoros (Hobson, 1988). Os ruminantes são uma maneira eficiente de aproveitar este alimento, seu uso na alimentação de animais monogástricos sempre será restrito devido à limitada capacidade fermentativa destes animais. A transformação de pectina e fibra de polpa cítrica em carne ou leite bovino, por não representar uma competição pelo mesmo alimento com outros animais não-ruminantes, incluindo o homem, é biologicamente eficiente.

A substituição dietética total ou parcial de milho por polpa cítrica é uma alternativa para reduzir o custo alimentar. O subproduto apresenta custo histórico inferior ao milho. Entre janeiro de 2003 e novembro de 2005 a polpa cítrica foi em média 15% mais barata que o milho. Neste período, a polpa chegou a custar no máximo 95% do preço do milho em Maio de 2003 e no mínimo 57% do preço do milho em Janeiro de 2003 (Scot Consultoria, 2006). Em regiões do Brasil não excessivamente distantes da zona produtora de suco, e portanto com custo de transporte da indústria à fazenda condizente ao valor de outros eventuais substitutos, a polpa pode ser um fator decisivo na definição da eficiência financeira em sistemas de produção de leite.

2.1.2 Produção de leite com polpa cítrica comparativamente a milho

Dentre onze experimentos oriundos de oito trabalhos publicados (Broderick et al., 2002; Fegeros et al., 1995; Leiva et al., 2000; Martinez, 2004; Scoton, 2003; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005; Van Horn et al., 1975) a substituição total ou parcial de milho por polpa cítrica no concentrado resultou em redução significativa da produção de leite em três trabalhos com vacas de leite e um trabalho com ovelhas (TABELA 1). Experimentos de longa duração em delineamento do tipo contínuo (Broderick et al., 2002) ou de reversão com períodos de longa duração (Leiva et al., 2000) foram aparentemente mais efetivos em detectar diferenças em produção de leite do que experimentos de curta duração, mostrando que o efeito da substituição de milho por polpa pode surtir resposta de longo prazo sobre o desempenho animal. Dentre os três experimentos realizados com vacas de alta produção leiteira (Broderick et al., 2002; Leiva et al., 2000; Solomon et al., 2000), em dois (Broderick et al., 2002; Leiva et al., 2000) se observou efeito negativo da substituição de milho por polpa, provavelmente refletindo a maior sensibilidade destes animais a variação no perfil de carboidratos do concentrado. Estes resultados sugerem que é esperada queda na produção diária de leite quando polpa substitui milho em dietas para vacas de alta produção.

Solomon et al. (2000) não detectaram diferença significativa na produção de leite quando milho foi substituído por polpa cítrica. Neste trabalho, a substituição de milho por polpa foi acompanhada de um arranjo fatorial de tratamentos com ou sem a inclusão dietética de soja grão extrusada. A forrageira basal foi silagem de milho e silagem de gramínea. A substituição de milho por polpa nas dietas sem soja grão extrusada reduziu a produção de leite de 35,5 para 34,6 kg/d. Porém, nos tratamentos com soja grão extrusada a mudança no

TABELA 1. Produção de leite de vacas e ovelhas alimentadas em experimentos onde houve substituição de milho por polpa cítrica.

N/Trat	Delineamento ¹	Inclusão (%MS)		Leite (kg/d)		P	Referência
		Milho ⁴	Polpa ⁵	Milho	Polpa		
20	Reversão	23,7%	23,9%	36,9	36,4	>0,20	Solomon et al. (2000)
16	Contínuo	38%	19%	34,5	29,9	0,01	Broderick et al. (2002)
16 ²	Contínuo	26%	12% ³	35,8	34,2	0,17	Broderick et al. (2002)
184	Reversão	19,5%	20,5%	31,8	27,9	<0,01	Leiva et al. (2000)
36	Reversão	44,6%	43,1%	17,8	16,4	<0,05	Van Horn et al. (1975)
26 ³	Reversão	28,0%	30%	0,82	0,78	<0,10	Fegeros et al. (1995)
8	Reversão	51%	49%	18,3	18,8	0,78	Martinez (2004)
11	Reversão	51%	49%	13,3	13,0	0,90	Martinez (2004)
24	Reversão	41,0%	13%	18,1	17,6	>0,05	Scoton (2003)
28	Contínuo	47,4%	25%	7,3	7,7	NS	Tavares et al. (2005)

¹ Delineamento: Reversão – Cada animal recebe consecutivamente dois ou mais tratamentos durante a condução do experimento. Contínuo – Cada animal, uma vez alocado a um tratamento, o recebe do início ao final do experimento.

² Dietas com adição 12% de soja grão extrusada em substituição à mistura de milho e polpa relatada na linha acima.

³ Ovelhas leiteiras da raça Karagouniko.

⁴ Porcentagem de milho grão moído na dieta Milho. ⁵ Porcentagem de polpa cítrica na dieta Polpa.

perfil dos carboidratos dietéticos não induziu resposta em produção de leite (38,3 e 38,2 kg/d, nos tratamentos com milho e polpa, respectivamente). A inclusão de soja grão extrusada aumentou o teor de proteína bruta da dieta de 15% para cerca de 18%, e reduziu a porcentagem de CNF de 38 para 33%, tendo surtido efeito positivo sobre a produção de leite ($P < 0,01$). Parece que a adição à dieta de proteína de soja de baixa degradabilidade ruminal pode ter compensado possíveis diferenças na síntese ruminal de proteína microbiana induzida por substituição de amido de milho por carboidratos de polpa cítrica (Hall & Herejk, 2001). Não obstante, não foi detectada interação significativa entre a fonte de carboidrato e a inclusão de soja grão extrusada.

Em experimento utilizando vacas com potencial produtivo ao redor de 17 kg/d, Van Horn et al. (1975) observaram queda na produção diária de leite

quando ocorreu substituição total de milho por polpa em inclusão dietética ao redor de 40% da MS (TABELA 1). Estes autores usaram 25% de bagaço de cana peletizado como forrageira, induzindo uma alta representatividade tanto dos carboidratos do milho quanto daqueles na polpa no total de carboidratos não fibrosos da dieta. Entretanto, Scoton (2003) e Martinez (2004), trabalhando com vacas com potencial leiteiro similar ao de Van Horn et al. (1975), não evidenciaram resposta negativa em produção de leite quando houve substituição parcial de milho por polpa. Nestes experimentos a silagem de milho (Scoton, 2003) ou pastejo de capim elefante (Martinez, 2004) foram utilizados como forrageiras e apenas parte do milho foi substituído por polpa cítrica, ou seja, algum amido oriundo do concentrado foi mantido mesmo nas dietas com polpa. Tavares et al. (2005), trabalhando com vacas Girolando de baixo potencial produtivo, também observaram que a substituição parcial de milho por polpa no concentrado de vacas alimentadas com pasto de baixo valor nutritivo e cana-de-açúcar não afetou a produção de leite. Nestes experimentos com vacas de potencial produtivo médio a baixo, a substituição parcial de milho por polpa cítrica não induziu resposta negativa em desempenho.

Broderick et al. (2002) consideraram que a queda de 7,9% no consumo de MS foi a principal causa da queda em produção de leite quando 19,1 ou 13,4% de polpa cítrica foram adicionadas a dietas com 38,5 e 26,9% de milho como concentrado energético único, respectivamente (TABELA 1). Os tratamentos foram: milho grão maduro moído grosseiramente, silagem de milho úmido ou uma mistura de 50% de silagem de milho úmido e 50% de polpa cítrica; com ou sem 12% de proteína de soja, em uma combinação fatorial que resultou em seis tratamentos. As dietas com milho resultaram em maior secreção de lactose no leite e concentrações maiores de propionato no rúmen e glicose no sangue. A suplementação com soja aumentou a secreção de lactose e foi aparentemente mais efetiva em induzir uma resposta na dieta com polpa do que

nas dietas com milho ($P=0,10$ para a interação entre proteína e carboidrato), sugerindo que a dieta com polpa pode ter sido mais limitante da absorção de proteína metabolizável. O suprimento de substratos gliconeogênicos pode ter sido maior nas dietas com milho (Danfaer, 1994), entretanto é impossível afirmar se a resposta decorreu da diferença no metabolismo ruminal do tratamento com polpa comparativamente aos tratamentos com milho ou se foi resultado da diferença no consumo de MS entre tratamentos.

Outros dois trabalhos tratam da inclusão de polpa cítrica em dietas para vacas de leite. Nestes casos, entretanto, o delineamento experimental não objetivou comparar a substituição do milho por polpa no concentrado. Belibasakis & Tsirgogianni (1996) substituíram o milho e a polpa de beterraba por polpa cítrica. Em dietas com 50% de silagem de milho, a dieta controle, com 13,4% de milho e 15,0% de polpa de beterraba, foi comparada a uma dieta com 6% de milho e 20% de polpa cítrica. A produção de leite foi 23,1 e 23,6 kg/d, na polpa de beterraba e na polpa cítrica, respectivamente, mostrando a similaridade nutricional entre estes subprodutos, ambos ricos em pectina e fibra de alta digestibilidade.

Drude et al. (1971) avaliaram a substituição de silagem de milho por alfafa peletizada em dietas formuladas com 40% de cada forragem e 60% de concentrado à base de farelo de algodão e polpa cítrica. A substituição de silagem de milho por alfafa deprimiu a produção de leite ($P<0,05$), sugerindo que algum amido pode ser necessário em dietas formuladas com polpa cítrica, especialmente quando a fonte protéica utilizada não é de alta qualidade, o que teoricamente aumenta a dependência da síntese ruminal de proteína microbiana no rúmen para o fluxo de proteína metabolizável.

2.1.3 Produção de gordura com polpa cítrica comparativamente a milho

A substituição de milho por polpa cítrica aumentou a porcentagem de gordura no leite em dois experimentos com vacas de leite (Leiva et al., 2000, Van Horn et al., 1975), mas não afetou em cinco experimentos com vacas (Broderick et al., 2002; Martinez, 2004; Scoton, 2003; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005) e em um experimento com ovelhas (Fegeros et al., 1995). Apesar da polpa cítrica ser considerada uma fonte de fibra efetiva, a se julgar pela resposta em teor de gordura no leite o fator de efetividade de sua FDN parece não ser alto (Armentano & Pereira, 1997). Esta resposta pode ser explicada pelo alto conteúdo neste alimento de açúcares de rápida fermentabilidade no rúmen (Hall et al., 1999; Miron et al., 2001) e pelo fato da maioria das substituições dietéticas nos experimentos revisados terem sido feitas em dietas com alto teor de FDN oriundo de forragens. A avaliação do fator de efetividade da FDN de subprodutos fibrosos é mais efetivamente realizada pela inclusão do subproduto sendo testado em dietas deficientes em FDN oriundo de forragem (Armentano & Pereira, 1997).

A diferença mais significativa em teor de gordura no leite ocorreu em vacas alimentadas com 25% de bagaço de cana peletizado como forrageira única (Van Horn et al., 1975). O teor de gordura neste experimento foi 4,22% no tratamento com 43% de polpa na dieta e caiu para 3,54% quando milho substituiu polpa, resultando em um teor dietético de polpa de 8%. Baseado nestes dados, parece que quando a inclusão de forragem na dieta é baixa, a substituição de milho por polpa pode aumentar o teor de gordura no leite, apesar dos autores não terem relatado o teor de FDN dos alimentos utilizados ou da dieta total, o que limita a interpretação dos resultados. Entretanto, a utilização de apenas 25% de bagaço de cana peletizado como forrageira única certamente

resultou em baixo conteúdo de FDN fisicamente efetivo em todos os tratamentos (Armentano & Pereira, 1997).

Leiva et al. (2000) também observaram redução no teor de gordura de 3,45% para 3,27% quando milho substituiu polpa em dietas onde ambos os alimentos representavam cerca de 20% da MS. Entretanto, Broderick et al. (2002) e Solomon et al. (2000), também trabalhando com vacas com produção diária de leite acima de 30 kg, não detectaram efeito da substituição de milho por polpa sobre o teor de gordura no leite. Em todos os tratamentos destes experimentos o teor de gordura foi baixo, variando de 3,3 a 3,5%. Leiva et al. (2000) trabalharam com dietas contendo 30% de silagem de milho e 15% de feno de alfafa. Broderick et al. (2002) usaram dietas com 60% de silagem de alfafa e 10% de silagem de capim. A maior inclusão dietética de forragem e o maior tamanho de partícula da dieta do segundo experimento pode ter mascarado o efeito da inclusão da polpa em substituição ao milho.

No experimento de Belibasakis et al. (1996), 20% de polpa cítrica substituíram 8% de milho e 15% de polpa de beterraba, em dietas com 50% de silagem de milho. Os outros ingredientes foram farelo de soja e farelo de trigo. As vacas, com produção média diária de leite de 23 kg, apresentaram 4,48% de gordura no leite na dieta polpa e 4,12% na dieta com milho e beterraba ($P<0,05$). A se julgar por este trabalho, a efetividade da FDN da polpa cítrica parece ser maior que a efetividade da FDN da polpa de beterraba, apesar desta conclusão estar parcialmente confundida pela inclusão de milho no tratamento com beterraba. O fator de efetividade da FDN na polpa de beterraba tem sido mensurada experimentalmente e está ao redor de 0,50 (Clark & Armentano, 1997).

A substituição de milho por polpa cítrica não afetou a produção de gordura em quatro experimentos (Martinez, 2004; Scoton, 2003; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005), mas reduziu a produção total de gordura em dois

(Broderick et al., 2002; Leiva et al., 2000). A produção de gordura foi reduzida com a inclusão de polpa nos experimentos com vacas de maior produção, resultado do efeito negativo da substituição de milho por polpa sobre o volume diário de leite produzido. O menor teor de gordura no tratamento onde milho substituiu polpa no experimento de Leiva et al. (2000) pode ter sido resultado da diluição pelo maior volume diário de produção de leite.

Apesar de se esperar um maior teor de gordura quando pectina e fibra de polpa substituem milho no concentrado, a direção da resposta em teor e produção de gordura à substituição de milho por polpa cítrica não tem sido consistente entre experimentos. Diferenças no teor dietético, tipo e tamanho de partícula das forragens utilizadas nos vários experimentos, no tipo e teor dietético do amido substituído por polpa e em fatores ligados à capacidade genética de produzir gordura e estágio de lactação das unidades experimentais são de difícil interpretação e certamente interagem com a inclusão de polpa, podendo explicar a inconstância na resposta em teor e produção de gordura à substituição de amido de milho por polpa cítrica. O perfil de fermentação da pectina, com maior proporção de ácido acético em comparação à fermentação do amido e uma suposta maior capacidade de manter alto pH ruminal (Ben-Ghedalia et al., 1989), suporta a expectativa de maior gordura no leite em dietas com polpa. Porém, a mudança na relação entre acetato e propionato parece ser uma explicação não suficiente para a resposta observada em teor de gordura no leite em resposta a variação no perfil dos carboidratos dietéticos (Bauman et al., 1970).

O teor de gordura no leite pode estar associado ao processo de biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos da dieta. O processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados é importante para atender a demanda nutricional dos microorganismos ruminais por ácido vaccênico (C18:1, trans-11) e para evitar a ação tóxica dos ácidos graxos insaturados sobre a

microbiota ruminal (Hobson, 1988). A biohidrogenação começa com a hidrólise dos triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos poliinsaturados. A biohidrogenação dos ácidos linolênico e linoleico a ácido esteárico envolve a formação de uma série de intermediários metabólicos, dentre eles os ácidos rumênico (C18:2, cis-9, trans-11) e vaccênico. Excesso de substrato lipídico ou dietas com alto conteúdo de amido e capazes de reduzir o pH ruminal parecem aumentar o fluxo destes intermediários do rúmen para o sangue (Griinari et al., 1998; Kalscheur et al., 1997). Estes ácidos são incorporados à gordura do leite, explicando a correlação negativa entre a concentração destes ácidos graxos na gordura e a porcentagem de gordura no leite de ratas (Teter et al., 1990) e de vacas (Wonsil et al., 1994). A maior absorção de ácido rumênico originário do rúmen ou a conversão de ácido vaccênico em rumênico pela ação de desaturases mamárias parece inibir a expressão gênica de enzimas ligadas à síntese de ácidos graxos de cadeia curta pela glândula mamária (Piperova et al., 2000). A posição da ligação dupla no isômero produzido durante a fermentação ruminal também é importante. A depressão de gordura ocorreu quando a concentração do ácido vaccênico trans 10 (C18:1) aumentou no leite, mas não ocorreu com a maior concentração do ácido vaccênico trans 11 (C18:1) (Griinari et al., 1998). Neste experimento, as vacas alimentadas em dietas com concentrado e adição de óleo vegetal apresentaram aumento do ácido vaccênico trans 10 (C18:1) e redução do teor de gordura do leite, enquanto as vacas alimentadas com forragem e óleo vegetal não apresentaram redução do teor de gordura do leite e aumento do ácido vaccênico trans 11 (C18:1).

Em ovelhas, a substituição de milho por polpa cítrica reduziu a concentração dos ácidos graxos com menos de 16 carbonos no leite (Fegeros et al., 1994). Este fato parece ser surpreendente, uma vez que a redução dos ácidos graxos de cadeia curta, sintetizados pela glândula mamária, esta associada à redução no teor de gordura no leite. Solomon et al. (2000) também observaram

menor concentração de 4 dos 8 ácidos graxos de cadeia curta analisados e detectaram maior concentração de ácido vaccênico no leite de vacas onde polpa substituiu milho, apesar do teor médio de gordura no leite ter sido baixo (3,33%) e não ter diferido entre tratamentos. Como neste trabalho o pH ruminal não variou entre tratamentos, a variação no perfil de ácidos da gordura do leite pode ter sido determinada pela variação induzida no perfil de carboidratos dietéticos por substituição de milho por polpa cítrica. Apesar da polpa ser considerada uma fonte de fibra e pectina, uma proporção considerável deste alimento é composta por sacarose (Hall et al., 1999; Miron et al., 2001). Nada se sabe sobre o efeito específico de pectina e sacarose sobre o perfil de ácidos graxos na gordura do leite.

2.1.4 Produção de proteína com polpa cítrica comparativamente a milho

Em dois experimentos realizados com vacas de alta produção a substituição de milho por polpa cítrica reduziu a porcentagem de proteína no leite (Broderick et al., 2002; Solomon et al., 2000) enquanto que no trabalho de Leiva et al. (2000), de menor produção diária que os dois anteriores, não foi detectado efeito desta substituição (TABELA 2). Nestes experimentos utilizando vacas produzindo 30 kg ou mais de leite por dia, a substituição de milho por polpa consistentemente reduziu a excreção diária de proteína. Em contraste, em experimentos trabalhando com vacas de potencial produtivo inferior a 20 kg/dia, a variação no perfil de carboidratos não foi capaz de induzir resposta detectável experimentalmente no teor e na produção de proteína no leite (Martinez, 2004; Scoton, 2003; Tavares et al., 2005; Van Horn et al., 1975), o mesmo sendo observado em ovelhas (Fegeros et al., 1996). A variação no perfil de carboidratos pode ter sido capaz de limitar o aporte de aminoácidos metabolizáveis apenas em animais com alta demanda nutricional.

A excreção de proteína no leite é dependente do fluxo de proteína no intestino delgado. A principal fonte de proteína para o intestino delgado é a proteína microbiana, majoritariamente das bactérias ruminais. A síntese de proteína microbiana é dependente da disponibilidade de energia e esqueletos de carbonos durante o metabolismo ruminal de carboidratos. Considerando que a pectina e a sacarose são os principais CNF da polpa cítrica e que o amido é o principal CNF do milho grão, diferenças na metabolização ruminal destes carboidratos podem determinar a disponibilidade de aminoácidos metabolizáveis para a glândula mamária. A produção máxima de proteína microbiana *in vitro* foi inferior em culturas com pectina, sacarose ou fibra do que em culturas com amido, sendo que a pectina produziu 88% da proteína da cultura com amido (Hall & Herejk, 2001).

Dusková & Marounek (2001) estudaram o crescimento de *Lachnospira multiparus* em meio de cultura com pectina cítrica ou glicose. No cultivo com pectina a síntese de proteína microbiana foi 229 mg/g de carbono utilizado, enquanto que no cultivo com glicose foi 284 mg/g de carbono utilizado ($P < 0,05$). A maior eficiência de síntese de proteína microbiana *in vitro* quando glicose foi utilizada como substrato sugere que a substituição de milho por polpa cítrica pode ser capaz de reduzir a síntese ruminal de proteína microbiana *in vivo*, potencialmente capaz de induzir queda na produção diária de proteína no leite. Os autores ainda detectaram enzimas de uma via glicolítica alternativa nas culturas com pectina, enzimas estas que não foram constatadas nas culturas com glicose, evidenciando diferenças bioquímicas nas rotas metabólicas de conversão de cada substrato a piruvato. Segundo os autores, as enzimas detectadas nas culturas com pectina foram típicas da via glicolítica Entner-Doudoroff. Esta via produz menos ATP por mol de monossacarídeo fermentado do que a via glicolítica clássica de Embden–Meyerhoff. O menor ganho de energia na metabolização do ácido galacturônico em comparação à quebra do

amido na glicose pode explicar a menor síntese de proteína microbiana quando pectina substitui amido.

TABELA 2. Produção de leite, porcentagem e produção de proteína no leite em vacas onde houve substituição de milho por polpa cítrica.

Autores	Leite (kg/dia)	Teor de proteína	Gramas de proteína/dia
		(Milho-Polpa)	(Milho-Polpa)
Leiva et al. (2000)	29,9	3,10 (NS)	960-880 **
Broderick et al. (2002)	33,6	3,08-2,86**	1060-960 **
Solomon et al. (2000)	36,5	3,00-2,93**	1050-1010 **
Van Horn et al. (1975)	17,1	3,47 (NS)	Não informado
Tavares et al. (2005)	7,5	3,45 (NS)	255 (NS)
Martinez (2004)	18,7	3,06 (NS)	570 (NS)
Scoton (2003)	17,9	3,47 (NS)	573 (NS)

** $P < 0,01$. (NS): Não significativo ($P > 0,10$).

2.1.5 Síntese ruminal de proteína microbiana

A proteína metabolizável é a soma da proteína dietética sobrepassante da fermentação ruminal, da proteína microbiana sintetizada no rúmen e da pouca proteína endógena que chega ao duodeno. A principal fonte dietética de proteína para vacas de leite é a proteína oriunda dos microorganismos ruminais (NRC 2001). A síntese de proteína microbiana no rúmen é determinada pela taxa de crescimento microbiano (Van Soest, 1994). O crescimento microbiano depende do fornecimento de ATP pela fermentação ruminal. Os carboidratos são a principal fonte de energia para os microorganismos do rúmen.

2.1.5.1 A via glicolítica de Entner-Doudoroff

A glicólise convencional do ácido galacturônico não ocorre nas bactérias pectinolíticas do rúmen. Em culturas com pectina de *Lachnospira multiparus* (Dusková & Marounek, 2001) e *Treponema saccharophilum* (Paster & Canale-

Parola, 1985) foi detectada atividade da enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase (KdPGA). Esta enzima foi considerada a chave da via glicolítica descrita originalmente por Entner & Doudoroff (1952). Esta enzima é responsável pela hidrólise do ácido glicônico em piruvato e gliceraldeído 3-fosfato (FIGURA 1 e 2). Esta enzima e esta etapa não ocorrem na via glicolítica tradicional, descrita originalmente por Embden, Meyerhoff e Parma. A via de Embden-Meyerhoff é a principal via glicolítica das bactérias ruminais (Hobson, 1988). É a via glicolítica conhecida mais eficiente no ganho de energia na forma de ATP por mol de glicose ou outra hexose, como o ácido galacturônico. Porém existem outras vias glicolíticas menos eficientes utilizadas pelas bactérias ruminais, como a via das pentoses ou a via de Entner-Doudoroff (Hobson, 1988).

A via de Entner-Doudoroff foi descrita originalmente em *Pseudomonas saccharophila* em meio aeróbico. Na descrição original desta via glicolítica, portanto, existe a entrada de oxigênio, mais especificamente na etapa de formação do ácido glicônico a partir da glicose 6-fosfato (FIGURA 2). Não obstante, os próprios autores admitem que esta via glicolítica também ocorre em meio anaeróbico. Por isso, sempre que os autores descrevem a via de Entner-Doudoroff em bactérias pectinolíticas ruminais, descrevem-na como “via Entner-Doudoroff modificada” (Paster & Canale-Parola, 1985; Dusková & Marounek, 2001).

A glicólise da glicose e ácidos glicolíticos, como o ácido galacturônico, pode ocorrer de maneira convencional por uma seqüência de reações descritas por Embden, Meyerhoff e Parma. Na seqüência de reações de Embden-Meyerhoff, a glicose é fosforilada duas vezes antes da molécula sofrer cisão. A glicose 1,6 difosfato origina duas trioses fosfatadas, que são fosfatadas ainda mais uma vez, antes de serem defosforiladas, originando ATP a partir de ADP. Na via sugerida por Entner-Doudoroff a fosforilação da glicose ocorre uma única vez antes da cisão em duas trioses (FIGURA 1 e 2). Na rota de Entner-

Doudoroff a glicose monofosfatada (glicose-6-fosfato) origina uma triose fosfatada e uma triose sem fósforo. Desta maneira a produção de ATP fica limitada à triose fosfatada. Ainda sim, a triose fosfatada não sofre uma segunda fosforilação, produzindo um único ATP no final do processo. Desta maneira o saldo de ATP na via glicolítica Entner-Doudoroff é zero, enquanto que na via glicolítica de Embden-Meyerhof o saldo é de dois ATP por mol de glicose oxidada. Na descrição original da via de Entner-Doudoroff alguns intermediários da glicólise não foram identificados com precisão e admite-se que a segunda fosforilação da triose possa ocorrer. Mesmo considerando que a defosforilação do gliceraldeído-3-fosfato siga a mesma seqüência de reações do final da glicólise convencional, ainda assim se obtém apenas um mol de ATP por mol de glicose.

Nas culturas de *Lachnospira multiparus* com glicose também foi evidenciado aumento na atividade da enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase (KdPGA) (Dusková & Marounek, 2001). Portanto, parece que a glicose também foi catabolizada pela via Entner-Doudoroff nestas bactérias. Porém não foi identificada atividade da enzima 6-fosfogluconato desidratase, esta enzima é necessária para o catabolismo da glicose pela via Entner-Doudoroff, mas não para o catabolismo do ácido galacturônico. Portanto, ou a glicose foi catabolizada por uma via Entner-Doudoroff modificada ou existiu algum erro na determinação da atividade enzimática.

Portanto, quando a pectina constitui o principal carboidrato de rápida fermentabilidade na dieta, o aumento induzido pela disponibilidade deste substrato na população de *Lachnospira multiparus* pode afetar a eficiência de síntese de proteína microbiana, tanto pela menor eficiência energética da conversão de ácido galacturônico em piruvato pela rota de Entner-Doudoroff, quanto pela também menor eficiência no catabolismo da glicose oriunda de

algun amido dietético por esta mesma rota metabólica, em vez de ser utilizada a rota de Embden-Meyerhof, rotineiramente prevalente no rúmen.

Paster & Canale-Parola (1985) conseguiram isolar um espiroqueta do rúmen com características peculiares suficientes para proporem a classificação de uma nova espécie, que chamaram de *Treponema saccharophilum*. Os extratos com amido apresentaram glicose-fosfato isomerase e gliceraldeído-fosfato desidrogenase, enquanto nos extratos com pectina detectaram-se altos níveis de 2-ceto-3-desoxi-fosfogluconato aldolase (KdPG aldolase). A degradação anaeróbica de pectina leva a formação de ácido 2-ceto-3-desoxiglucurônico, fosforilado e hidrolisado a piruvato e 3-fosfogliceraldeído por intermédio da KdPG aldolase, uma enzima chave da via Entner-Doudoroff. Neste caso, parece que a degradação da pectina e ácidos urônicos aconteceu, ao menos parcialmente, através da via Entner-Doudoroff, ao contrário da glicose, cujas enzimas isoladas são típicas da via Embden-Meyerhof.

2.1.5.2 Rendimento do peso dos carbonos disponíveis pelo peso molecular do monossacarídeo (glicose ou ácido galacturônico)

Hall & Herejk (2001) compararam a produção de proteína microbiana *in vitro* a partir amido purificado de milho, pectina purificada de polpa cítrica, sacarose ou FDN purificado de gramínea. Para quantificar a produção de proteína bruta microbiana ao longo do tempo foi utilizado o ácido tricloroacético para precipitar proteínas e N (nitrogênio) de macromoléculas provenientes da fermentação microbiana. Amostras de FDN oriundo de feno de gramínea (*Cynodon dactylon*) foram purificadas para compor os substratos fermentativos na proporção 60:40 (FDN:cada carboidrato em teste). Os tubos contendo fluído ruminal e os substratos foram amostrados de 4 em 4 horas ao longo das 24 horas de incubação. As curvas de crescimento microbiano foram estimadas por regressão (FIGURA 3). No cultivo com amido foi observado o valor máximo de

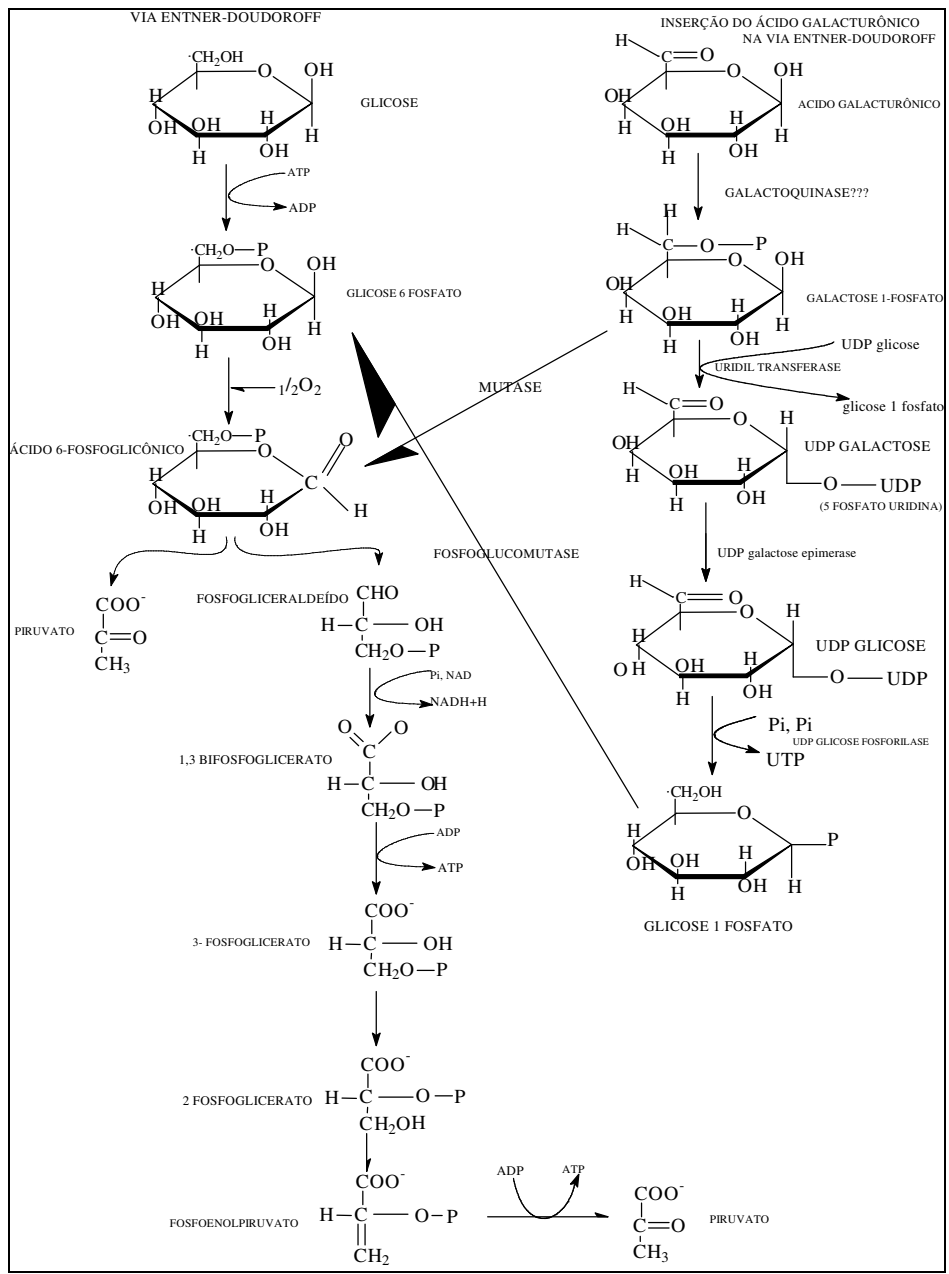


FIGURA 1. Glicólise da glicose ou ácido galacturônico pela via de Entner-Doudoroff, considerando a conversão do ácido galacturônico pela galactoquinase.

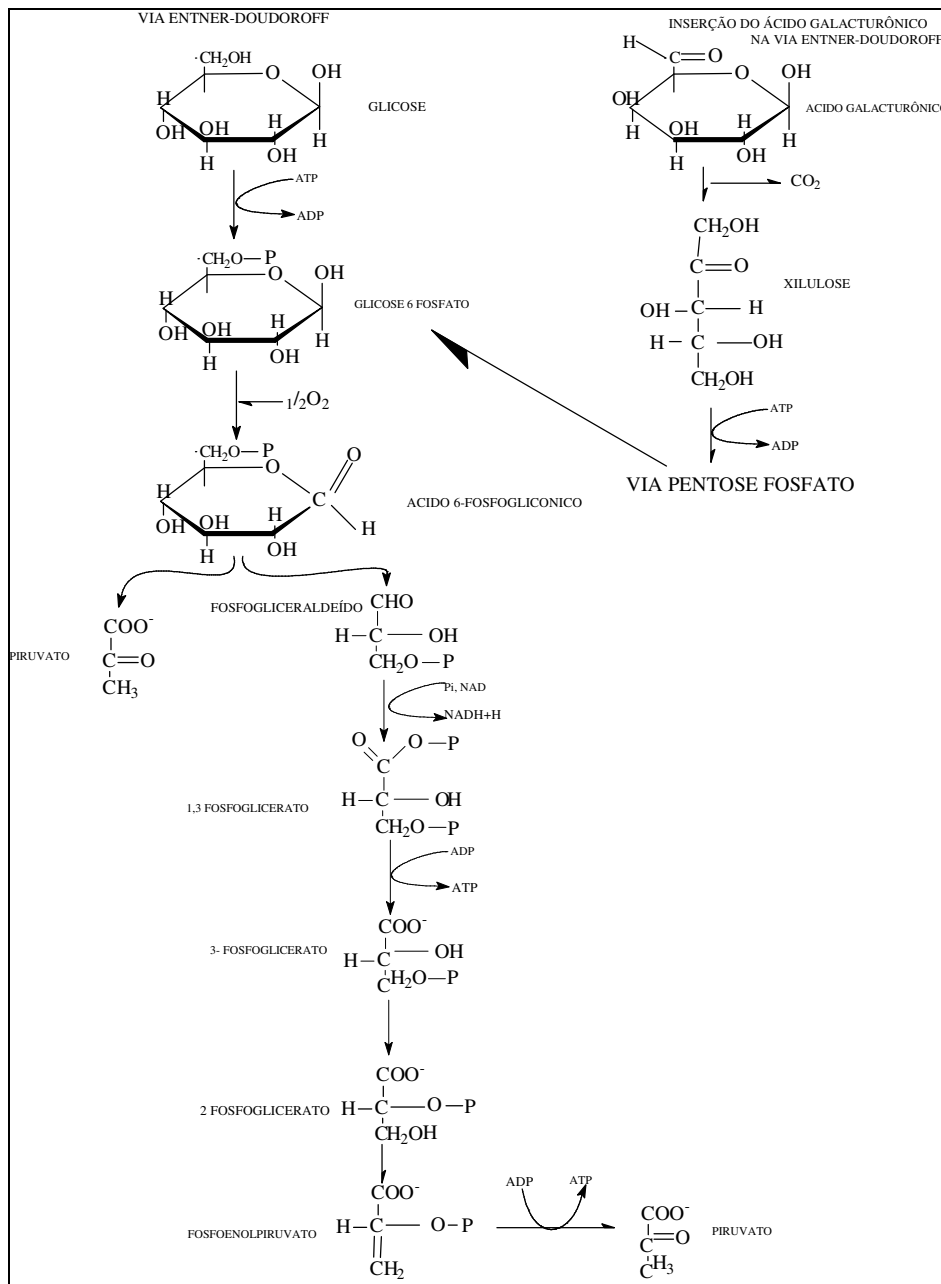


FIGURA 2. Glicólise da glicose ou ácido galacturônico pela via Entner Doudoroff, considerando a conversão do ácido galacturônico pela via das pentoses ou via pentose/fosfato.

proteína precipitada por unidade de substrato, enquanto estes valores para pectina e sacarose foram similares e inferiores ao valor observado para o amido. O menor valor para o máximo de síntese microbiana ao longo do tempo foi observado nos cultivos contendo apenas FDN isolado de gramínea como substrato. As curvas estimadas de crescimento microbiano não foram paralelas ($P < 0,01$), mostrando que a síntese protéica ao longo do tempo diferiu entre substratos. As equações de regressão da sacarose e da FDN foram cúbicas, enquanto as curvas do amido e da pectina foram quadráticas. O crescimento microbiano nos estádios iniciais da incubação foi mais rápido para a pectina e para a sacarose do que para o amido. Entretanto, o pico de produção microbiana na pectina ocorreu com 13 horas de incubação enquanto o pico no amido foi mais alto e ocorreu com 16 horas. Após o pico de produção microbiana ser atingido ocorreu queda da síntese protéica, mas a queda após o ponto de máximo crescimento foi baixa na sacarose, mostrando que este carboidrato, apesar de não ter resultado no maior valor máximo de síntese protéica, resultou no crescimento mais constante ao longo do tempo. O amido resultou na maior produção acumulada de proteína microbiana ao longo das 24 horas de incubação. A produção máxima de proteína microbiana relativamente à produção com amido foi 0,75 para a sacarose e 0,88 para a pectina. Após correção destes valores para a fermentação da FDN purificada, os valores proporcionais para a sacarose e para a pectina foram 0,74 e 0,89, respectivamente.

Hall & Herejk (2001) argumentaram que a diferença na síntese de proteína microbiana nas culturas com amido e pectina poderia ser explicada pela relação entre o número de carbonos nas moléculas de ácido galacturônico e glicose e seus respectivos pesos moleculares. Um mol de glicose pesa 180

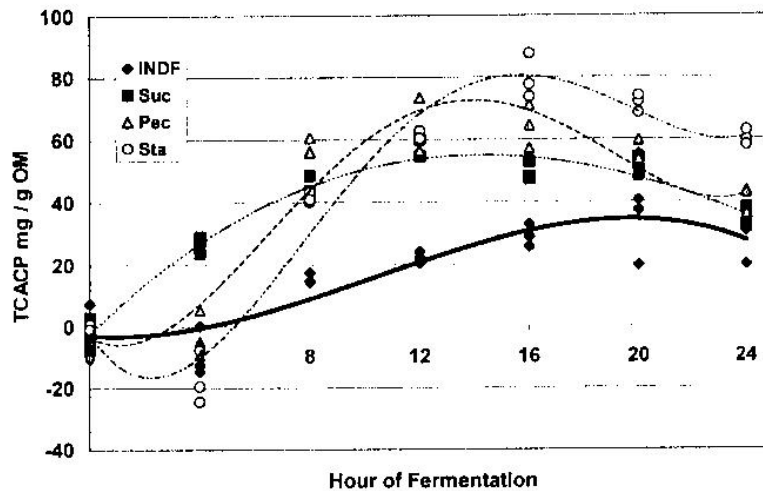


FIGURA 3. Precipitado de ácido tricloroacético (proteína bruta microbiana) por unidade de matéria orgânica fermentada *in vitro*. (iFDN=FDN de *Cynodon dactylon*; Suc= iFDN + sacarose; Pec= iFDN + pectina de citros; Sta= iFDN + amido de milho). Figura copiada de Hall & Herejk (2001) (Título original da figura foi mantido).

daltons, o ácido galacturônico pesa 194 daltons e o ácido galacturônico metoxilado pesa 208 daltons. A pectina purificada de polpa cítrica apresenta cerca de 64% de seus ácidos galacturônicos em forma metoxilada, resultando em um peso molecular médio ao redor de 203 daltons. A glicose tem 6 carbonos e o ácido galacturônico teria em média 6,64 carbonos disponíveis por mol, número obtido pela proporção entre ácidos metoxilados e não metoxilados. Porém o grupo metil pode ser hidrolisado pelas bactérias ruminais, produzindo metanol. Então consideraram seis carbonos disponíveis na molécula de ácido galacturônico para produzir energia ou esqueleto de carbono para as bactérias. Para o cálculo, o número de carbonos disponíveis por molécula foi multiplicado por seu peso atômico. O total foi dividido pelo peso molecular da glicose e ácido

galacturônico, respectivamente. A relação entre o peso de carbonos disponíveis e o peso molecular foi 0,40 para glicose e 0,355 para ácido galacturônico. Dividindo 0,355 por 0,40 chegaram a 0,888. Este número foi o mesmo encontrado através das equações de regressão para a proporção entre a síntese de proteína microbiana na cultura com pectina proporcionalmente à síntese na cultura com amido. O raciocínio, embora lógico sob o ponto de vista matemático, não explicita uma causa fisiológica para a diferença observada.

Não obstante, o raciocínio dos autores acima pode ser aproveitado. A produção de moles de ATP por mole de monossacarídeo fermentado é um componente determinante da síntese microbiana ruminal (Van Soest, 1994). Portanto se o denominador aumentar, ou seja, o peso molecular do monômero que é fermentado for superior, e o numerador permanecer inalterado, a produção por mole obviamente diminui. Admitindo-se a produção de ATP por mole na glicólise convencional, teríamos 2 ATP por 180 (PM) de glicose e 2 ATP por 203 (PM) de ácido galacturônico, respectivamente. Desta maneira o rendimento por mole ou por gramas de monossacarídeo fermentado seria superior, ao menos na etapa de glicólise, da glicose em relação ao ácido galacturônico.

A produção de proteína microbiana da sacarose foi inferior ao da pectina ($P=0.03$). Porém, a curva de precipitação do ácido tricloroacético da sacarose foi a única entre os substratos testados sem “período de atraso” (lag time), provavelmente devido sua alta solubilidade. Após atingir o ponto de máxima síntese de proteína (ponto mais alto da curva), a curva declinou mais lentamente em comparação aos outros substratos. Ou seja, a curva de precipitação de proteína da sacarose foi mais estável que dos outros substratos após atingir o platô. É possível que as bactérias que fermentam a sacarose possam armazenar sacarose como um carboidrato de reserva microbiano. Carboidratos solúveis podem ser armazenados por bactérias ruminais. Quando a concentração de sacarose declinou no meio de cultura, estas bactérias podem ter utilizado a

reserva de sacarose para mantença, mantendo a população microbiana, sem, contudo, continuar a apresentar o mesmo crescimento exponencial do início da fermentação.

A rápida fermentação da pectina e da sacarose no início da fermentação permitiu uma curva de regressão superior destes substratos em relação ao amido, até 10 horas de cultura. Porém, com o declínio da velocidade de síntese daqueles e aumento deste, o amido superou, na produção total, a síntese de proteína microbiana tanto da sacarose como da pectina.

2.1.5.3 Economia de aminoácidos gliconeogênicos

Outra hipótese que pode estar envolvida na resposta positiva em proteína no leite quando milho substitui polpa cítrica refere-se às diferenças na fermentação ruminal entre estas fontes de carboidratos. A fermentação de amido no rúmen gera maior fluxo de ácido propiônico para o sangue do que a fermentação de polpa cítrica, onde ocorre uma redução na produção de propionato e aumento na produção de acetato. Broderick et al. (2002) observaram redução significativa da concentração ruminal de propionato ($P=0.04$) quando polpa cítrica substituiu 50% do milho grão maduro moído no concentrado. A *Lachnospira multiparus* não produziu propionato em meio de cultura com pectina ou glicose durante as 48 horas de cultivo. Em nenhum dos tratamentos (pectina ou glicose) foi detectado propionato. Os produtos da fermentação foram acetato, lactato, formato e etanol. A produção de acetato foi superior na cultura com pectina do que na cultura com glicose (Dusková & Marounek, 2001). Marounek et al. (1985) observaram que a produção de acetato chegou a corresponder a 95% do AGV total *in vitro*, com inoculo misto de bactérias oriundo de líquido ruminal de cabra. O maior fluxo de propionato para o fígado em dietas com milho poderia suportar maior síntese de glicose a partir

deste substrato, poupando aminoácidos gliconeogênicos. Neste caso seria aumentada a disponibilidade de aminoácidos metabolizáveis para a glândula mamária. Broderick et al. (2002) observaram menor concentração de glicose no sangue (55,9 vs 60,1 mg/dl), menor porcentagem de lactose no leite (4,78 vs 4,88 %), menor concentração molar de propionato no rúmen (18.7 vs 19.7 mol/100 mol de AGV total) e maior produção e teor de proteína no leite em vacas alimentadas com 50% de polpa cítrica e 50% de milho no concentrado em comparação a vacas alimentadas somente com milho, mostrando que a substituição de polpa por milho pode ter atuado sobre a disponibilidade de substratos gliconeogênicos.

2.1.6 Fermentação ruminal

Pulsos intraruminais de polpa cítrica ou milho grão moído em vacas alimentadas com cana de açúcar mostraram pH inferior do tratamento polpa. A polpa cítrica ou milho foram fornecidos em pulsos equivalentes a 0,8% do PV, acrescidos de uréia na quantidade de 0,02% do PV, de vacas fistuladas no rúmen. O pH ruminal mínimo do tratamento polpa foi de 5,5 e do milho de 6,0 (Costa, 2002). O menor pH da polpa pode ser explicado pela limitação de crescimento de bactérias que fermentam pectina, que tem pH ótimo em torno de 6,25 (Osborne & Dehoroty, 1989). O menor pH ruminal da dieta com 50% de substituição do milho grão maduro moído por polpa cítrica também ocorreu em vacas de alta produção (Broderick et al., 2002). Neste caso a concentração de amônia ruminal foi inferior na dieta polpa ($P=0.04$). A concentração de amônia caiu de 18,5 para 15 mg/dl. A menor concentração de amônia no rúmen pode estar relacionada a maior velocidade de fermentação inicial da pectina e sacarose da polpa cítrica do que do amido do milho maduro. No caso do trabalho de Costa (2002), o pulso de polpa reduziu o pH ruminal para 5,5 com 3 horas após

a alimentação. Neste tempo o pH do pulso de amido encontrava-se em 6,5. O menor pH do pulso de amido ocorreu com 4 horas. Portanto o milho fermentou mais devagar que a polpa, que induziu um pH baixo rapidamente. A fermentação da pectina e sacarose de fato parecem ter sido mais rápidas que a fermentação do amido quando se determinou a síntese de proteína microbiana (Hall et al., 1999). Portanto, a polpa tem velocidade de degradação mais rápida que do milho, porém ocorre uma limitação da fermentação em pH baixo (Marounek et al., 1985). Como a velocidade de deaminação dos aminoácidos e transformação de uréia em amônia também é rápida, uma maior capitação de amônia ruminal nas dietas com polpa pode ser esperada. Porém, a degradação constante do amido do milho ao longo do tempo (Leiva et al., 2000), que não foi inibida pelo baixo pH (Marounek et al., 1985), parece ser capaz de suportar maior crescimento microbiano ao longo de 24 horas (Hall et al., 1999).

Marounek et al. (1985) avaliaram a produção de AGV *in vitro* de celulose, hemicelulose, amido (purificado) e pectina cítrica (TABELA 3). O inóculo ruminal foi proveniente de cabras fistuladas alimentadas somente com 1 kg de feno ou com 0,5 kg de feno e 0,5 kg de grão de cevada moído. O inóculo ruminal foi utilizado completo ou filtrado (somente o fluido). O pH das culturas ruminal foi utilizado completo ou filtrado (somente o fluido). O pH das culturas variou entre 7,2 e 6,7 (neutro) ou entre 6,4 e 5,75 (médio ácido). Nas culturas com pectina a concentração total de AGV foi superior no pH neutro e conteúdo ruminal completo (68,9 a 74,4 mmol/l). O uso do fluido ruminal filtrado ou pH médio ácido (mais baixo) inibiu a fermentação da pectina, com redução do AGV total para 31,2 a 26,3 mmol/l. O inoculo proveniente de cabras alimentadas com grão de cevada moído não inibiu a fermentação da pectina no pH neutro (74 a 61 mmol/l), mas inibiu acentuadamente a fermentação no pH médio ácido (32 a 26 mmol/l). A proporção de acetato foi entre 84 e 95 % do total de AGV, enquanto a produção de butirato foi insignificante com pectina. A proporção acetato:propionato foi superior em culturas com conteúdo ruminal total

comparado a culturas com fluido ruminal (25,8 vs 7,5, respectivamente), evidenciando a importância da adesão das bactérias as partículas no processo de degradação da pectina. Não obstante, nas culturas com amido a produção de total de AGV foi superior em pH médio ácido (83 vs 72 mmol/l) e não sofreu influência do inoculo (conteúdo total ou fluido ruminal). A produção de lactato foi mínima nas culturas com pectina ou hemicelulose (< 1 mmol/l), enquanto as culturas com amido apresentaram concentração média de 3 mmol/l.

TABELA 3. Produção de AGV durante fermentação da pectina *in vitro* com inoculo de cabra alimentada com feno ou com feno e grão de cevada moído (50:50). Marounek et al. (1985).

Inóculo	pH	mM		% do AGV total		
		AGV total	Acetato	Propionato	Butirato	A/P
Feno						
C	7-6,6	68,9 ^a	93,4 ^c	3,6 ^c	3 ^b	25,8 ^b
L	7-6,6	47,7 ^b	86,6 ^b	11,5 ^b	1,9 ^c	7,5 ^d
C	6,18-6	47 ^b	94,9 ^a	2,6 ^c	2,5 ^b	37 ^a
L	6,09-6,04	31,2 ^c	92,9 ^a	5,8 ^c	1,3 ^c	16 ^c
Feno e cevada						
C	7-6,6	74,4 ^a	84,3 ^b	11,3 ^b	4,4 ^a	7,5 ^d
L	7-6,6	61,5 ^b	81,8 ^c	14,8 ^a	3,4 ^b	5,5 ^d
C	6,41-5,73	32,1 ^c	92,5 ^a	6,2 ^c	1,3 ^c	15 ^c
L	6,24-5,81	26,3 ^c	82,5 ^a	16,3 ^a	1,2 ^c	5 ^d

^{a-d} médias na coluna com letras diferentes tem diferença significativa ($P < 0,01$).

C = Conteúdo ruminal completo.

L = Líquido filtrado do conteúdo ruminal.

2.1.7 Consumo de MS

Dentre onze experimentos oriundos de oito trabalhos publicados (Broderick et al., 2002; Fegeros et al., 1995; Leiva et al., 2000; Martinez, 2004; Scoton, 2003; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005; Van Horn et al., 1975) a substituição total ou parcial de milho por polpa cítrica no concentrado resultou

em redução significativa do CMS em três trabalhos com vacas de leite (Broderick et al., 2002; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005). Porém, em um deles a redução de consumo foi constatada somente quanto ao concentrado, fornecido durante a ordenha (Tavares et al., 2005). Nos outros experimentos o CMS não foi afetado significativamente pela substituição.

Dentre os três experimentos realizados com vacas de alta produção leiteira (Broderick et al., 2002; Leiva et al., 2000; Solomon et al., 2000), em dois (Broderick et al., 2002; Solomon et al., 2000) se observou efeito negativo da substituição de milho por polpa no CMS, provavelmente refletindo a maior sensibilidade destes animais a variação no perfil de carboidratos do concentrado. Estes resultados sugerem que é esperada queda no CMS quando polpa substitui milho em dietas para vacas de alta produção.

No único trabalho com vacas de alta produção que não detectou diferença no CMS, deve-se considerar que foram realizados dois experimentos (Leiva et al., 2000). Um com 11 vacas, sendo três fistuladas no rúmen, distribuídas em 3 quadrados latinos, e outro experimento com 184 vacas. No primeiro experimento foi medido consumo e não foi detectada diferença significativa. Porém este foi o experimento que contou com o menor número de vacas, dentre os trabalhos com maior média de produção. No segundo experimento, com maior poder estatístico, o CMS não foi medido. Portanto, neste trabalho, a diferença de CMS pode não ter sido detectada no experimento com menor número de vacas e não foi medido no segundo. Pode-se concluir que nos experimentos com vacas de maior produção leiteira e com maior poder estatístico, onde foi medido o consumo diário, o CMS foi inferior nas dietas com maior porcentagem de polpa cítrica.

2.1.7.1 Redução de CMS em dietas com polpa de beterraba substituindo milho

A substituição de milho grão úmido por polpa de beterraba peletizada também reduziu o consumo em vacas de leite (Voelker & Allen, 2003). Neste experimento a inclusão de 24% de polpa de beterraba reduziu o CMS em 2 kg por dia ($P=0,11$). As oito vacas do experimento eram fistuladas e foi realizada evacuação total do conteúdo ruminal. Embora o peso úmido total do conteúdo ruminal tenha sido igual entre os tratamentos, ocorreu redução significativa da MS do conteúdo ruminal com a inclusão de polpa de beterraba. Na verdade, o peso úmido do conteúdo ruminal apresentou aumento linear com o aumento da inclusão de polpa de beterraba. Estas observações sugerem que a retenção de água no rúmen aumentou com aumento do nível de polpa de beterraba. Neste experimento a retenção de água foi superior nas dietas com polpa de beterraba (Voelker & Allen, 2003).

Voelker & Allen (2003) também verificaram correlação negativa entre o CMS e o desvio padrão do pH ruminal. Ou seja, quanto maior foi a amplitude de variação do pH ao longo de 24 horas, menor foi o consumo de MS. A correlação foi de $-0,41$ ($P=0,03$). A correlação entre o CMS e a variação de pH foi de $-0,42$ ($P=0,03$). Estas correlações sugerem que a variação do pH ao longo do dia inibiu o consumo. Uma explicação razoável para esta correlação seria a seleção de peletes da polpa de beterraba durante a alimentação. Caso a seleção dos peletes ocorresse, a ingestão de grandes quantidades de polpa em pouco tempo poderia abaixar o pH ruminal e reduzir o consumo por estímulos químicos (Allen, 2000). A variação de pH ao longo do dia pode ter refletido esta seleção, que reduzia o pH após a alimentação seletiva dos peletes. A maior velocidade de fermentação inicial da polpa cítrica em comparação ao milho, e a fermentação constante do milho ao longo do tempo, também poderiam explicar a maior variação do pH ruminal ao longo do dia, neste caso em dietas com polpa cítrica. A redução de pH

nas primeiras 3 horas após o pulso intraruminal de polpa cítrica foi maior que a redução do pH no pulso ruminal de milho (Costa, 2002).

Portanto, a redução de consumo com a substituição de milho grão úmido por polpa de beterraba peletizada foi associada a maior retenção de água no rúmen e a maior variação de pH ao longo do dia. Existem semelhanças físicas e químicas entre a polpa de beterraba e polpa cítrica. A substituição de milho por polpa de beterraba também reduziu o CMS assim como a polpa cítrica. Portanto, seria razoável considerar que os fenômenos descritos nos experimentos com polpa de beterraba, relacionados a redução de consumo, também pudessem ocorrer com a polpa cítrica.

2.1.7.2 Capacidade de retenção de água e CMS

A capacidade de retenção de água de fato é superior em subprodutos fibrosos quando comparados a cereais. Enquanto a capacidade de retenção de água do milho foi de 1,25 ml/g de MS insolúvel, a capacidade de retenção de água da polpa de beterraba foi de 6,44 ml/g de MS insolúvel (Ramanzin et al. 1994). Esta maior capacidade de retenção de água poderia aumentar o peso da digesta e estimular os receptores físicos do rúmen, inibindo o CMS (Allen, 1996; Voelker & Allen, 2003).

2.2 Minerais no rúmen

2.2.1 Introdução

Os microorganismos ruminais, assim como o ruminante, têm exigências específicas de macro e microminerais (Ammerman & Henry, 1985; Komisarczuk-Bone & Durand, 1991). Variação na suplementação de alguns

minerais pode afetar o perfil de fermentação ruminal por ação sobre o metabolismo microbiano. A suplementação com teores crescentes de cromo aumentaram a proporção de propionato dentre o total de ácidos graxos voláteis e reduziram a proporção de butirato e isobutirato *in vitro* (Bensong et al., 2001). A relação entre acetato e propionato decresceu significativamente em culturas com deficiência de cobalto (McDonald & Suttle, 1986) e a síntese de proteína microbiana é sabidamente dependente da presença de enxofre (Komisarczuk-Bone & Durand, 1991). A função ruminal é determinada pelo suprimento de macro e microminerais em teores dietéticos capazes de suprir a demanda nutricional sem apresentar toxidez por suplementação excessiva.

Martinez & Church (1970) estudaram o efeito de 10 concentrações diferentes de 18 microelementos em meios de cultura, sobre a digestão da celulose purificada. A suspensão de bactérias usada nos meios de cultura foi oriunda do fluido ruminal de novilhas Hereford alimentadas com feno de gramínea. Foram testados teores no fluido de inoculação *in vitro* de minerais citados na literatura ou predeterminados em experimentos pilotos realizados pelos próprios autores. Em todos os casos foram realizadas culturas controle com zero do elemento testado e teor muito acima da exigência nutricional, a fim de se determinar o teor tóxico. Os teores dos minerais que promoveram aumento significativo na digestão da celulose em comparação ao controle foram em ppm do fluido ruminal *in vitro*: ($P < 0,05$) Co, 3; I, 20; Fe, 3-5; Mn, 5-30; Mo, 10-100; Rb, 20; Zn, 5-7; ($P < 0,10$) Cd, 5; ($P < 0,20$); Cr, 2 e Sr, 10-15. A depressão significativa da digestão da celulose ocorreu nos seguintes teores (ppm): Ba, 30; B, 300; Cd, 10; Cr, 7; Co, 7; Cu, 1; F, 0,5; Fe, 100; Mn, 100; Ni, 0,5; Se, 7; Sr, 200; V, 5; e Zn, 20. No caso do Br, Mo e Rb não foi detectado nível tóxico que inibisse a digestão da celulose significativamente. Estes resultados sugerem que a suplementação com microminerais pode ser utilizada para modular a função ruminal, seja por estímulo ou por inibição da capacidade fermentativa.

Os microelementos são tradicionalmente suplementados na forma de sais inorgânicos. Não obstante, tem crescido o interesse em fontes orgânicas destes elementos na dieta de ruminantes. Os microminerais orgânicos comercialmente disponíveis variam quanto ao tipo de ligante utilizado. Os minerais orgânicos são classificados como complexos, quelatos ou proteínatos (AAFCO, 1999). Os complexos são produtos formados pela complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido ou por um sal solúvel e uma solução de polissacarídeos. Os quelatos podem ser considerados um tipo especial de complexos formado por íons metálicos oriundos de sais solúveis e aminoácidos. Em um quelato a relação molar entre o metal e o aminoácido deve ser 1:1 a 1:3 (preferencialmente 1:2). Isto é exigido para que se formem ligações covalentes entre a molécula orgânica e o íon. Em quelatos o peso molecular médio dos aminoácidos hidrolisados deve ser em torno de 150 daltons e o peso do quelato não pode exceder 800. Os proteínatos seriam quelatos de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteína parcialmente hidrolisada. Minerais orgânicos de Zn, Mn, Cu, Fe, Co, Se e Cr são disponíveis comercialmente (Spears, 1996).

O efeito sobre a função ruminal da substituição de fontes orgânicas por inorgânicas de microminerais tem sido avaliado. Langwinski et al. (2001) relataram maior consumo de MS por bezerros alimentados com feno de baixa qualidade (não específica) e Langwinski & Ospina (2001) sugeriram maior atividade celulolítica (volume de gás produzido pela fermentação da fração de degradação lenta) no rúmen quando minerais orgânicos substituíram fontes inorgânicas em dieta composta por forrageira de baixo valor nutritivo e baixa suplementação concentrada. Nestes trabalhos a suplementação orgânica foi acrescida em 10% (Langwinski et al., 2001) ou 15% (Langwinski & Ospina, 2001) da suplementação inorgânica adotada no tratamento controle, resultando em teores não similares de microminerais nos dois tratamentos (acrescido ao sal mineral inorgânico *ad libitum*, não informam consumo de sal). Nestes trabalhos

foi observada resposta positiva em consumo e digestibilidade à suplementação com minerais orgânicos quando estes suplementaram fontes inorgânicas em dietas com baixo teor basal de minerais. O efeito sobre a função ruminal da substituição total de microminerais em forma inorgânica pelo mesmo mineral em forma orgânica, em concentrações dietéticas isonutricionais e compatíveis com o suprimento da demanda nutricional de bovinos alimentados com dietas formuladas para alto desempenho animal requer avaliação.

2.2.2 Efeito dos minerais sobre o metabolismo ruminal

2.2.2.1 Fósforo

O fósforo é exigido pelos microorganismos ruminais para a digestão da celulose (Burroughs et al., 1951) e para a síntese de proteína microbiana (Breves & Schroder, 1991). A deficiência de fósforo induzida *in vitro* reduziu a concentração de AGV no fluido ruminal, a síntese de ATP, a digestibilidade da xilose, arabinose e glicose e a síntese de proteína microbiana e aumentou a concentração de amônia e o pH do fluido (Komizarczuk et al., 1987). O número de protozoários não foi influenciado pelo nível de fósforo.

Queda na digestibilidade da celulose é o principal efeito da deficiência de P no ambiente ruminal (Durand & Komisarczuk, 1988; Francis et al., 1978; Witt & Owens, 1981). Os outros efeitos observados, como menor produção de AGV e de proteína microbiana, parecem estar vinculados à limitação no crescimento bacteriano, especialmente das bactérias celulolíticas. A redução da população microbiana pode diminuir a captação de amônia, contribuindo para seu aumento no fluido do rúmen. O fluxo ruminal de N bacteriano foi inferior em culturas com deficiência de P (Komisarczuk et al., 1987). Pelo uso de ¹⁵N enriquecido foi demonstrado que a deficiência de P reduziu mais intensamente a

incorporação de N de amônia que a incorporação de N de aminoácidos às bactérias (Komisarczuk et al., 1987), amônia é a principal fonte de N nas bactérias celulolíticas.

A degradação ruminal da celulose envolve um complexo enzimático atuando sinergicamente (Van Soest, 1994). Um possível mecanismo para a queda na atividade celulolítica em deficiência de P seria por alteração da permeabilidade da parede celular e sua relação com a atividade da endoglucanase (Komisarczuk et al., 1987). A atividade de celulases isoladas da digesta ruminal de carneiros foi sensível à variação na concentração de P no meio de cultura (Francis et al., 1978). A síntese de endoglucanase foi reduzida em 90% e a atividade da celobiose não foi detectada em culturas com deficiência de P (Lee et al., 1985). Estes fatos sugerem que a concentração ruminal de fósforo pode atuar não somente sobre a taxa de crescimento das bactérias celulolíticas, mas também exerce efeito significativo sobre a síntese e atividade enzimática destas bactérias.

Durand & Komisarczuk (1988) recomendam que a concentração de P disponível no rúmen, oriundo da dieta e da saliva, para otimizar a digestão da celulose seja ao redor 5 g/kg de matéria orgânica digestível. Níveis de 0,12% de P na MS dietética foram capazes de estabelecer uma concentração ruminal de 200 mg/L, considerada superior ao mínimo exigido de 80 mg/L (Hall et al., 1961).

2.2.2.2 Enxofre

O enxofre é necessário para síntese de metionina, cistina, cisteína e taurina, apesar dos últimos poderem ser sintetizados a partir da metionina. Os aminoácidos dependentes de S são essenciais na síntese da proteína microbiana e podem limitar o crescimento dos microorganismos ruminais. O S também está

envolvido na síntese das vitaminas tiamina e biotina e coenzimas (Durand & Komisarczuk, 1988).

A suplementação com S parece atuar diretamente sobre a síntese de proteína microbiana e a capacidade fermentativa do rúmen. Kumar & Bhatia (1985) observaram queda na digestibilidade ruminal da celulose e da proteína bruta quando garrotes mestiços recebendo dietas com 0,084% de S na MS dietética não foram suplementados com sulfato de sódio. Em outro relato, a suplementação com S reduziu a concentração de amônia no rúmen e aumentou o consumo de MS em ovinos (Rees & Minson, 1978). A suplementação com uréia em dietas com forragem de baixa qualidade (mais de 70% de FDN) apresentou resultado superior quando o S também foi adicionado (Guardiola et al., 1983). A adição de S na forma de sulfato de sódio aumentou significativamente a atividade da transaminase no fluido ruminal (Kumar & Bhatia, 1985).

A relação entre nitrogênio não protéico e enxofre (N:S) na dieta pode ser um fator determinante na retenção do N dietético. A relação N:S entre 10:1 e 12:1 parece maximizar a digestão ruminal e a síntese microbiana (Bouchard & Conrad, 1973). Em dietas balanceadas ou formuladas com forragens de boa qualidade a suplementação com S não apresentou efeitos significativos sobre a digestão da celulose ou o fluxo de N bacteriano para o intestino delgado (Durand & Komisarczuk, 1988).

A exigência de S para os microorganismos é 2 g por kg de matéria orgânica fermentável no rúmen. Porém, considerando as interações com outros elementos como o Mo, recomenda-se de 2,5 a 2,8 g de S por kg de matéria orgânica fermentável no rúmen. Exceto quando a forragem fornecida tem altos níveis de nitrato ou Mo, a exigência é atendida com o S oriundo dos ingredientes dietéticos (Durand & Komisarczuk, 1988). O teor de 0,20% de S na MS da dieta foi considerado suficiente para promover a máxima retenção do elemento

através da síntese de metionina e cisteína em vacas de leite com produção diária de leite entre 30 e 37 kg (Bouchard & Conrad, 1973).

Tendo como parâmetro a digestão ruminal de celulose, a maior disponibilidade ruminal de S foi da metionina, seguida pelas fontes inorgânicas sulfito e sulfato e pela cisteína, considerara de menor biodisponibilidade (Trenkle et al., 1958). Já na digestão do amido, as fontes com maior resposta foram as inorgânicas sulfito e sulfato, seguidas da cisteína, que foi inferior as inorgânicas mas superior a metionina (Kennedy et al, 1971). O S elementar foi considerado de baixíssima disponibilidade e impróprio para a suplementação animal (Slyter et al., 1988).

2.2.2.3 Magnésio

O Mg é essencial a todos o microorganismos. Constitui cofator imprescindível para enzimas bacterianas como fosfohidrolases e fosfotransferases, além de reações envolvendo a fosforilação de ATP e síntese de tiamina (vitamina B1) (Durand & Komisarczuk, 1988). A celulase do *Ruminococcus flavefaciens* foi ativada com aumento da concentração de Mg (Pettipher & Latham, 1979). A deficiência de Mg reduziu a digestão da celulose e a adesão das bactérias às partículas de celulose *in vitro* (Roger et al., 1990).

A concentração de Mg influenciou a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen de ovinos alimentados com dietas purificadas. Na ausência de Mg, a produção de acetato, propionato e butirato decresceu significativamente (Ammerman et al., 1971). Neste experimento a ausência de Mg deprimiu o consumo de MS, provavelmente devido à menor digestibilidade da MS, principalmente da celulose. A concentração de Mg na suspensão foi determinante da digestibilidade *in vitro* da celulose. Foram testados o efeito de 5, 20, 80 e 320 mg de Mg/L de fluido ruminal. Na concentração de 80 mg/L a

digestibilidade da celulose saltou de 39 para 48% ($P<0,05$). No experimento com carneiros esta concentração no fluido ruminal foi obtida com a suplementação diária com 2 g de Mg oriundo de sulfato de magnésio (Wilson, 1980).

A atividade celulolítica em *Ruminococcus flavefaciens* foi dependente da concentração de Mg no meio de cultura. A eliminação do Mg do meio por centrifugação reduziu em 30% a adesão dos microorganismos às partículas de celulose (Roger et al., 1990). Este efeito foi potencializado quando o cálcio também foi removido do meio de cultura. A interação entre o glicocálix e esses cátions divalentes parece ser necessária para permitir a adesão, através de uma ponte de carga positiva, eliminando a repulsão entre a superfície de membrana da bactéria e a partícula de celulose, ambos com carga elétrica negativa. Entre os vários fatores de adesão estudados neste experimento, como o potencial redox, a temperatura e o pH, a interação entre os cátions divalentes e a membrana celular (glicocálix) foi a variável que mais influenciou a adesão microbiana.

Wilson (1980) comparou o efeito da suplementação com Mg na digestibilidade de forragem de boa qualidade e de qualidade inferior. Para comparação usou feno de azevém e trevo imaturo, com 28% de FDA, e feno de azevém e trevo maduro, com 44% de FDA. Dezesesseis carneiros foram divididos em quatro grupos. Os tratamentos foram feno bom sem suplementação com Mg, feno bom com 2 g de Mg, feno ruim sem Mg e feno ruim com 2 g de Mg. A suplementação com Mg foi realizada com a administração oral diária de 20 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. A digestibilidade da MS e do FDA do feno bom não foram afetadas pela suplementação com Mg. Por outro lado, a digestibilidade da MS e do FDA do feno ruim aumentaram de 62 para 65% e de 56 para 61%, respectivamente ($P<0,05$). Portanto a suplementação diária com 20 g de sulfato de Mg hidratado, que forneceu 2 g de Mg por dia, aumentou significativamente a digestão ruminal da fibra e da MS de forragem de qualidade inferior, porém

não influenciou estas variáveis na dieta com feno de melhor qualidade. Os teores de Mg do feno bons e do feno ruins foram 1,9% e 1,7% da MS, respectivamente. Esta diferença de resposta pode ser devido a maior disponibilidade do Mg da forragem de melhor qualidade para as bactérias ruminais.

2.2.2.4 Cobalto

Ruminantes são muito sensíveis à deficiência de vitamina B₁₂ porque são dependentes da gliconeogênese e esta vitamina é essencial no metabolismo do propionato (Durand & Komisarczuk, 1988). A exigência nutricional de Co, ao redor de 0,11 mg por kg de MS da dieta, é ditada pela necessidade deste mineral para a síntese ruminal de vitamina B₁₂ (Marston, 1970). Entretanto, teores dietéticos de 0,25 a 0,35 ppm de Co, acima da exigência nutricional, parecem aumentar a digestão ruminal de alguns alimentos, especialmente forragens de baixa qualidade (Lopez-Guisa & Satter, 1992). Os microorganismos ruminais podem requerer mais Co que o definido pela necessidade de síntese de vitamina B₁₂.

A necessidade de formulação de dietas com teor de Co maior que o ditado pela exigência dos microorganismos ruminais para síntese de B₁₂ pode ser devido à seleção de bactérias específicas, com maior exigência deste mineral. Outra explicação seria pela possibilidade de indução de uma adesão mais eficiente entre as bactérias e as partículas de fibra. Um possível mecanismo seria a formação de pontes divalentes de Co entre a membrana da bactéria e a superfície da fibra, ambas com carga negativa, similarmente ao que acontece com o Mg e o Ca (Somers, 1973). A suplementação com teores mais elevados de Co que o recomendado para a produção de vitamina B₁₂ aumentou a população de bactérias ruminais anaeróbicas em 50% (Young, 1979).

As bactérias metanogênicas também necessitam de cobalto. A metil cobalamina é um doador importante de metil em bactérias metanogênicas (Komicazurk-Bone & Duran, 1991). Num experimento *in vitro*, a depleção de cobalto alterou drasticamente a produção de acetato e propionato (McDonald & Suttle, 1986). A relação caiu de 3,6 para 1 quando o Co não foi adicionado à cultura. A maior necessidade de Co das bactérias produtoras de acetato em relação às produtoras de propionato pode explicar os resultados. Não obstante, ficou evidente que existem diferenças quanto à exigência de cobalamina entre as bactérias ruminais. Ou seja, a depleção dos níveis de Co não afetou linearmente todas as espécies de bactérias, sendo o desequilíbrio resultante suficiente para alterar o padrão de fermentação ruminal.

2.2.2.5 Cromo

Não existe exigência definida de Cr para ruminantes. Besong et al. (2001) procuraram testar possíveis efeitos da suplementação com Cr sobre a fermentação ruminal. Dois experimentos foram realizados *in vitro* com Cr picolinato. No 1º experimento os autores testaram concentrações de 0; 2; 0,4; 0,8 ou 1,6 mg de Cr por kg de MS do concentrado usado como meio de cultura. O inóculo ruminal foi retirado de novilhas alimentadas com feno e 1 kg do mesmo concentrado utilizado na cultura. No segundo experimento usaram teores ainda maiores de Cr na MS do concentrado, a saber, 0; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 ou 25,6 mg por kg de MS. A proporção molar de propionato foi menor ($P < 0,05$) com 1,6 mg/kg do que com 0,2 mg/kg com 12 horas de incubação, mas não houve diferença com 24 horas de incubação. A proporção molar de butirato foi maior ($P < 0,05$) com 12 e 24 horas de incubação e a de isobutirato foi maior ($P < 0,05$) com 12 horas de incubação com 1,6 mg de Cr por kg. Estes resultados sugerem que doses farmacológicas de Cr podem influenciar a produção de propionato,

butirato e isobutirato no fluido ruminal. Entretanto estes resultados não foram verificados com as mesmas concentrações de Cr na MS da dieta de novilhas fistuladas.

No segundo experimento foi detectado efeito quadrático do incremento dos níveis de Cr sobre a proporção molar de acetato, propionato e isovalerato. A concentração total de AGV refletiu esse efeito quadrático em função do aumento da concentração de Cr. O AGV total foi 208, 214, 194, 193, 183, 163 e 216 mM nas concentrações de 0; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8 ou 25,6 mg de por kg de MS (Besong et al., 2001). Os níveis de Cr testados *in vitro*, embora capazes de alterar a proporção molar individual de AGV, não foram suficientes para induzir alterações *in vivo* na fermentação ruminal das novilhas fistuladas. Outra constatação foi que mesmo nos níveis mais altos de inclusão de Cr, não foram verificados efeitos negativos sobre a fermentação ruminal. Ou seja, até 25 mg de Cr por kg de MS dietética não foi detectado efeito tóxico do Cr na fermentação ruminal. A falta de alterações importantes e consistentes na fermentação ruminal evidencia que os efeitos da suplementação com Cr na dieta de vacas de leite devem ocorrer em nível sistêmico e não ruminal.

2.2.2.6 Zinco

A redução da degradação ruminal da proteína dietética ocorre com adição de altos teores de Zn na dieta, podendo ser uma estratégia para aumentar a proporção da proteína bruta dietética em forma não degradável no rúmen. O Zn inibe a atividade da urease *in vitro* (Spears & Hatfield, 1978). O Zn pode atuar de maneira semelhante inibindo as enzimas das bactérias proteolíticas. Além disso, o Zn pode precipitar proteínas através de ligação covalente com grupo sulfidril (Bateman et al., 2004).

Entretanto, a adição de 1142 ppm de Zn reduziu tanto a degradação dos aminoácidos da dieta quanto a síntese bacteriana no rúmen (Froetschel et al., 1990). O resultado foi a redução significativa do fluxo de aminoácidos para o abomaso, em comparação a dieta controle com 80 ppm de Zn. A maior suplementação com Zn reduziu a contagem de protozoários, reduziu a degradação ruminal de aminoácidos dietéticos em 36% ($P<0,05$) e aumentou o fluxo intestinal de aminoácidos dietéticos como porcentagem do ingerido em 15% ($P<0,05$). Por outro lado, reduziu fluxo ruminal de MO bacteriana e a passagem de aminoácidos bacterianos para o abomaso em 21% ($P<0,05$). Mesmo com o aumento do escape dos aminoácidos dietéticos da fermentação ruminal, o maior fornecimento de Zn teve efeito negativo no fluxo líquido de aminoácidos para o abomaso, devido a redução do fluxo microbiano.

Bateman et al. (2004) compararam dietas formuladas com zero e 500 mg/kg da MS de Zn oriundo de sulfato de zinco. Em quatro vacas fistuladas, compararam a degradação *in situ* do farelo de soja e do farelo de soja extrusado. Ao contrário do esperado, verificaram maior degradação da MS do farelo de soja ($P=0,02$) e da MS do farelo de soja extrusado ($P=0,08$) no tratamento com Zn. A taxa de degradação da PB do farelo de soja foi superior com Zn na dieta ($P=0,07$). O teor de Zn foi 10 vezes superior à recomendação do NRC (2001), mas foi metade da concentração usada por Froetschel et al. (1990). Os resultados sugerem que 500 ppm de Zn na dieta não foi suficiente para reduzir a degradação ruminal da proteína da dieta. O nível ótimo de inclusão de Zn capaz de reduzir a degradabilidade ruminal da proteína dietética sem afetar negativamente a síntese de proteína microbiana no rúmen não foi definido.

Cecava et al. (1993) testaram o efeito do farelo de soja tratado com Zn na degradação ruminal de proteína dietética. Foram formuladas dietas com farelo de soja normal, farelo de soja tratado com Zn, e uma mistura de farelo de soja tratado com Zn e farelo de soja normal na proporção 50:50. O fluxo de

aminoácidos para o intestino apresentou tendência ($P=0,12$) de aumento com a dieta 50:50. Os tratamentos com Zn não afetaram a síntese de proteína microbiana em comparação ao tratamento com farelo de soja normal. Estes resultados sugerem que o tratamento prévio da fonte de proteína da dieta com Zn pode ser mais eficiente do que a adição de altos teores de Zn na dieta, com a finalidade de redução da digestibilidade ruminal da proteína dietética, sem comprometer a síntese microbiana.

2.2.3 Metabolismo dos minerais orgânicos no rúmen

A proposta de fornecer minerais ligados a moléculas orgânicas tem a premissa de reduzir a interação com outros minerais no rúmen, formando complexos insolúveis e reduzindo a absorção ruminal, sem reduzir a absorção intestinal (Spears, 1996). A meta é obter uma fonte mineral de baixa capacidade de interação no rúmen, porém com alta taxa de absorção. Esta característica foi definida como “solubilidade estável” (Ward & Spears, 1993). Estas interações podem ocorrer entre o cobre e o molibdênio e/ou enxofre, ou entre o selênio e o enxofre. Em dietas ricas em molibdênio e enxofre a taxa de incorporação do cobre nas partículas sólidas aumenta, provavelmente em função da formação de tetratiomolibnatos que complexam o cobre, tornando-o indisponível (Allen & Gawthorne, 1987). A absorção do selênio está em torno de 30% em ruminantes e em 90% em não ruminantes. A metabolização ruminal deste elemento reduz drasticamente a absorção, com sua incorporação à proteína bacteriana. Estes são exemplos de minerais cuja metabolização ruminal influi na taxa de absorção. O uso de minerais orgânicos nestes casos tem o objetivo de reduzir esta metabolização ou interação no rúmen e, conseqüentemente, aumentar a absorção no intestino.

A absorção de selênio em ruminantes é significativamente inferior do que em suínos, por exemplo, em função da metabolização ruminal. A incorporação do selênio na proteína bacteriana é um processo que reduz a disponibilidade do elemento para absorção intestinal (Whanger et al., 1978). Quando se aumentou o fornecimento de selênio a porcentagem de incorporação também aumentou. Assim, o aumento dos níveis de selênio na dieta não parece ser uma alternativa para aumentar a absorção em ruminantes. Mas uma fonte que reduzisse esta captação no rúmen provavelmente repercutiria em maior absorção. Paulson et al. (1968) verificaram, *in vitro*, que a incorporação de selênio marcado (isótopo) do selenito na proteína bacteriana foi superior à incorporação do selênio marcado de Se-metionina. Logicamente, a disponibilidade no efluente do meio de cultura de Se foi superior com Se-metionina, que foi menos incorporado. Considerando-se que a incorporação de selênio diminui a absorção, o Se-metionina apresentaria maior potencial de absorção.

De fato a incorporação do selênio na proteína bacteriana difere entre as fontes. O selenito e trigo enriquecido com selênio foram utilizados como fonte de selênio para ovinos. O trigo enriquecido tem como principal forma química de selênio o Se-metionina. O fluído ruminal foi obtido após abate dos animais para incubação *in vitro* com [⁷⁵Se]selenito nos animais consumindo selenito e com ⁷⁵SeMet nos animais suplementados com trigo enriquecido. Os aminoácidos microbianos contendo selênio marcado foram identificados por cromatografia. Seleniocisteína foi o aminoácido predominante nos peletes de microorganismos na cultura com selenito e Seleniometionina foi o predominante nos peletes das culturas incubadas com o conteúdo ruminal dos animais suplementados com trigo enriquecido (Van Ryssen et al., 1989). Mas, ao contrário de Paulson et al. (1968), a incorporação foi maior na fonte orgânica. Como a incorporação de selênio na proteína bacteriana reduz a biodisponibilidade, seria de se esperar

menor absorção do selênio da metionina. Mas a deposição de selênio nos tecidos analisados foi superior nos ovinos alimentados com a fonte orgânica. Os autores atribuíram a maior retenção de selênio nas ovelhas alimentadas com seleniometionina a diferenças de absorção entre Se-metionina e Se-cisteína. Aparentemente o selênio oriundo da metionina apresentou maior biodisponibilidade que o selênio oriundo da cisteína, mesmo com maior porcentagem de incorporação a proteína bacteriana do selênio metionina.

Outros fatores podem afetar a absorção ou retenção de selênio no organismo. Dietas baseadas em feno de alfafa ou cevada influenciaram a retenção de selênio em ovinos independente da forma de mineralização (selenito ou Se-levedura). A retenção e absorção de selênio foram superiores na dieta com cevada ($P < 0,05$) (Koenig et al., 1997). O selênio do selenito foi mais disponível a absorção intestinal que o selênio levedura, independente da dieta. Mas a forma de fornecimento do selênio não alterou a retenção do elemento no organismo. Ou seja, neste experimento a formulação da dieta foi mais importante na retenção do selênio do que a fonte de selênio. Como em outros experimentos, a maioria do selênio das duas fontes estava associado a fase sólida da digesta ruminal, principalmente as bactérias, incorporado entre 51 e 61%. Outros fatores, como o potencial redox do rúmen, o fornecimento de cálcio e porcentagem de selênio na forragem também são fatores que alteram a absorção intestinal de selênio em ruminantes (Gerloff, 1992).

Portanto, a incorporação de selênio na proteína bacteriana apresentou diferenças entre fontes orgânicas e inorgânicas. Enquanto a incorporação foi superior na fonte orgânica em alguns casos (Van Ryssen et al., 1989), em outros a absorção foi superior na fonte inorgânica (Koenig et al., 1997). Além disso, a incorporação do selênio à proteína microbiana não esteve necessariamente associada à menor absorção ou retenção do elemento no organismo. Estes fatos sugerem: 1) a metabolização ruminal de fontes orgânica e inorgânica é diferente,

com formação de selênio cisteína na fonte inorgânica e selênio metionina na fonte orgânica; 2) a maioria do selênio fornecido é incorporada à proteína microbiana independente da fonte; 3) outros fatores parecem influenciar a absorção de selênio, além da fonte ou forma disponível deste elemento no intestino. A última conclusão explicaria a variação de resultados observados na literatura no tocante a absorção de fontes orgânica ou inorgânica.

Com relação ao cobre, vários experimentos buscaram verificar a capacidade de fontes orgânicas deste elemento em evitar a formação de complexos insolúveis. Todos falharam em comprovar a menor interação com molibdênio ou enxofre. Witemberg et al. (1990) trataram novilhas com molibdênio a fim de provocar deficiência de cobre. Após este período pré-experimental, suplementaram os animais com sulfato de cobre ou cobre proteinato. As concentrações de cobre foram monitoradas no plasma. Os tratamentos aumentaram a concentração de cobre e reduziram a concentração de molibdênio, porém não foram constatadas diferenças significativas quanto à fonte de cobre utilizada. A suplementação com cobre foi eficiente em reduzir a absorção de molibdênio, provavelmente formando complexos insolúveis. A suplementação com cobre, mesmo com a continuidade do fornecimento de molibdênio, foi suficiente para restaurar os níveis adequados de cobre no plasma. Dentro deste raciocínio, o cobre do proteinato reagiu tanto quanto o cobre do sulfato, uma vez que ambos reduziram significativamente a concentração sérica de molibdênio, mas não houve diferença da concentração de molibdênio entre os tratamentos. Se o cobre proteinato apresentasse menor interação com molibdênio no rúmen, seria de se esperar o aumento das concentrações de cobre, mas não a redução dos níveis de molibdênio no plasma. Ou pelo menos uma redução mais discreta do que a observada com sulfato de cobre. Pode-se concluir que o nível de interação com o molibdênio não foi afetado pela ligação do cobre com o proteinato.

Ward & Spears (1993) compararam *in vitro* a capacidade de interação do cobre oriundo de cobre lisina ou sulfato de cobre com seus antagonistas. No primeiro experimento adicionaram como tamponante uréia (controle, sem enxofre) ou sulfato de sódio (tratamento com enxofre). No segundo experimento os tratamentos foram: tubos sem cobre, tubos com 20 ppm de cobre de sulfato de cobre; tubos com 20 ppm de cobre de cobre lisina; a repetição de todos estes com 10 ppm de molibdênio e 0,75% de enxofre. Nos tubos (culturas) com uréia como tamponante a concentração de cobre foi superior com cobre lisina (2,62 vs 0,92 ppm, $P < 0,01$). Nos tubos com sulfato de sódio a concentração de cobre foi inferior aos tubos sem sulfato. Não obstante, a concentração de cobre nos tubos com sulfato (enxofre) não apresentou diferença entre as fontes. A concentração de cobre, que fora mais alta com lisina, igualou-se à concentração do cobre do sulfato quando o enxofre foi adicionado. Ora, se a concentração foi superior na primeira cultura e iguais na segunda, o excesso (nível mais alto) de cobre da lisina reagiu com o molibdênio tanto quanto o cobre do sulfato. Ou até mais, pois se igualou ao nível mais baixo.

No segundo experimento a concentração de cobre no sobrenadante caiu de 13 ppm para 10 ppm com a adição do molibdênio e do enxofre ($P < 0,05$) (Ward & Spears, 1993). Mas a concentração de cobre não variou entre fontes. A concentração do cobre das duas fontes foi superior sem Mo e S, inferior com Mo e S, mas foram semelhantes nos dois tratamentos (com ou sem Mo e S). Ou seja, o cobre do cobre-lisina reagiu tanto quanto o cobre do sulfato com o molibdênio e o enxofre. O molibdênio e enxofre formam complexos (MoS_4^{-2}) que reagem com o cobre, tornando-o indisponível para absorção intestinal. Com base nas concentrações de cobre diante do acréscimo de Mo e S nas culturas, parece evidente que o cobre estava na forma ionizada, pois apresentou capacidade de interação com o tetratiomolibdato, tanto nas culturas com lisina quanto nas

culturas com sulfato de cobre. Se não estivesse na forma ionizada não poderia ligar-se ao MoS_4^{-2} .

No primeiro experimento a digestibilidade da celulose foi avaliada. Foram usados teores crescentes de cobre (4, 12 e 96 ppm) oriundos de sulfato de cobre ou cobre lisina (Ward & Spears, 1993). Não houve diferença estatística entre as fontes de cobre ou níveis de cobre na digestibilidade da celulose. Nos controles, sem adição de cobre, a digestibilidade média da celulose foi de 39%, enquanto foi de 33,5% nas dietas suplementadas. Embora não tenha ocorrido diferença estatística entre estas médias, a redução numérica da digestibilidade da celulose pode estar relacionada aos níveis altos do elemento nas culturas. Níveis acima de 1 ppm de inclusão de cobre em meios de cultura inibiram a digestão de celulose (Martinez & Church, 1970). Portanto as informações referentes a digestão da celulose neste experimento podem não refletir diferenças entre as fontes por estarem todas acima do recomendado para maximização da digestão de celulose, estabelecido em 0,5 ppm (Martinez & Church, 1970).

Ospina et al. (2000) forneceu fontes orgânicas de cobre, zinco, manganês e cromo em porcentagens crescentes para bezerros alimentados com feno de coast-cross de baixa qualidade. A formulação mineral com os minerais orgânicos foi fornecida adicionalmente ao mineral comum consumido pelos animais. Embora não tenha sido constatada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, os autores observaram uma tendência numérica do aumento de consumo e digestibilidade da matéria orgânica e da FDN com a adição de 10 ou 15% de mistura orgânica à mistura de minerais inorgânicos. Os autores não citam as fontes dos minerais inorgânicos utilizados. Os teores totais de macro e microelementos também não foram relatados. Não obstante, a comparação ocorreu entre níveis de inclusão diferentes, uma vez que a mistura com minerais orgânicos não substituiu, mas foi adicionado à dieta basal. Não houve, portanto, a substituição de elementos de fontes orgânicas por elementos

de fontes inorgânicas, mas o aumento dos teores de minerais inorgânicos com adição de fontes orgânicas. Como os teores dos minerais nos tratamentos não foram idênticos, não é possível separar o que foi efeito da formulação do que foi efeito do maior teor de suplementação e, conseqüente, da maior disponibilidade dos elementos em questão.

Langwinski et al. (2001) também alimentaram bezerros com feno de coast-cross de baixa qualidade, mas adicionaram suplemento protéico com 21% de proteína bruta. Os bezerros foram tratados com 0, 10, 15 e 20% de mistura de minerais orgânicos adicionados a mistura mineral inorgânica. Observaram aumento significativo do consumo de MS do feno ($P<0,05$) e no consumo de MO digestível ($P<0,10$). Os autores ainda observaram tendência ($P=0,14$) de aumento no consumo de FDN, FDA e hemicelulose digestível com a maior suplementação mineral. Como no experimento de Ospina et al. (2000), é impossível separar o efeito da biodisponibilidade dos elementos orgânicos do efeito do aumento da suplementação mineral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Dezesseis vacas Holandesas em lactação (ordem de lactação $2,1 \pm 0,9$ partos e 168 ± 108 dias em lactação no início do período experimental) formaram quatro grupos de quatro animais. Um grupo foi formado por primíparas, um outro por múltíparas de maior produção de leite, outro por múltíparas de menor produção de leite e um quarto grupo foi formado por uma vaca primípara e por três vacas múltíparas com cânula ruminal. As cânulas foram cirurgicamente implantadas 30 dias antes do início do período experimental. Dentro de cada grupo, as vacas foram aleatoriamente alocadas a uma seqüência de quatro tratamentos em delineamento do tipo Quadrado Latino 4×4 , conduzidos simultaneamente, com períodos de 21 dias e balanceados para efeito residual.

Os quatro tratamentos foram formados por um arranjo fatorial 2×2 de dois fatores: Fonte de carboidrato do concentrado e tipo da mistura mineral. Duas dietas foram formuladas com 331 g de polpa cítrica peletizada por kg de MS (TABELA 4). O perfil de carboidratos destas dietas foi modificado por inclusão de 101 g de milho em grão maduro, seco e moído fino por kg de MS, em substituição à mesma quantidade de polpa cítrica. O cultivar de milho utilizado foi DKB 333B (Semiduro, Dekalb, Monsanto do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

Duas misturas minerais foram formuladas para conter quantidades similares de micro e macrominerais. A inclusão de ambas as misturas minerais foi de 24 g por kg de MS dietética (TABELA 4). Uma mistura mineral foi formulada apenas com fontes inorgânicas de minerais: Carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, iodeto de cálcio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, fosfato de ferro, sulfato de manganês, cloreto de potássio, selenito de sódio, sulfato de zinco, cloreto de cromo e óxido de magnésio. Em uma segunda

TABELA 4. Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI
Ingredientes				
	% da MS			
Silagem de milho	40,3	40,3	40,4	40,4
Milho maduro moído fino	10,1	10,1		
Polpa cítrica	24,0	24,0	33,1	33,1
Farelo de soja	11,8	11,8	12,7	12,7
Soja grão crua	9,9	9,9	9,9	9,9
Uréia	0,5	0,5	0,5	0,5
Bicarbonato de sódio	1,0	1,0	1,0	1,0
Mineral orgânico ¹	2,4		2,4	
Mineral inorgânico ²		2,4		2,4
Nutrientes				
Proteína bruta	17,5	17,8	17,6	17,5
FDN total ³	28,5	28,0	29,5	30,0
FDN oriundo de silagem de milho	20,6	21,2	21,3	20,9
Cinzas	7,0	6,4	7,0	7,0
Extrato etéreo	5,1	5,2	4,9	4,6
Carboidratos não fibrosos ⁴	41,9	42,6	41,0	40,9
	% da matéria natural			
Matéria seca	44,6	44,6	44,6	44,6

¹ Mineral orgânico: 196 g de Ca, 58 g de P, 22,7 g de Mg, 68 g de Na, 10,7 mg de Co, 742 mg de Cu, 1641 mg de Fe, 40 mg de I, 1870 mg de Mn, 19 mg de Se, 2474 mg de Zn e 9,7 mg de Cr por kg de mistura.

² Mineral inorgânico: 223 g de Ca, 85 g de P, 22,8 g de Mg, 44 g de Na, 85 mg de Co, 740 mg de Cu, 3300 mg de Fe, 80 mg de I, 1390 mg de Mn, 20 mg de Se, 2474 mg de Zn e 10 mg de Cr por kg de mistura.

³ FDN = Fibra em detergente neutro.

⁴ Carboidratos não fibrosos = 100 – (Proteína bruta + FDN + Cinzas + Extrato Etéreo).

mistura mineral as fontes inorgânicas de selênio, zinco, cobre, manganês e cromo foram totalmente substituídas por fontes orgânicas. Na obtenção de cada fonte orgânica, fontes inorgânicas de microminerais foram industrialmente

misturadas a peptídeos purificados de soja e posteriormente fermentados por culturas de leveduras (Tortuga Cia Zootécnica Agrária, São Paulo, Brasil).

As quatro combinações possíveis dos dois fatores foram assim definidas: MO, 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico; MI, 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico; PO, 33% de polpa cítrica e mineral orgânico; e PI, 33% de polpa cítrica e mineral inorgânico. Os ingredientes de cada tratamento foram misturados e oferecidos duas vezes ao dia para compor dietas completas fornecidas *ad libitum* em quantidade suficiente para obter no mínimo 15% do oferecido como sobra diária. O teor de MS das forragens foi monitorado semanalmente por secagem em estufa e, se necessário, a inclusão de matéria natural de cada ingrediente foi ajustada para manter constância na proporção dos mesmos na MS dietética. As vacas foram alimentadas individualmente em confinamento total do tipo *tie-stall* com camas de areia.

As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia e a produção de leite foi monitorada por seis ordenhas consecutivas entre os dias 16 e 18 de cada período experimental. As amostras de leite foram coletadas em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e foram mantidas sob refrigeração por no máximo quatro dias. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite Prof. José de Alencar (LQL), localizado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, para análise de gordura, proteína, lactose e contagem de células somáticas (CCS) por infravermelho. A produção diária de leite corrigido para 3,5% de gordura foi calculada pela fórmula (Gravert, 1987): Leite 3,5% (kg) = (0,432 x produção diária de leite em kg) + (16,23 x produção diária de gordura em kg). A excreção diária de energia líquida no leite (ELI leite) foi calculada pela seguinte equação (NRC, 2001): [(0,0929 x % gordura) + (0,0547 x % de proteína) + (0,0395 x % de lactose)] x kg de leite. A CCS foi transformada em uma escala linear de 0 a 9 (CCS linear), sendo o ponto médio de cada score linear representado pelos seguintes valores de CCS (x 1.000 ml¹):

12,5 para CCS linear 0; 25 para CCS linear 1; 50 para CCS linear 2; 100 para CCS linear 3; 200 para CCS linear 4; 400 para CCS linear 5; 800 para CCS linear 6; 1.600 para CCS linear 7; 3.200 para CCS linear 8 e 6.400 para CCS linear 9. O peso vivo e a condição corporal (C.C.) foram mensurados no dia 21 de cada período. A C.C. foi avaliada em escala de 1 a 5, magra a gorda (Wildman et al., 1982).

O consumo de matéria seca (CMS) foi mensurado entre os dias 16 e 19 de cada período. A silagem de milho, os ingredientes do concentrado e as sobras alimentares de cada animal foram amostrados diariamente nestes dias. As amostras diárias foram congeladas e uma amostra composta por período foi formada por mistura de quantidades idênticas de matéria natural dos alimentos ou das sobras por animal. O teor de MS das amostras compostas de silagem e sobras foi determinado após pré-secagem em estufa ventilada a 58°C por 72 horas. As amostras pré-secas e as amostras dos ingredientes concentrados foram posteriormente moídos a 1 mm em moinho do tipo Thomas Willey anteriormente à desidratação a 105°C por 8 horas. A composição da dieta oferecida em ingredientes (TABELA 4) e a quantidade oferecida de MS em cada período foi calculada a partir da quantidade oferecida de matéria natural de cada ingrediente multiplicada pelo respectivo teor de MS do ingrediente. O consumo de MS por animal foi calculado subtraindo a quantidade diária de sobras da quantidade diária de MS oferecida.

A composição em nutrientes da dieta consumida (TABELA 4) foi a soma do consumo de nutrientes por cada animal em cada período dividido pelo consumo total de MS de cada dieta em todo o período experimental. O extrato etéreo e a Fibra em Detergente Neutro (FDN) foram determinados segundo o AOAC (1980). A FDN livre de cinzas foi determinada não sequencialmente com adição de amilase (Ó-Amilase, Laboratorio Okochi Ltda, São Paulo, Brasil) e sulfito de sódio (Van Soest et al., 1991). A proteína bruta foi determinada pelo

método de Kjeldahl (AOAC, 1990). As cinzas foram determinadas através da incineração das amostras em mufla a 550°C por oito horas. As análises de minerais foram realizadas em uma amostra composta de cada mineral formada por quantidades idênticas coletadas em cada período experimental por espectrofotometria de absorção atômica com chama de acetileno (Varian AA-6501) (Cooxupé Nutrição Animal, Cooperativa Regional de Cafeicultores, Guaxupé, MG).

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) no trato digestivo total, da matéria orgânica (DMO), da FDN (DFDN) e da matéria orgânica não-FDN (DMOnFDN) foi calculada utilizando a produção fecal estimada entre os dias 16 e 19 de cada período. O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado para cada vaca multiplicando a DMO pelo consumo de matéria orgânica (MO). Para estimar a produção fecal, cápsulas contendo 5 gramas de óxido crômico foram fornecidas a cada animal de doze em doze horas entre os dias 8 e 19 de cada período. Amostras de fezes foram obtidas diretamente do reto de cada vaca entre os dias 16 e 19, de doze em doze horas, atrasando o início das coletas em 3 horas a cada dia. Ao final de cada período experimental uma amostra composta de fezes foi formada para cada animal. Os compostos fecais foram desidratados, o teor de FDN e cinzas foi determinado como previamente descrito, e a concentração de Cromo foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (Williams et al., 1962).

A concentração de derivados de purinas na urina foi mensurada apenas nas vacas fistuladas para indicar a produção de proteína microbiana no rúmen. Uma amostra de urina foi coletada em cada um de quatro períodos de seis horas nos dias 16 a 19 de cada período, atrasando o início da coleta 6 horas a cada novo dia, até perfazer uma coleta representativa de um período de 24 horas. Ao volume de urina coletado foi imediatamente adicionado 10% de uma solução de ácido sulfúrico a 10% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta

foi formada para cada vaca no final de cada período. As amostras compostas foram diluídas com água destilada na proporção 1:3 (urina:água) e congeladas a -20°C até a realização das análises de alantoína, ácido úrico e creatinina. Para a análise de alantoína, o procedimento adotado foi semelhante ao sugerido por Chen & Gomes (1995). Para as análises de ácido úrico e creatinina foram utilizados kits de análise laboratorial, seguindo-se as recomendações e procedimentos especificados pelo fabricante (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 73-4/30 para ácido úrico e Cat. 35-100 para creatinina).

No dia 20 de cada período experimental amostras do fluido ruminal foram obtidas das vacas fistuladas de 3 em 3 horas por um período de 24 horas, iniciando às 7:00 horas. No dia da coleta os animais receberam a alimentação da manhã imediatamente após a primeira amostragem do conteúdo ruminal. As amostras foram colhidas com um Becker de 200 ml no saco ventral do rúmen. O fluido ruminal foi filtrado em coador de pano e o pH da amostra foi imediatamente determinado. O menor valor de pH ruminal ao longo das 24 horas de amostragem e o tempo após alimentação de ocorrência deste pH foram computados para cada vaca. Uma amostra foi obtida para análise de ácidos graxos voláteis (AGV) por adição de 1 ml de ácido sulfúrico a 50% a 50 ml de fluido ruminal. Outra amostra para determinação de amônia foi obtida adicionando 1 ml de ácido tricloroacético a 50% a 50 ml de fluido ruminal filtrado. As amostras foram congeladas a -20°C até a realização das análises. Os AGV foram analisados por cromatografia gasosa (Varian CP-3380 Gas Chromatograph) equipado com coluna capilar (Agilent Technologies, High Performance Capillary Column 19091F-102; HP-FFAP Crosslinked FFAP). A concentração total de AGV foi a soma do acetato, do propionato e do butirato. A análise de nitrogênio amoniacal foi realizada similarmente ao relatado por Cotta & Russell (1982).

Entre os dias 19 e 21 de cada período foi realizada nas vacas fistuladas a incubação ruminal *in situ* de silagem de milho seca e moída ou *in natura*. As amostras de silagem desidratadas e moídas foram incubadas no rúmen em sacos confeccionados com nylon 100% poliéster (9 x 18 cm), contendo aproximadamente 5 gramas de silagem de milho seca a 58°C por 72 horas e moída em peneira de 5 mm. As amostras *in natura* foram incubadas em sacos de nylon do tipo macrobag (30 x 11 cm) com 80 gramas de silagem de milho. As amostras moídas foram introduzidas no rúmen às 7:00 horas e incubadas em duplicata por 0, 6, 12, 24 e 72 horas. As amostras *in natura* foram incubadas por 0, 24 e 72 horas. Após a retirada do rúmen os sacos incubados foram imediatamente mergulhados em água gelada e em seguida congelados, juntamente com os sacos representativos do tempo zero, que não foram introduzidos no rúmen. A MS da silagem foi dividida em três frações: Fração A instantaneamente degradada, fração B lentamente degradada no rúmen e fração C não degradável. Considerando R o peso do resíduo de MS após incubação e lavagem das amostras nos tempos, e I o peso inicial da amostra, a fração A foi calculada como: $A = (I - R \text{ do tempo } 0)/I$. A fração A para cada forragem em cada vaca foi um valor único calculado pela média de todos os sacos não incubados e representativos do tempo zero em cada período experimental. A fração C foi estimada pela fórmula: $C = R \text{ do tempo } 72 \text{ horas}/I$. A fração B foi calculada pela fórmula: $B = 100 - (A + C)$. A taxa fracional de degradação da fração B (kd) foi estimada por regressão linear, ao longo do tempo, do logarítimo natural do resíduo nos sacos incubados como porcentagem da amostra inicialmente incubada após subtração da fração C destes valores. A degradação efetiva (DEF) foi calculada com a fórmula: $DEF = A + \{B [kd/(kd + kp)]\}$. A DEF foi calculada assumindo uma taxa fracional de passagem (kp) de $0,05 \text{ h}^{-1}$. A degradação no tempo 24 horas (DEG 24) foi o degradado de MS nos sacos incubados por 24 horas.

Para a análise financeira foram considerados os parâmetros de remuneração por qualidade implantados pela Nestlé em Janeiro de 2005 (<http://www.dpam.com.br/produtor/>). Nesta análise foram comparadas as dietas com 10% de milho na MS (Milho) às dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica (Polpa). O tratamento que resultou em menor produção de leite por vaca por dia (Polpa) foi assumido como sendo representativo de uma fazenda produzindo 2000 l de leite por dia e o tratamento com maior produção (Milho) teve aumento proporcional no volume diário de produção [2000 x (Produção de leite no Milho/Produção de leite no Polpa)] (TABELA 6). Nesta fazenda com 2000 l/d o preço base do leite foi assumido como sendo R\$ 0,6000/l e na fazenda com maior produção o preço base resultante do maior volume diário de produção foi R\$ 0,6008/l. Ao preço base foram acrescidos os adicionais decorrentes dos teores de proteína e de gordura e da CCS, mensurados experimentalmente, e o adicional decorrente da contagem microbiana (UFC), assumido como 10.000 células ml⁻¹.

Para o cálculo do custo por kg de MS de dieta foi assumida a composição das dietas em ingredientes (TABELA 4) e os seguintes preços por kg de matéria natural: Silagem de milho (35% de MS) R\$ 0,05/kg; soja grão cru (89,5% de MS) R\$ 0,64; uréia (100% de MS) R\$ 0,90; farelo de soja (87% de MS) R\$ 0,61; milho maduro moído (87,3% de MS) R\$ 0,30; mistura de minerais e vitaminas (100% de MS) R\$ 1,00 e bicarbonato de sódio (100% de MS) R\$ 1,00. O custo por kg de MS das dietas foi simulado com preços da polpa cítrica (90,2% de MS) variando de R\$ 0,05/kg a R\$ 0,30/kg. O custo alimentar por vaca por dia foi calculado multiplicando o consumo de MS mensurado experimentalmente pelo custo por kg de MS de dieta. O lucro sobre custo alimentar foi a renda bruta por vaca por dia (Produção de leite x Preço do litro) subtraído do custo alimentar por vaca por dia. Uma análise de lucro sobre custo alimentar em função de variação no preço do litro de leite,

independentemente do teor de sólidos, foi gerada para as dietas com polpa cítrica a R\$ 0,20/kg e a R\$ 0,25/kg.

Análises estatísticas

Os parâmetros de desempenho (Produções de leite, gordura e proteína, Leite 3,5%, ELI leite, % de gordura, % de proteína, peso vivo, CCS, CCS linear, C.C., CMS, CMOD) e digestibilidade (DMS, DMO, DMO_nFDN, DFDN) foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS com o modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + V(Q)_{ij} + P_k + C_l + M_m + C*M_{lm} + e_{ijklm}.$$

Onde: μ = média geral;

Q_i = efeito de quadrado (i = 1 a 4);

$V(Q)_{ij}$ = efeito de vaca dentro de quadrado (j = 1 a 16);

P_k = efeito de período (k = 1 a 4);

C_l = efeito de carboidrato (l = Milho, Polpa);

M_m = efeito de mineral (m = Orgânico, Inorgânico);

$C*M_{lm}$ = Interação entre carboidrato e mineral; e_{ijklm} = erro experimental assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

Os parâmetros da degradação *in situ* da MS da silagem de milho (Fração A, Fração B, Fração C, kd de B, DEF e DEG 24), a concentração de alantoína, ácido úrico, creatinina, alantoína/creatinina e (alantoína+ácido úrico)/creatinina e o valor do menor pH ruminal observado ao longo de 24 horas e o momento após alimentação de ocorrência do pH mínimo foram analisados com o mesmo modelo da análise de desempenho e digestibilidade, porém sem o efeito de

quadrado, pois foram coletados dados apenas do quadrado de vacas fistuladas no rúmen.

Os perfil de fermentação ruminal avaliado ao longo de 24 horas (acetato, propionato e butirato em mM e % do AGV total, acetato/propionato, amônia e pH) foram analisados como medidas repetidas ao longo do tempo através do procedimento MIXED do SAS. As estruturas de covariância testadas foram simetria composta, autoregressiva de ordem 1 e não-estruturada. A estrutura de covariância utilizada foi aquela com o maior valor para o critério de informação de Akaike. O quadrado médio da interação Período*Mineral*Concentrado*Vaca foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de mineral, concentrado e a interação entre estes dois fatores. O erro residual testou o efeito de tempo após a alimentação e suas interações. O modelo usado foi:

$$Y_{ijklm} = \mu + V_i + P_j + C_k + M_l + C*M_{kl} + T_m + C*T_{km} + M*T_{lm} + C*M*T_{klm} + e_{ijklm}$$

Onde: μ = média geral;

V_i = efeito de vaca ($i = 1$ a 4);

P_j = efeito de período ($j = 1$ a 4);

C_k = efeito de carboidrato ($k =$ Milho, Polpa);

M_l = efeito de mineral ($l =$ Orgânico, Inorgânico);

$C*M_{kl}$ = Interação entre carboidrato e mineral;

T_m = efeito de tempo após a alimentação ($m = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21$ e 24 horas após a alimentação);

$C*T_{km}$ = Interação entre carboidrato e tempo após a alimentação;

$M*T_{lm}$ = Interação entre mineral e tempo após a alimentação;

$C*M*T_{klm}$ = Interação entre carboidrato, mineral e tempo após a alimentação; e_{ijklm} = erro experimental.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas dietas sem inclusão de milho o objetivo foi utilizar a polpa cítrica como a fonte única de carboidratos do concentrado (TABELA 4). A substituição dietética total ou parcial de milho por polpa cítrica é uma alternativa para reduzir o custo alimentar. O subproduto apresenta custo histórico inferior ao milho. Entre janeiro de 2003 e novembro de 2005 a polpa cítrica foi em média 15% mais barata que o milho (Scot Consultoria, 2006). Neste período, a polpa chegou a custar no máximo 95% do preço do milho em Maio de 2003 e no mínimo 57% do preço do milho em Janeiro de 2003. Assumindo o milho a R\$ 0,30 por kg de MN e esta proporcionalidade mínima e máxima entre o preço dos dois alimentos, cotações de polpa cítrica variaram de R\$ 0,171 a 0,285 por kg. Com preço de polpa cítrica inferior ao preço do milho, mesmo a baixa inclusão do grão adotada neste experimento aumentou o custo da MS dietética (FIGURA 4).

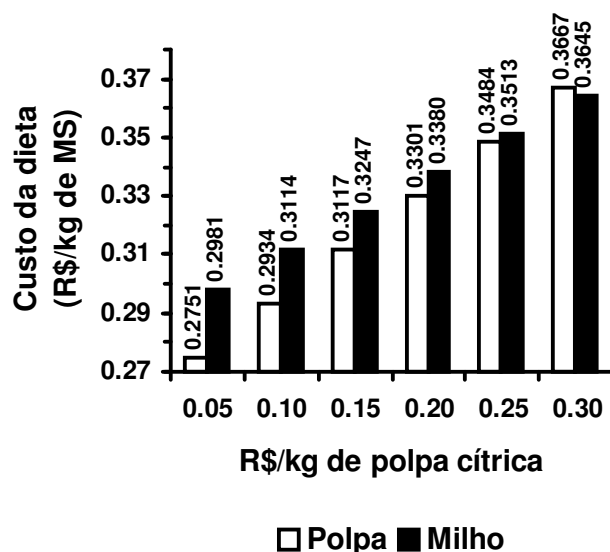


FIGURA 4. Custo por kg de MS dos tratamentos com 33% de polpa cítrica (Polpa) e dos tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (Milho) com variação na cotação da polpa cítrica (90,2% de MS) de R\$ 0,05 a R\$ 0,30/kg de matéria natural e milho cotado a R\$ 0,30/kg.

A substituição de milho por polpa apresenta vantagens operacionais além de reduzir o custo da dieta. O subproduto peletizado é de fácil armazenagem na fazenda e elimina a necessidade de moagem do milho para fornecimento aos animais. As perdas durante a estocagem também são menores na polpa, principalmente por menor ataque de pragas em armazenamentos prolongados. O milho colhido maduro exige a desidratação a um dado teor de umidade, fato que pode retardar a colheita, potencialmente aumentando a magnitude das perdas pré-colheita e a contaminação por micotoxinas, ou pode envolver gasto de trabalho e de energia para a remoção da umidade no grão. Além das possibilidades de redução no custo dietético e simplificação do programa alimentar o uso de polpa cítrica também cria um elo entre as indústrias do leite e a da laranja, geograficamente próximas no Sudeste Brasileiro.

TABELA 5. Consumo de MS e de matéria orgânica digestível e digestibilidade aparente de nutrientes nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI	EPM ¹	P Car ²	P Min ²	P Int ²
	kg d ⁻¹							
Consumo	20,9	20,1	19,1	19,8	0,44	0,03	0,92	0,09
CMOD ³	13,6	13,4	12,2	12,9	0,35	<0,01	0,57	0,21
	% do consumido							
DMS ³	67,9	68,7	66,2	67,4	0,66	0,03	0,12	0,75
DMO ³	70,4	71,0	68,9	70,1	0,58	0,05	0,12	0,64
DFDN ³	42,8	38,3	37,1	41,3	1,75	0,47	0,92	0,02
DMOnFDN ³	82,6	84,6	83,2	83,5	0,63	0,70	0,07	0,14

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Valor de probabilidade para os efeitos de Car = Carboidrato; Min = Mineral e Int = Interação entre Car e Min.

³ CMOD = Consumo de matéria orgânica digestível; DMS = Digestibilidade da matéria seca; DMO = Digestibilidade da matéria orgânica; DFDN = Digestibilidade da fibra em detergente neutro; DMOnFDN = Digestibilidade da matéria orgânica não-FDN.

As dietas com alta inclusão de polpa cítrica deprimiram o CMS em 1 kg (TABELA 5). A queda no CMOD nas dietas com polpa, induzida pelos menores CMS e DMO (TABELA 5), é uma explicação plausível para a queda de 1 kg induzida por estes tratamentos na produção diária de leite (TABELA 6). Broderick et al. (2002) observaram queda no CMS de 20,9 para 19,7 kg e na produção de leite de 35,0 para 32,0 kg quando dietas com 19,1% ou 13,4% de polpa cítrica na MS substituíram o mesmo teor dietético de silagem de grão úmido de milho, partindo de dietas com 38,5% ou 26,9% deste grão, respectivamente. Similarmente, Solomon et al. (2000) observaram queda de 21,4 para 20,5 kg no CMS de vacas com produção diária de leite ao redor de 37 kg quando a inclusão de polpa na dieta foi aumentada de 9,6% para 22,3%, reduzindo a inclusão de milho maduro grosseiramente moído de 22,1% para 9,3%, mas não foram capazes de detectar queda significativa no volume diário de leite produzido. Leiva et al. (2000) observaram queda de 3,9 kg na produção diária de leite de 184 vacas produzindo 31,8 kg e alimentadas em grupo, quando uma dieta com 20,5% de polpa cítrica e 9,2% de milho maduro moído substituiu outra com 9,6% de polpa e 19,5% de milho. O CMS do grupo de vacas foi 18,9 kg e 19,5 kg nas dietas com alta e baixa polpa cítrica, respectivamente. A substituição de milho por polpa cítrica em dietas para vacas leiteiras de alta produção é capaz de reduzir o CMS e o volume de leite produzido.

O mecanismo da depressão de consumo induzida pela substituição de milho por polpa cítrica merece discussão. A julgar pelo menor CMOD nos tratamentos formulados exclusivamente com polpa cítrica (TABELA 5), parece que a ingestão de energia não foi o mecanismo regulador do consumo nestas dietas (Mertens, 1992). A substituição de silagem de grão úmido de milho por teores de 6, 12 ou 24% da MS de polpa de beterraba reduziu o CMS de vacas leiteiras, tendeu ($P=0,11$) a aumentar a massa de digesta no rúmen de 77,7 kg na

TABELA 6. Desempenho de vacas leiteiras nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI	EPM ¹	P Car ²	P Min ²	P Int ²
	kg d ⁻¹							
Leite	28,1	28,7	27,4	27,6	0,43	0,04	0,41	0,57
Leite 3,5%	28,2	29,2	27,5	28,0	0,53	0,11	0,15	0,58
Gordura	0,985	1,036	0,966	0,992	0,025	0,24	0,13	0,64
Proteína	0,894	0,900	0,854	0,855	0,013	<0,01	0,82	0,85
Lactose	1,321	1,354	1,285	1,305	0,025	0,10	0,29	0,78
	%							
Gordura	3,62	3,68	3,61	3,67	0,06	0,87	0,37	0,97
Proteína	3,23	3,20	3,17	3,16	0,02	0,03	0,31	0,67
Lactose	4,70	4,71	4,70	4,75	0,04	0,68	0,53	0,63
	Mcal d ⁻¹							
ELI leite ³	19,3	19,9	18,7	19,1	0,34	0,05	0,16	0,66
	Mcal kg ⁻¹							
Eficiência ⁴	1,42	1,49	1,53	1,47	0,04	0,25	0,94	0,15
	kg							
Peso vivo	615	615	614	608	2,6	0,15	0,28	0,30
	x 1000 células ml ⁻¹							
CCS ⁵	93	41	68	63	23,3	0,95	0,22	0,31
	1 a 9							
CCS Linear	1,61	0,99	1,37	1,29	0,26	0,92	0,18	0,31
	1 a 5 (Magra a gorda)							
C.C. ⁶	3,0	3,2	3,1	3,1	0,07	0,87	0,21	0,13

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Valor de probabilidade para os efeitos de Car = Carboidrato; Min = Mineral e Int = Interação entre Car e Min.

³ ELI leite = Excreção diária de energia líquida no leite = [(0,0929 x % gordura) + (0,0547 x % de proteína) + (0,0395 x % de lactose)] x kg de leite.

⁴ Eficiência = ELI leite/CMOD.

⁵ CCS = Contagem de células somáticas.

⁶ C.C. = Condição corporal

dieta com 0% de polpa de beterraba para 80,7 kg na dieta com 24% de beterraba, e aumentou o conteúdo de água na digesta ruminal (Voelker & Allen, 2003). A alta capacidade de retenção de água de subprodutos fibrosos (Ramazin et al., 1994) poderia aumentar o peso e o volume de digesta úmida e estimular receptores de tensão na parede do rúmen, capazes de regular a motilidade do

órgão (Leek, 1993). Broderick et al. (2002) observaram que em um menor CMS, induzido pela substituição parcial de silagem de grão úmido de milho por polpa cítrica, não foi observada queda significativa tanto no peso quanto no volume da digesta ruminal de vacas leiteiras, sugerindo que houve maior enchimento ruminal por unidade de CMS na dieta com polpa.

Outro mecanismo da inibição do CMS quando polpa substitui milho poderia envolver diferenças na fermentação ruminal destes substratos. Um mecanismo pelo qual a fermentação ruminal poderia modular o consumo em ruminantes seria pelo fluxo de propionato do rúmen (Anil & Forbes, 1980). Tem sido assumido que este seria um mecanismo pouco provável em dietas onde polpa substitui amido, já que a fermentação de pectina de polpa cítrica resultou em relação A/P no fluído ruminal *in vitro* de 9 para 1 (Hatfield & Weimer, 1995). Broderick et al. (2002) observaram que a relação A/P foi aumentada de 3,10 para 3,44 com a inclusão de polpa cítrica em substituição parcial à silagem de milho úmido na dieta de vacas leiteiras. Estes dados são coerentes aos observados neste trabalho, apesar de não ter havido poder estatístico para detectar diferenças significativas ($P=0,23$), a relação A/P caiu numericamente quando milho substituiu parte da polpa cítrica na dieta (TABELA 7).

Entretanto, no trabalho de Broderick et al. (2002), similarmente ao aqui observado, o aumento na relação A/P foi acompanhado por aumento na concentração ruminal de AGV, o que pode ter aumentado a concentração de propionato no fluído ruminal. Em valores de pH ruminal ao redor do fisiologicamente observado em vacas leiteiras, a taxa fracional de absorção de propionato é mais rápida do que a de butirato e acetato (Dijkstra et al., 1993; Resende Júnior et al., no prelo). Apesar de dietas onde houve substituição de milho por polpa cítrica resultarem em aumento na relação A/P, o fluxo de propionato ruminal para o sangue pode aumentar nestas formulações. Butirato,

TABELA 7. Perfil da fermentação ruminal em vacas fistuladas no rúmen e amostradas a cada 3 horas do dia ao longo de 24 horas nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI	EPM ¹	P Car ²	P Min ²	P Int ²
	mM							
Acetato	41,1	43,4	47,3	48,4	3,29	0,18	0,61	0,85
Propionato	15,7	16,9	17,9	17,9	1,33	0,34	0,71	0,61
Butirato	7,0	7,6	8,2	8,2	0,56	0,21	0,62	0,61
AGV total	63,7	67,9	73,4	74,3	5,09	0,21	0,63	0,75
	% do AGV total							
Acetato	64,8	64,6	64,8	65,2	0,49	0,53	0,90	0,50
Propionato	24,3	24,5	24,1	23,7	0,30	0,17	0,74	0,36
Butirato	10,9	11,0	11,1	11,1	0,37	0,72	0,91	0,91
A/P ³	2,71	2,65	2,74	2,80	0,055	0,23	0,97	0,36
	mg dl ⁻¹							
Amônia	21,4	21,9	19,7	20,6	1,27	0,33	0,58	0,86
pH médio	6,73	6,70	6,68	6,78	0,047	0,76	0,48	0,22
pH mínimo	6,30	6,32	6,21	6,34	0,058	0,61	0,26	0,37
	horas após alimentação							
Tempo pH ⁴	12,2	14,1	14,2	11,2	2,18	0,88	0,80	0,31

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Valor de probabilidade para os efeitos de Car= Carboidrato; Min = Mineral e Int = Interação entre Car e Min.

³ A/P = Relação entre acetato e propionato. $P < 0,001$ para o efeito de Tempo de amostragem. $P < 0,01$ para a interação entre Tempo, Car e Min.

⁴ Tempo após alimentação no qual foi observado o menor valor de pH ruminal.

um potente inibidor da motilidade ruminal (Crichlow, 1988), também pode estar envolvido no menor consumo observado nas dietas com polpa cítrica. Apesar da ausência de poder estatístico ($P=0,21$), a concentração de butirato ruminal foi mais alta nas dietas com maior conteúdo de polpa (TABELA 7), coerente às observações de Broderick et al. (2002).

O baixo pH ruminal pode aumentar a velocidade de absorção dos AGV pela parede do rúmen (Dijkstra et al., 1993), potencialmente capaz de aumentar o estímulo químico aos receptores vagais sabidamente inibidores da motilidade ruminal (Cottrell & Gregory, 1991; Crichlow & Leek, 1986). Apesar da fermentação da pectina ser inibida por baixo pH ruminal (Marounek et al., 1985), Rosendo et al. (1999) observaram *in vitro* que fermentações com pectina tenderam a atingir um valor mínimo de pH mais rapidamente que fermentações com amido. Entretanto, o teor de açúcares ao redor de 25% no alimento polpa cítrica (Hall et al., 1999; Miron et al., 2001), questiona a premissa de que a degradação ruminal deste alimento deva ser encarada como resultado único da fermentação de fibra e de pectina. Tanto sacarose quanto pectina foram capazes de induzir crescimento microbiano *in vitro* mais rapidamente do que amido (Hall & Herejk, 2001). Leiva et al. (2000) observaram queda mais rápida no pH ruminal de vacas leiteiras quando polpa cítrica substituiu milho, similarmente ao observado por Costa (2002) quando 0,8% do peso vivo de polpa cítrica ou milho maduro finamente moído foram introduzidos em dose única pela cânula ruminal de vacas não lactantes. Apesar da queda abrupta no pH ruminal ser potencialmente capaz de modular a motilidade ruminal em vacas leiteiras, a resposta observada em perfil circadiano de variação no pH ruminal (FIGURA 5) parece indicar que este mecanismo não foi um determinante importante do menor CMS observado quando polpa cítrica foi fornecida como concentrado energético único neste experimento. O valor do pH ruminal médio e a média do mínimo valor de pH observados ao longo do dia não variaram entre tratamentos (TABELA 7).

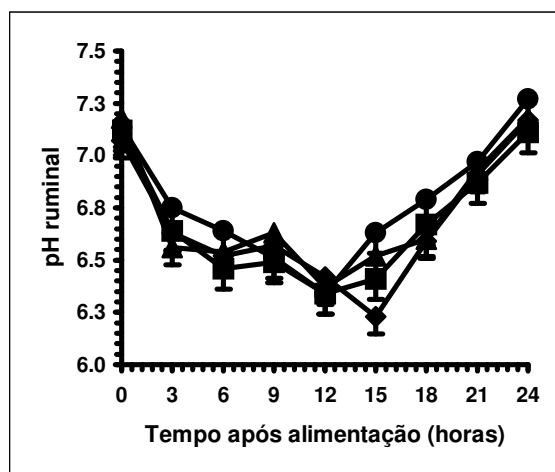


FIGURA 5. pH ruminal em vacas fistuladas no rúmen e amostradas a cada 3 horas do dia ao longo de 24 horas nos tratamentos com 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico (π), 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico (\prime), 33% de polpa cítrica e mineral orgânico (\downarrow) e 33% de polpa cítrica e mineral inorgânico (\diamond). $P < 0,01$ para o efeito de Tempo e $P = 0,34$ para a interação entre Tempo, Carboidrato e Mineral.

As dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica foram numericamente capazes de induzir maior concentração ruminal de AGV nos tempos de amostragem imediatamente após as alimentações da manhã (Tempos 3 e 6) e da tarde (Tempos 12 e 15) (FIGURA 6), tempos no qual também foram observadas baixas relações A/P (FIGURA 7). A concentração ruminal de amônia após a alimentação também foi mais alta nos tratamentos onde milho maduro finamente moído substituiu polpa cítrica (FIGURA 8). Estes achados sugerem que o amido do milho de alta vitreosidade em estágio maduro de maturação induziu menor taxa de crescimento microbiano logo após a alimentação que os carboidratos na polpa cítrica. Estes resultados são coerentes aos achados *in vitro* de Hall & Herejk (2001). Parece ser correto afirmar que nestas dietas a concentração de AGV e de amônia no rúmen foram melhores

indicadores da diferença no metabolismo ruminal dos substratos que o pH do fluído.

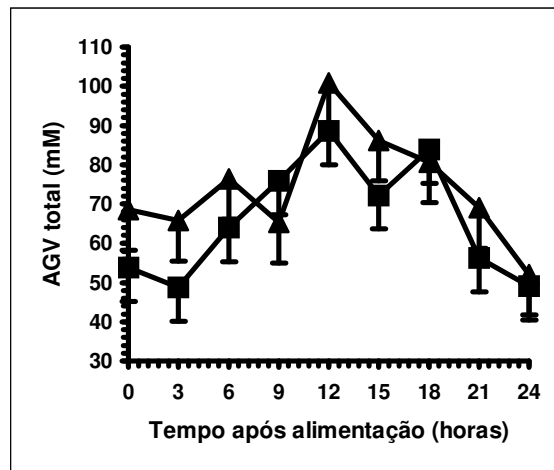


FIGURA 6. Ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen de vacas fistuladas no rúmen e amostradas a cada 3 horas do dia ao longo de 24 horas nos dois tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (Δ) e nos dois com 33% de polpa cítrica (◻). $P < 0,01$ para o efeito de Tempo e $P = 0,84$ para a interação entre Tempo e Carboidrato.

Entretanto, estes resultados são contrastantes aos de Costa et al. (2005), onde o aumento no teor dietético de silagem de grão úmido de milho de 9% para 19% da MS, em dietas com alta inclusão de polpa cítrica, reduziu o pH ruminal 12 horas após a alimentação. Broderick et al. (2002) observaram que uma mistura de partes iguais de silagem de grão úmido de milho e polpa cítrica resultou em menor pH e concentração de amônia no rúmen e maior concentração ruminal de AGV do que uma dieta onde estes concentrados energéticos foram substituídos pelo mesmo teor dietético de milho maduro grosseiramente moído. Leiva et al. (2000) observaram queda no teor de uréia no leite quando uma dieta com 20,5% de polpa cítrica e 9,2% de milho maduro moído substituiu outra com

9,6% de polpa e 19,5% de milho. O efeito sobre a fermentação ruminal da inclusão adotada de amido e da textura do endosperma, do processamento e do estágio de maturação do milho (Côrrea et al., 2002; Knowlton et al., 1998; Pereira et al., 2004) podem determinar a resposta observada à substituição de milho por polpa cítrica. Os carboidratos na polpa parecem ser invariavelmente de rápida fermentabilidade no rúmen, enquanto a velocidade de degradação do amido do milho é mais dependente da fonte e do processamento do alimento.

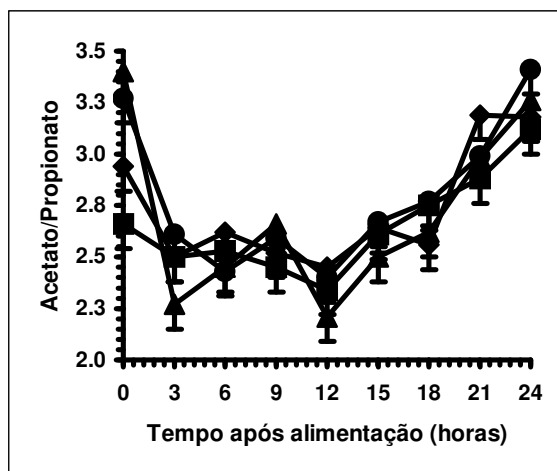


FIGURA 7. Relação entre acetato e propionato (A/P) em vacas fistuladas no rúmen e amostradas a cada 3 horas do dia ao longo de 24 horas nos tratamentos com 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico (π), 10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico (\prime), 33% de polpa cítrica e mineral orgânico (\triangle) e 33% de polpa cítrica e mineral inorgânico (∇). $P < 0,01$ para o efeito de Tempo e $P < 0,01$ para a interação entre Tempo, Mineral e Carboidrato.

Foi marcado o efeito do método de mensuração utilizado sobre a magnitude dos parâmetros cinéticos de degradação ruminal da MS da silagem de milho (TABELA 8). O tamanho da Fração A foi 148% superior quando estimada com as amostras desidratadas e moídas, enquanto o tamanho da Fração

C, menor nas amostras secas e moídas do que nas amostras incubadas *in natura*, foi menos afetado pelo método de mensuração da degradabilidade ruminal. Apesar da disparidade induzida pelo método *in situ* na resposta aos tratamentos, parece que a inclusão de milho à dieta reduziu a degradabilidade ruminal da MS da silagem de milho. Nas dietas com algum milho moído, tanto o kd da Fração B, mensurado em amostras frescas, quanto o tamanho da Fração C, mensurado em amostras secas e moídas, tenderam a cair ($P=0,11$) e a aumentar ($P=0,15$), respectivamente. A similaridade no pH ruminal entre tratamentos (TABELA 7, FIGURA 5), sugere que algum mecanismo químico resultante da presença de amido no rúmen foi responsável pelo efeito associativo negativo da substituição parcial de polpa cítrica por milho sobre a degradabilidade ruminal da forragem (Grant & Mertens, 1992). Várias cepas de bactérias ruminais hemicelulolíticas são capazes de fermentar pectina (Dehority, 1969; Osborne & Dehority, 1989), a inclusão de algum amido dietético pode ter causado distúrbio no possível sinergismo entre a degradação da pectina na polpa cítrica e a degradação da forrageira tropical rica em hemicelulose. Estes dados sugerem que o aumento na fração indigestível ou a queda na velocidade de degradação das forrageiras no rúmen não explicam o menor CMS observado nas dietas com polpa cítrica como concentrado energético único.

A menor degradabilidade ruminal da MS da forragem nas dietas com alguma inclusão de milho em grão não refletiu em queda na DMS ou na DMO nestes tratamentos (TABELA 5). As dietas formuladas apenas com polpa cítrica tiveram menor digestibilidade que as dietas formuladas com 10% de milho na MS, pode ser que eventos pós-ruminais teriam determinado a resposta observada na digestibilidade aparente da MS e da MO no trato digestivo total. A digestão da fibra e da pectina na polpa são dependentes de sistemas enzimáticos anaeróbios de origem microbiana, enquanto o amido e a sacarose são digestíveis por enzimas secretadas pelo animal (Van Soest, 1994). Assumindo que a

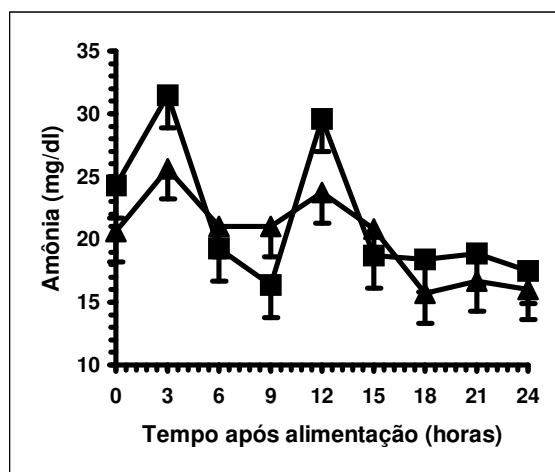


FIGURA 8. Amônia ruminal em vacas fistuladas no rúmen e amostradas a cada 3 horas do dia ao longo de 24 horas nos dois tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (■) e nos dois com 33% de polpa cítrica (▲). $P < 0,01$ para o efeito de Tempo e $P = 0,53$ para a interação entre Tempo e Carboidrato.

digestibilidade da sacarose no rúmen é rápida e quase total, queda na digestibilidade de subprodutos fibrosos, devido à passagem para fora do rúmen de fibra e pectina potencialmente fermentáveis, pode ocorrer em dietas com alta inclusão de polpa cítrica (Bhatti & Firkins, 1995; Weidner & Grant, 1994). O fluxo de polpa cítrica por passagem com a digesta para fora do rúmen pode ter limitado a digestão deste alimento. A passagem de polpa cítrica potencialmente fermentável para o intestino pode ter causado limitação física no consumo de MS, podendo ser um mecanismo adicional envolvido no menor CMS observado nas dietas formuladas exclusivamente com este concentrado energético (Conrad et al., 1964).

A síntese de proteína microbiana, estimada pela excreção diária de derivados de purinas na urina, foi numericamente maior nas dietas onde milho substituiu parcialmente a polpa cítrica dietética, apesar da falta de poder para dar

suporte à diferença ($P=0,25$) (TABELA 9). Apesar do crescimento microbiano à base de pectina e sacarose ser rápido, o potencial de síntese de proteína microbiana a partir destes substratos é inferior ao do amido (Hall & Herejk, 2001). Dusková & Marounek (2001) observaram que a eficiência de síntese de proteína microbiana de *Lachnospira multiparus* foi maior com glicose do que com pectina cítrica. A via glicolítica de Entner-Doudoroff (Entner & Doudoroff, 1952) parece ser ativa na conversão de ácido galacturônico a piruvato em bactérias pectinolíticas presentes no rúmen, fornecendo menos energia por mol de monossacarídeo fermentado que a via clássica de Embden-Meyerhoff, comum no metabolismo microbiano da glicose (Dusková & Marounek, 2001; Paster & Canale-Parola, 1985). Em contraste, Ben-Ghedalia et al. (1989) relataram que a substituição de cevada por polpa cítrica resultou em pH ruminal mais alto e aumento no fluxo de proteína microbiana do rúmen de ovinos e Strobel & Russell (1986) observaram similaridade no crescimento microbiano *in vitro* a partir de sacarose, amido e pectina em pH neutro. Apesar da disparidade de resultados, a substituição de amido por pectina pode deprimir a síntese de proteína microbiana no rúmen.

A menor síntese de proteína microbiana quando polpa cítrica substitui amido é uma explicação plausível para o menor teor e produção de proteína no leite neste tratamento (TABELA 6). Em três experimentos realizados com vacas de alta produção a substituição de milho por polpa cítrica reduziu a porcentagem de proteína no leite (Broderick et al., 2002; Costa et al., 2005; Solomon et al., 2000) enquanto que no trabalho de Leiva et al. (2000) não foi detectado efeito desta substituição. Nestes experimentos utilizando vacas com produção diária de leite ao redor ou maior que 30 kg, a substituição de milho por polpa cítrica reduziu a excreção diária de proteína. Em contraste, em experimentos trabalhando com vacas de potencial produtivo inferior a 20 kg por dia, variação similar no perfil de carboidratos do concentrado não induziu resposta detectável

TABELA 8. Degradabilidade *in situ* da MS da silagem de milho, incubada após desidratação e moagem (5 mm) ou incubada *in natura*, nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI	EPM ¹	P Car ²	P Min ²	P Int ²
	% da matéria seca ⁴							
Fração A ₃	37,7	37,7	37,7	37,7				
Fração B ₃	30,2	29,5	33,3	34,7	2,3	0,15	0,89	0,64
Fração C ₃	32,0	32,8	29,0	27,5	2,3	0,15	0,89	0,64
DEG 24 ³	52,6	55,6	54,1	53,8	2,6	0,96	0,60	0,55
DEF ³	48,3	51,2	50,7	51,2	1,8	0,51	0,42	0,60
	h ⁻¹							
kd de B ³	-	-	-	-	0,004	0,71	0,25	0,27
	0,029	0,039	0,032	0,033				
	% da matéria seca ⁵							
Fração A	15,2	15,2	15,2	15,2				
Fração B	47,3	50,6	47,2	48,6	1,5	0,56	0,19	0,58
Fração C	37,5	34,2	37,6	36,2	1,5	0,56	0,19	0,57
DEG 24	45,6	46,0	46,7	46,9	0,9	0,38	0,75	0,89
DEF	37,0	37,4	37,8	38,0	0,7	0,38	0,69	0,90
	h ⁻¹							
kd de B	-	-	-	-	0,002	0,11	0,30	0,48
	0,043	0,038	0,047	0,046				

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Valor de probabilidade para os efeitos de Car = Carboidrato; Min = Mineral e Int = Interação entre Car e Min.

³ Parâmetros de degradabilidade ruminal estimados com amostras pré-secas e moídas a 5 mm. Fração A = instantaneamente degradada no rúmen. Fração B = lentamente degradada no rúmen. Fração C = indigestível mensurada como o resíduo da incubação de 72 horas. DEG 24 = desaparecimento de matéria seca do saco incubado por 24 horas. DEF = degradação efetiva = A + B [kd/(kd+kp)], assumindo kp de 0,05 h⁻¹. kd de B = taxa fracional de degradação da fração B.

⁴ Parâmetros de degradabilidade ruminal estimados com amostras desidratadas e moídas a 5 mm.

⁵ Parâmetros de degradabilidade ruminal estimados com amostras *in natura* pela técnica de macro bag .

em teor e produção de proteína (Martinez, 2004; Scoton, 2003; Tavares et al., 2005; Van Horn et al., 1975), o mesmo sendo observado em ovelhas (Fegeros et al., 1995). A variação no perfil de carboidratos pode ter sido capaz de limitar o aporte de proteína metabolizável apenas em animais com alta demanda nutricional. Broderick et al. (2002) observaram que a suplementação com proteína não degradável no rúmen oriunda de soja aumentou a secreção de lactose no leite, sendo a resposta mais efetiva nas dietas onde polpa substituiu milho ($P=0,10$ para a interação entre proteína e carboidrato), sugerindo que a dieta com polpa cítrica pode ter sido mais limitante da absorção de aminoácidos metabolizáveis gliconeogênicos (Danfaer, 1994) que as dietas formuladas exclusivamente com milho. As dietas com milho tenderam ($P=0,10$) a aumentar a secreção de lactose no leite neste experimento (TABELA 6).

TABELA 9. Concentração de alantoína (Alan), creatinina (Crea) e ácido úrico (Acu) na urina nos tratamentos MO (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral orgânico), MI (10% de milho, 24% de polpa cítrica e mineral inorgânico), PO (33% de polpa cítrica e mineral orgânico) e PI (33% de polpa cítrica e mineral inorgânico).

	MO	MI	PO	PI	EPM ₁	<i>P</i> Car ₂	<i>P</i> Min ₂	<i>P</i> Int ₂
	mM							
Alan	10,68	12,12	6,07	7,21	1,87	0,74	0,63	0,80
Acu	1,37	1,14	1,39	1,20	0,21	0,84	0,35	0,93
Crea	5,18	6,81	6,07	7,21	0,64	0,39	0,09	0,71
Alan/Crea	2,32	1,88	1,80	1,69	0,26	0,26	0,34	0,54
(Alan+Acu)/Crea	2,66	2,07	2,04	1,86	0,29	0,25	0,24	0,50

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Valor de probabilidade para os efeitos de Car= Carboidrato; Min = Mineral e Int = Interação entre Car e Min.

Em contraste ao observado para a proteína e a lactose no leite, a inclusão de milho às dietas com polpa cítrica não surtiu efeito sobre a gordura do leite (TABELA 6). A substituição de milho por polpa cítrica aumentou a

porcentagem de gordura no leite em três experimentos (Costa et al., 2005; Leiva et al., 2000, Van Horn et al., 1975), mas não afetou em cinco experimentos com vacas (Broderick et al., 2002; Martinez, 2004; Scoton, 2003; Solomon et al., 2000; Tavares et al., 2005) e em um experimento com ovelhas (Fegeros et al., 1995). Uma explicação para a divergência nas respostas em gordura no leite pode ter decorrido do fato da maioria das substituições dietéticas terem sido realizadas em dietas não deficientes em fibra efetiva. Resposta em gordura no leite à inclusão de subprodutos fibrosos à dieta é normalmente detectável quando a inclusão do alimento em teste ocorre em dietas deficientes em FDN oriundo de forragem, sabidamente acidogênicas (Armentano & Pereira, 1997).

Além da inclusão dietética de milho adotada como tratamento neste experimento ter sido propositalmente baixa (TABELA 4), o amido do grão utilizado não era de alta degradabilidade ruminal, já que era oriundo de germoplasma com alta vitreosidade do endosperma colhido em estágio maduro de maturação (Pereira et al., 2004). A moagem fina adotada é sabidamente insuficiente para elevar os valores de degradabilidade ruminal neste tipo de híbrido para valores semelhantes aos de materiais imaturos e/ou de menor vitreosidade (Correa et al., 2002). O teor de FDN oriunda de silagem de milho (TABELA 4) foi acima do mínimo recomendado para dietas de lactação com alta densidade nutricional e contendo concentrados energéticos ricos em amido (NRC, 2001). Dentre as dezesseis observações experimentais de mínimo valor de pH ruminal (TABELA 7), apenas uma apresentou valor inferior a 6, indicando que acidose ruminal não foi um problema nestas dietas experimentais. Portanto, as dietas experimentais eram teoricamente de baixo potencial acidogênico no rúmen, estas foram formuladas para representar dietas rotineiramente utilizadas em sistemas de produção trabalhando com vacas especializadas em produção de leite na região Sudeste do Brasil.

No trabalho de Solomon et al. (2000) o teor de FDN das dietas foi alto, ao redor de 35% da MS, e o pH ruminal foi ao redor de 6,4, mostrando que não tinha acidose induzida por excesso de amido. Broderick et al. (2002) também não observaram efeito da substituição parcial de silagem de grão úmido de milho por polpa cítrica sobre a gordura no leite em dietas com cerca de 28% de FDN total e 60% de forragem na MS. A diferença mais significativa em teor de gordura no leite ocorreu em vacas alimentadas com 25% de bagaço de cana peletizado como forrageira única (Van Horn et al., 1975). O teor de gordura neste experimento foi 4,22% no tratamento com 43% de polpa cítrica na dieta e caiu para 3,54% quando milho substituiu polpa, resultando em um teor dietético de polpa de 8%. A utilização de bagaço de cana peletizado como forrageira única certamente resultou em baixo conteúdo de FDN fisicamente efetivo em todos os tratamentos. Costa et al. (2005) também observaram que o aumento no teor dietético de silagem de grão úmido de milho em substituição ao mesmo teor de polpa cítrica reduziu o teor de gordura no leite. Baseado nestes dados, parece que apenas quando o potencial acidogênico da dieta é alto, a substituição de milho por polpa pode aumentar o teor de gordura no leite.

Apesar de se esperar maior teor de gordura quando pectina e fibra de polpa substituem milho no concentrado, a direção da resposta em teor e produção de gordura à substituição de milho por polpa cítrica não tem sido consistente entre experimentos. Diferenças no teor dietético, tipo e tamanho de partícula das forragens utilizadas; no tipo e teor dietético do amido substituído por polpa; e em fatores ligados à capacidade genética de produzir gordura e estágio de lactação das unidades experimentais são de difícil interpretação e certamente interagem com a inclusão de polpa cítrica aos tratamentos, podendo explicar a inconstância nas respostas. O perfil de fermentação da pectina, com maior proporção de ácido acético em comparação à fermentação do amido e uma suposta maior capacidade de manter alto pH ruminal (Ben-Ghedalia et al.,

1989), suporta a expectativa de maior gordura no leite em dietas com polpa. Porém, a mudança na relação entre acetato e propionato parece ser uma explicação não suficiente para a resposta observada em teor de gordura no leite em resposta a variação no perfil dos carboidratos dietéticos (Bauman et al., 1970).

A ELI leite foi maior nos tratamentos com milho (TABELA 6). Entretanto, a eficiência de utilização energética, mensurada pela excreção de energia por unidade de CMOD, não variou entre tratamentos. Este fato sugere que o principal determinante do menor desempenho nas dietas com maior inclusão de polpa cítrica foi a queda induzida por este alimento no CMS. O pequeno aumento numérico na relação A/P nas dietas com mais polpa (TABELA 7) parece não ter sido capaz de induzir mudança no metabolismo energético. O consumo de energia líquida para manutenção e produção de leite foi cerca de 2,95 vezes a exigência de manutenção, a última assumida como sendo 0,08 Mcal por kg de peso metabólico (NRC, 2001).

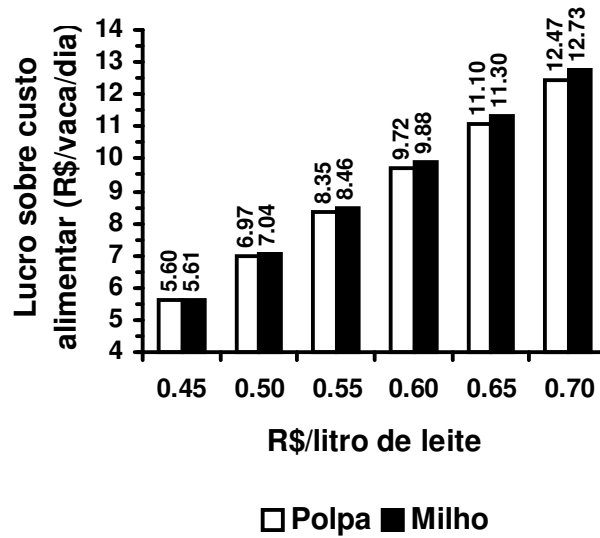
A eficiência financeira das dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica ou com milho foram calculadas assumindo os seguintes parâmetros, respectivamente: CMS, 19,4 e 20,5 kg; produção diária de leite 27,49 e 28,45 kg, teor de proteína 3,17% e 3,22%; teor de gordura 3,64% e 3,65% e CCS 65,5 e 66,9 x 1000 ml⁻¹ (TABELA 6). Dietas com baixo custo unitário são mais vantajosas quanto menor for o preço recebido pelo leite, mas neste tipo de formulação dietética, onde a inclusão de amido de milho no concentrado foi baixa, a redução no custo da polpa de R\$ 0,30 para R\$ 0,25 por kg, com milho cotado a R\$ 0,30, teve pouco impacto sobre o lucro sobre o custo alimentar, independentemente do preço recebido pelo leite (FIGURA 9). O menor custo alimentar por vaca por dia nas dietas com polpa cítrica como energético único (FIGURA 10), resultado dos menores consumo diário e custo por kg de MS, não resultou em aumento no lucro sobre o custo alimentar com relação às dietas com

milho. Quando o teor de sólidos não foi determinante da remuneração do leite, dietas com 10% de milho na MS não induziram aumento acentuado na lucratividade por vaca relativamente à dieta composta exclusivamente por polpa cítrica como concentrado energético único. Dietas formuladas apenas com polpa cítrica eliminam a necessidade de armazenagem e de processamento de milho maduro em fazendas leiteiras ou a compra de milho já processado e podem ser desejáveis ou mesmo necessárias em situações específicas, especialmente aquelas onde o pagamento do leite ainda é baseado exclusivamente no volume diário de produção.

Entretanto, a dieta com inclusão de milho foi mais vantajosa financeiramente quando um sistema de bonificação por qualidade foi adotado para definir o preço do leite (FIGURA 11). Em alto preço de polpa a dieta com milho foi proporcionalmente ainda mais vantajosa que a dieta formulada exclusivamente com polpa cítrica. O valor da produção de leite foi R\$ 0,6435 nos tratamentos com polpa cítrica e R\$ 0,6502 quando milho foi acrescentado à dieta. Considerando que o valor do litro partiu de valores base para o leite de 0,6000 para a dieta só de polpa e 0,6008 para a dieta com milho e que houve constância entre tratamentos no teor de gordura e na CCS, o aumento no teor de proteína no leite foi capaz de aumentar a remuneração por litro em R\$ 0,0059. A renda bruta por vaca por dia foi R\$ 17,69 só com polpa e R\$ 18,50 com a inclusão de milho. Mesmo quando a forrageira utilizada é rica em amido, quando existe remuneração por sólidos no leite, a maior produção de leite e proteína induzida pela inclusão de amido de milho em substituição parcial à polpa cítrica do concentrado pode ser vantajosa financeiramente.

Apesar da meta ter sido a formulação de misturas minerais isonutricionais, a composição analisada das fórmulas orgânica e inorgânica não foi idêntica (TABELA 4). Para todos os macro e microminerais a composição da

a)



b)

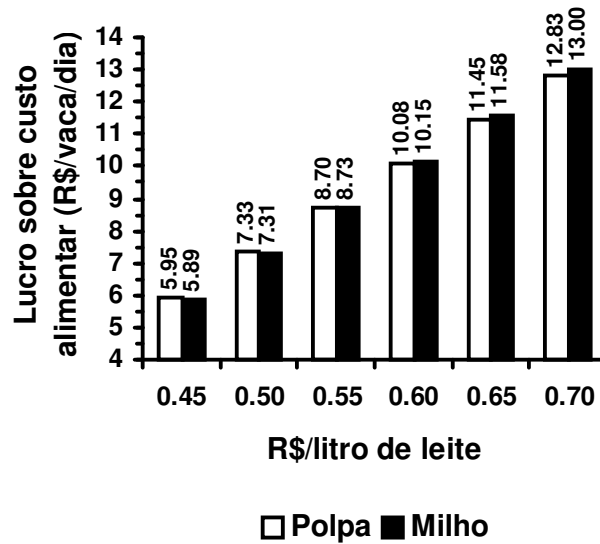


FIGURA 9. Lucro sobre custo alimentar dos tratamentos com 33% de polpa cítrica (Polpa) e dos tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (Milho) com variação no valor recebido pelo litro de leite de R\$ 0,45 a R\$ 0,70. a) Considera polpa cítrica a R\$ 0,25/kg e milho a R\$ 0,30/kg e b) Considera polpa cítrica e R\$ 0,20/kg e milho a R\$ 0,30/kg.

dieta oferecida excedeu as exigências nutricionais mínimas preconizadas pelo modelo nutricional do NRC (2001). Os teores de minerais na MS dietética foram sempre iguais ou superiores a: Ca 1,1%, P 0,42%, Mg 0,25%, K 1,03%, Na 0,41%, Co 0,37 ppm, Cu 29 ppm, Mn 54,8 ppm, Zn 85,6 ppm, Se 0,5 ppm, I 1 ppm e Cr 0,24 ppm. Para os macrominerais Ca e P houve efeito do suplemento mineral utilizado sobre o teor dos nutrientes na dieta. A concentração de Ca na MS dos tratamentos foi: 1,09% na MO, 1,16% na MI, 1,26% na PO e 1,32% na PI, todas capazes de suprir praticamente o dobro da exigência nutricional de Ca. A concentração de P foi: 0,43% na MO, 0,50% na MI, 0,42% na PO e 0,49% na PI, também em excesso à exigência nutricional em todas as dietas.

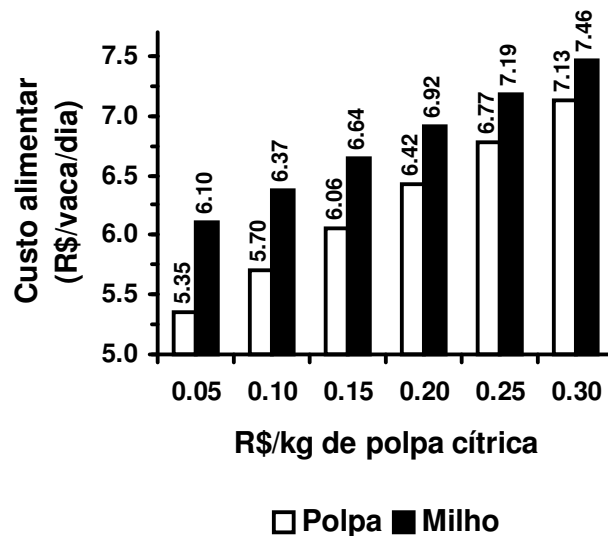


FIGURA 10. Custo alimentar por vaca por dia dos tratamentos com 33% de polpa cítrica (Polpa) e dos tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (Milho) com variação na cotação da polpa cítrica (90,2% de MS) de R\$ 0,05 a R\$ 0,30/kg de matéria natural milho cotado a R\$ 0,30/kg.

Carbonato de cálcio e fosfato bicálcico foram utilizadas como fontes destes minerais, ambas consideradas fontes com alto coeficiente de absorção (NRC, 2001). Dentre os microminerais houve variação entre dietas apenas no teor de Co, Mn e I. A concentração de Co foi: 0,37 ppm na MO, 2,23 ppm na MI, 0,38 ppm na PO e 2,25 ppm na PI. A concentração de Mn foi: 68,9 ppm na MO, 56,8 ppm na MI, 66,9 ppm na PO e 54,8 ppm na PI. A concentração de I foi: 1 ppm na MO, 2 ppm na MI, 1 ppm na PO e 2 ppm na PI. Os microminerais em forma orgânica substituíram sulfatos de Cu, Mn e Zn e selenito de sódio, todas consideradas fontes inorgânicas com alto coeficiente de absorção. Não foi detectado efeito significativo ($P>0,05$) do tipo da mistura mineral sobre as variáveis descrevendo a função ruminal (TABELA 7 e 8). Entretanto, a mistura contendo os minerais orgânicos induziu queda numérica no pH ruminal na dieta só com polpa cítrica e aumento no pH na dieta com adição de milho ($P=0,22$ para a interação entre mineral e carboidrato).

Tendência similar à variação observada no pH ruminal ocorreu para o CMS e para a DFDN (TABELA 5). A queda induzida no pH ruminal foi acompanhada de queda na DFDN na dieta apenas com polpa e o aumento no pH foi acompanhado de aumento na DFDN na dieta com milho, o que faz sentido ($P=0,02$ para a interação entre carboidrato e mineral). Também seguindo esta mesma tendência, a mistura com minerais orgânicos aumentou o CMS na dieta com milho, seguindo o aumento no pH e na DFDN quando mineral orgânico suplementou este tipo de carboidrato, e reduziu o CMS na dieta exclusivamente de polpa cítrica, também seguindo a tendência de queda no pH e na DFDN neste tipo de carboidrato ($P=0,09$ para a interação entre mineral e carboidrato). O mecanismo deste fenômeno não é claro. Esta mesma tendência de mudança não foi observada na degradabilidade *in situ* da MS da silagem de milho, fica impossível deduzir se esta resposta foi decorrente de variação na digestão ruminal da forragem (TABELA 8). A simples variação nos teores dietéticos de

P, Ca, Co, Mn e I, quando da substituição da mistura inorgânica pela mistura contendo orgânicos, aparentemente não explica as interações entre carboidrato e mineral, já que a superioridade ou inferioridade do suplemento orgânico relativamente ao inorgânico ocorreu tanto na dieta com milho quanto na dieta apenas com polpa cítrica.

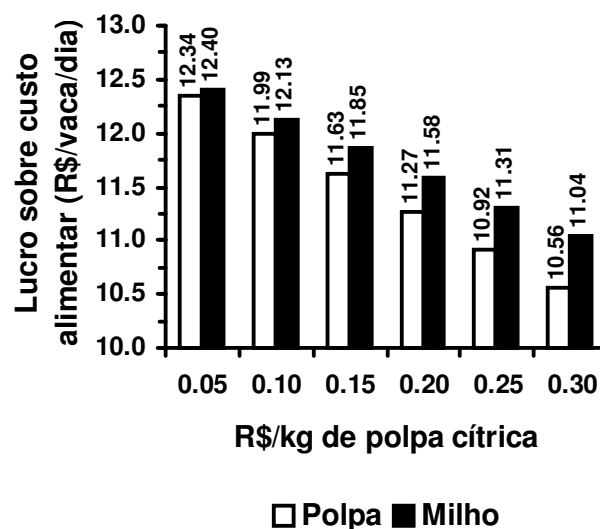


FIGURA 11. Lucro sobre custo alimentar dos tratamentos com 33% de polpa cítrica (Polpa) e dos tratamentos com 10% de milho e 24% de polpa cítrica (Milho) com variação na cotação da polpa cítrica (90,2% de MS) de R\$ 0,05 a R\$ 0,30/kg de matéria natural e milho cotado a R\$ 0,30/kg.

A fórmula inorgânica tendeu a aumentar a DMO ($P=0,12$), a DMO_{onFDN} ($P=0,07$), a produção diária de gordura ($P=0,13$) e a excreção de NEI leite ($P=0,16$) (TABELA 5 e 6). Mesmo considerando que o poder estatístico para detectar diferenças nestas variáveis foi baixo, é impossível concluir se estas decorreram unicamente da mudança nas fontes dos microminerais ou se foram

decorrentes também da mudança conjunta na concentração dietética de vários elementos. A fórmula inorgânica aumentou os teores dietéticos de P, Ca, Co e I e reduziu o teor de Mn. Este fato sugere que a suplementação excessiva com P, Ca, Co e I, a redução no teor dietético de Mn e a simultânea substituição de fontes orgânicas por fontes inorgânicas de Cu, Mn, Se, Zn e Cr aumentou a digestibilidade e a produção diária de energia na forma de gordura. Discorrer sobre os possíveis mecanismos com tantos confundimentos seriam meras especulações.

No trabalho de Ospina et al. (2000) a adição de 10% ou 15% de fontes orgânicas de cobre, zinco, manganês e cromo a uma mistura de fontes inorgânicas aumentou numericamente o CMS e a digestibilidade da MO e da FDN em bezerros alimentados com feno de coast-cross de baixa qualidade. Langwinski et al. (2001) também alimentaram bezerros com feno de coast-cross de baixa qualidade e suplemento protéico com 21% de proteína bruta. Os tratamentos foram 0, 10, 15 e 20% de mistura de minerais orgânicos adicionados à uma mistura mineral inorgânica. Os autores observaram aumento no consumo de feno ($P<0,05$), no consumo de MO digestível ($P<0,10$) e no consumo de FDN ($P=0,14$) com aumento na suplementação com minerais orgânicos. Pode ser que a resposta em consumo e digestibilidade a esta fonte de minerais orgânicos ocorra quando estas fontes substituem parcialmente fontes inorgânicas em dietas com fibra de baixa qualidade. Infelizmente estes autores não relataram as fontes inorgânicas utilizadas nos experimentos, o teor dos elementos minerais nos suplementos e na dieta ou o consumo diário das misturas minerais, o que limita as inferências aos trabalhos.

A comparação entre minerais orgânicos e inorgânicos neste trabalho deve ser interpretada como uma resposta de curto prazo em dietas onde a concentração de todos os minerais foi acima da exigência nutricional e onde fontes orgânicas substituíram completamente boas fontes inorgânicas.

Inferências são provavelmente incorretas para prever a resposta animal de longo prazo, para inferir quanto à substituição de fontes inorgânicas de menor biodisponibilidade por este tipo de fonte orgânica, ou para prever a resposta em dietas onde os teores dietéticos de minerais se aproximam dos limites mínimos de inclusão dietética relativamente à exigência nutricional do animal. Também é importante enfatizar que estes animais não estavam sujeitos a estresse acentuado, pois eram vacas de alta produção que não se encontravam em período peri-parto e foram mantidas em boa condição de manejo nutricional e geral. Em bovinos, respostas positivas à suplementação com fontes orgânicas de microminerais foram observadas em situações de estresse, normalmente associadas a desafios sanitários (Chirase et al., 1991) ou à condição fisiológica própria da vaca leiteira em peri-parto (Hayirli et al., 2001), ou quando fontes orgânicas foram comparadas a fontes inorgânicas de baixa biodisponibilidade (Pereira, 2002).

5 CONCLUSÕES

Não ficou claro o efeito da substituição total de fontes inorgânicas por fontes orgânicas de microminerais devido ao confundimento entre a fonte de suplementos minerais e os teores dietéticos de P, Ca, Co, I e Mn. A substituição de minerais inorgânicos por fontes orgânicas não foi feita em dietas isonutricionais.

A inclusão de milho maduro finamente moído às dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica como concentrado energético aumentou os consumos de MS e de energia, as produções de leite e proteína e não afetou a produção de gordura.

A eficiência de utilização energética não variou entre tratamentos. O determinante do menor desempenho nas dietas com maior inclusão de polpa cítrica parece ter sido a queda induzida por este alimento no CMS.

O mecanismo para o menor consumo nas dietas só com polpa cítrica não envolveu diferenças na degradabilidade ruminal da forragem.

A queda numérica na excreção urinária de derivados de purinas sugere que as dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica podem ter deprimido a síntese ruminal de proteína microbiana.

Quando o pagamento do leite valorizou a produção diária de sólidos, o menor custo das dietas com polpa cítrica como concentrado energético único não se refletiu em maior lucratividade que as dietas com 10% de milho.

Dietas formuladas exclusivamente com polpa cítrica podem funcionar quando o pagamento do leite é feito exclusivamente por volume, mas alguma inclusão de amido de milho parece ser benéfica quando a meta é maximizar o CMS e a produção de sólidos no leite.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, Jul. 2000.
- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 3063-3075, Dez. 1996.
- ALLEN, M. S.; GAWTHORNE, J. M. Effect of molybdenum treatments on the distribution of Cu and metallothionein in tissue extracts from rats and sheep. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 31, n. 3, p. 161-170, 1987.
- AMMERMAN, C. B.; CHICCO, C. F.; MOORE, J. E.; VAN WALLEGHEM, P. A.; ARRINGTON, L. R. Effect of dietary magnesium on voluntary feed intake and rumen fermentations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 9, p. 1288-1293, Set. 1971.
- AMMERMAN, C. B.; HENRY, P. R. Ruminant nutrition: a century of progress. **Cornell Veterinary**, Ithaca, n. 1, p. 174-190, Jan. 1985.
- ANIL, M. H.; FORBES, J. M. Feeding in sheep during intraportal infusions of short-chain fatty acids and the effect of liver denervation. **Journal of Physiology**, London, v. 298, n. 1, p. 407-414, Jan. 1980.
- ARMENTANO, L.; PEREIRA, M. N. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. **Journal of Dairy Science** Champaign, v. 80, n. 7, p. 1416-1425, Jul. 1997.
- ARTHINGTON, J. D.; KUNKLE, W. E.; MARTIN, A. M. Citrus pulp for cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 317-326, Jul. 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITRUS - Abecitrus. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Official Publication of the Association of American Feed Control Officials.** Oxford, IN, USA. 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** Menasha, WI: George Banta Company, 1980.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15^a ed. Menasha, WI: George Banta Company, 1990. v. 1, 648 p.

BATEMAN, H. G.; WILLIAMS, C. C.; GANTT, D. T.; CHUNG, Y. H.; BEEM, A. E.; STANLEY, C. C.; GOODIER, G. E.; HOYT, P. G.; WARD, J. D.; BUNTING, L. D. Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2571-2577, Ago. 2004.

BAUMAN, D. E.; BROWN, R. E.; DAVIS, C. L. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow, and cow. **Archives Biochemistry and Biophysical**, San Diego, v. 140, n. 1, p. 237-244, 1970.

BELIBASAKIS, N. G.; TSIRGOGIANNI, D. Effects of dried citrus pulp on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 1-2, p. 87-92, Jul. 1996.

BEN-GHEDALIA, D.; YOSSEF, E.; MIRON, J.; EST, Y. The effects of starch and pectin rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 3-4, p. 289-298, Jul. 1989.

BESONG, S.; JACKSON, J. A.; TRAMMELL, D. S.; AKAY, V. Influence of supplemental chromium on concentrations of liver triglyceride, blood metabolites and rumen VFA profile in steers fed a moderately high fat diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1679-1685, Jul. 2001.

BHATTI, S. A.; FIRKINS, J. L. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1449-1458, Maio 1995.

BOUCHARD, R.; CONRAD, H. R. Sulfur requirement of lactating dairy cows. I. Sulfur balance and dietary supplementation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 10, p. 1276-1282, Oct. 1973.

BREVES, G.; SCHRODER, B. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 4, p. 125-140, 1991.

BRODERICK, G. A.; MERTENS, D. R.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for milk production by cows fed diets based on alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1767-1776, Jul. 2002.

BURROUGHS, W.; LATONE, W. A.; DEPAUL, P.; GERLAUGH, P.; BETHKE, R. M. Mineral influences upon urea utilization and cellulose digestion by rumen microorganisms using the artificial rumen technique. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 10, n. 3, p. 693-697, 1951.

CECAVA, M. J.; HANCOCK, D. L.; PARKER, J. E. Effects of zinc-treated soybean meal on ruminal fermentation and intestinal amino acid flows in steers fed corn silage-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 3423-3431, Dez. 1993.

CHEN, X. B.; GOMES, J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – Na overview of the technical details. **International Feed Resources Unit**. Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, UK. 1995. 20 p.

CHIRASE, N. K.; HUTCHESON, D. P.; THOMPSON, G. B. Feed intake, rectal temperature, and serum mineral concentrations of feedlot cattle fed zinc oxide or zinc methionine and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 4137-4145, Out. 1991.

CLARK, P. W.; ARMENTANO, L. E. Influence of particle size on the effectiveness of beet pulp fiber. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 898-904, Maio 1997.

Conab. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 12 jan. 2006.

- CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W. Regulation of feed intake in dairy cows. I. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 47, n. 1, p. 54-62, Jan. 1964.
- CORREA, C. E.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, Nov. 2002.
- COSTA, FMJ; SANTOS, J. F.; PEREIRA, M. N. Performance of dairy cows fed ensiled high moisture corn of a flint or a dent hybrid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 184, 2005. Supplement 1.
- COSTA, H. N. **Efeito do ambiente ruminal sobre a degradabilidade in situ da cana-de-acucar**. 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- COTTA, M. A.; RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 226-234, Fev. 1982.
- COTTRELL, D. F.; GREGORY, P. C. Regulation of gut motility by luminal stimuli in the ruminant. In: SYMPOSIUM RUMIANT PHYSIOLOGY: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants, 7., 1991, San Diego, CA. **Proceedings...** San Diego, CA, 1991. p. 3.
- CRICHLLOW, E. C. Ruminal lactic acidosis: forestomach epithelial receptor activation by undissociated volatile fatty acids and rumen fluids collected during loss of reticuloruminal motility. **Research Veterinary Science**, London, v. 45, n. 3, p. 364-368, Nov. 1988.
- CRICHLLOW, E. C.; LEEK, B. F. Forestomach epithelial receptor activation by rumen fluids from sheep given intraruminal infusions of volatile fatty acids. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 47, n. 5, p. 1015-1018, Maio 1986.
- DANFAER, A. Nutrient metabolism and utilization in the liver. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 115-127, Jun. 1994.
- DEHORITY, B. A. Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 99, n. 1, p. 189-196, Jul. 1969.

- DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 69, n. 2, p. 385-396, Mar. 1993.
- DRUDE, R. E.; ESCANO, J. R.; RUSOFF, L. L. Value of complete feeds containing combinations of corn silage, alfalfa pellets, citrus pulp and cottonseed hulls for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 773, 1971.
- DURAND, M.; KOMISARCZUK, S. Influence of major minerals on rumen microbiota. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 2, p. 249-260, Fev. 1988.
- DUSKOVA, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 159-163, Ago. 2001.
- ENTNER, N.; DOUDOROFF, M. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. **Journal of Biology and Chemistry**, Bethesda, v. 196, n. 2, p. 853-862, Maio 1952.
- FEGEROS, K.; ZERVAS, G.; STAMOULI, S.; APOSTOLAKI, E. Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 1116-1121, Maio 1995.
- FRANCIS, G. L.; GAWTHORNE, J. M.; STORER, G. B. Factors affecting the activity of cellulases isolated from the rumen digest of sheep. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 643-649, Nov. 1978.
- FROETSCHER, M. A.; MARTIN, A. C.; AMOS, H. E.; EVANS, J. J. Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2874-2884, Set. 1990.
- GERLOFF, B. J. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3934-3940, Dez. 1992.

GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on *in vitro* fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 10, p. 2762-2768, Oct. 1992.

GRAVERT, H. O. Breeding of dairy cattle. In: GRAVERT, H. O. (ed). **Dairy-cattle production**. Nova York: Elsevier Science Publishing Company, 1987. p.35-76.

GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K. V. V. Trans - octadecaenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, Maio 1998.

GUARDIOLA, C. M.; FAHEY, G. C.; SPEARS, J. W.; GARRIGUS, U. S. The effects of sulfur supplementation on cellulose digestion *in vitro* and on nutrient digestion, Nitrogen – metabolism and rumen characteristics of fed on good quality fescue and Tropical Stars Grass hays. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 129-138, 1983.

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from *in vitro* fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 11, p. 2486-2493, Nov. 2001.

HALL, M. B.; HOOVER, W. H.; JENNINGS, J. P.; WEBSTER, T. K. M. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Science and Food Agriculture**, London, v. 79, n. 15, p. 2079-2086, Dez. 1999.

HALL, M. B.; LEWIS, B. A.; VAN SOEST, P. J.; CHASE, L. E. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fibre. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v. 74, n. 4, p. 441-449, Ago. 1997.

HALL, O. G.; BAXTER, H. D.; HOBBS, C. S. Effect of phosphorus in different chemical forms on *in vitro* cellulose digestion by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 20, n. 4, p. 817-819, Nov. 1961.

HATFIELD, R. D.; WEIMER, P. J. Degradation characteristics of isolated and *in situ* cell wall Lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **Journal of Food and Agricultural**, London, v. 69, n. 1, p. 185-196, Jan. 1995.

HAYIRLI, A.; BREMMER, D. R.; BERTICS, S. J.; SOCHA, M. T.; GRUMMER, R. R. Effect of chromium supplementation on production and

metabolic parameters in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 1218-1230, Maio 2001.

HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. New York, USA: Elsevier Science Publishers, 1988. 527 p.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, Out. 1991.

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2774-2790, Set. 1995.

KALSCHER, K. F.; TETER, B. B.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN RA. Effect of fat source on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 9, p. 2115-2126, Set. 1997.

KENNEDY, L. G.; MITCHELL, G. E.; JR, LITTLE, C. O. Influence of sulfur on in vitro starch digestion by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 32, n. 2, p. 359-363, Fev. 1971.

KNOWLTON, K. F.; GLENN, B. P.; ERDMAN, R. A. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 7, p. 1972-1984, Jul. 1998.

KOENIG, K. M.; RODE, L. M.; COHEN, R. D.; BUCKLEY, W. T. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 817-827, Mar. 1997.

KOMICAZURK-BONE, S.; DURAN, M. Effects of minerals on rumen microbial metabolism. In: JOUANY, J. P. **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion**. Paris: INRA Editions, 1991. p. 179-198.

KOMISARCZUK, S.; DURAND, M.; BEAUMATIN, P.; HANNEQUART, G. Effects of phosphorus deficiency on rumen microbial activity associated with the solid and liquid phases of a fermentor (Rusitec). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 27, n. 5, p. 907-919, Mar. 1987.

KOMISARCZUK, S.; MERRY, R. J.; MCALLAN, A. B. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 57, n. 2, p. 279-290, Mar. 1987.

KOPECNY, J.; HODROVA, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 312-316, Maio 1995.

KUMAR, D. S.; BHATIA, S. K. Rumen metabolic profile, aminotransferases and nutrient utilization in cattle as influenced by dietary nitrogen and sulfur inputs. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v. 55, n. 12, p. 1070-1076, Dez. 1985.

LANGWINSKI, D.; OSPINA, H. **A nutrição de ruminantes e os complexos orgânicos de minerais**. Porto Alegre: Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, 2001. 52 p.

LANGWINSKI, D.; OSPINA, H.; SILVEIRA, A. L. F.; SILVA, N. L. Q.; MONTAGNER, D. Terneiros desmamados precocemente com dois níveis de suplementação e duas formas de sais minerais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 995.

LEE, S. F.; FORSBERG, C. W.; GIBBINS, L. N. Cellulolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 220-228, Ago. 1985.

LEEK, B. F. Digestion in the ruminant stomach. In: SWENSON, M. J.; O. REECE, W. O. (Ed.). **Dukes' physiology of domestic animals**. 11. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1993.

LEIVA, E.; HALL, M. B.; VAN HORN, H. H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p. 2866-2875, Dez. 2000.

LOPEZ-GUISA, J. M.; SATTER, L. D. Effect of copper and cobalt addition on digestion and growth in heifers fed diets containing alfalfa silage or corn crop residues. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 1, p. 247-256, Jan. 1992.

MAROUNEK, M.; BARTOS, S.; BREZINA, P. **Factors influencing the production of volatile fatty acids from hemicellulose, pectin and starch by mixed culture of rumen microorganisms.** Prague: Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology and Genetics, 1985. p. 50-58.

MARSTON, H. R. The requirement of sheep for cobalt or for vitamin B12. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 24 , n. 3, p. 615-633, Set. 1970.

MARTINEZ, A.; CHURCH, D. C. Effect of various mineral elements on in vitro rumen cellulose digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 31, n. 5, p. 982-990, Nov. 1970.

MARTINEZ, J. C. **Substituição do milho moído fino por polpa cítrica peletizada no concentrado de vacas leiteiras mantidas em pastagens de capim elefante durante o outono – inverno.** 2004. Dissertação (Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MCDONALD, P.; SUTTLE, N. F. Abnormal fermentations in continuous cultures of rumen micro-organisms given cobalt-deficient hay or barley as the food substrate. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 56, n. 2, p. 369-378, Set. 1986.

MERTENS, D. R. Nonstructural and structural carbohydrates. In: Van HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management.** Champaign: Ed. American Dairy Science Association, 1992. p. 219-235.

MIRON, J.; YOSEF, E.; BEN-GHEDALIA, D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Wallington, v. 49, n. 5, p. 2322-2326, Maio 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle.** 7. ed. rev. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

OSBORNE, J. M.; DEHORITY, B. A. Synergism in Degradation and Utilization of Intact Forage Cellulose, Hemicellulose, and Pectin by Three Pure Cultures of Ruminant Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 9, p. 2247-2250, Set. 1989.

OSPINA, H.; FREITAS, S. P. G.; MUHLBACH, P. R. F.; PRATES, E. R.; BARCELOS, J. O. J.; PAVONI, T.; CHAVES, L. Efeito de quatro níveis de carboquelatos sobre o consumo e digestibilidade de feno de baixa qualidade em bezerros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. p. 423.

PASTER, B. J.; CANALE-PAROLA, E. *Treponema saccharophilum* sp. nov., a large pectinolytic spirochete from the bovine rumen. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 212-219, Ago. 1985.

PAULSON, G. D.; BAUMANN, C. A.; POPE, A. L. Metabolism of ⁷⁵Se-selenite, ⁷⁵Se-selenate, ⁷⁵Se-selenomethionine and ³⁵S-sulfate by rumen microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 27, n. 2, p. 497-504, Mar. 1968.

PEREIRA, M. N. Minerais orgânicos em dietas para ruminantes. In: II SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2002, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, p. 193 – 206.

PEREIRA, M. N.; VON PINHO, R. G.; BRUNO, R. G. S.; CALESTINE, G. A. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 358-363, Out./Dez. 2004.

PETTIPHER, G. L.; LATHAM, M. J. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cells walls. **Journal Genetics Microbiology**, Reading, v. 110, n. 1, p. 21-27, Jan. 1979.

PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S. E.; YURAWECZ, M. P.; FRITSCHKE, J.; KU, K.; ERDMAN, R. A. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 10, p. 2568-2574, Out. 2000.

RAMANZIN, M.; BAILONI, L.; BITTANTE, G. Solubility, water-holding capacity and specific gravity of different concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 774-781, Mar. 1994.

REES, M. C.; MINSON, D. J. Fertilizer sulphur as a factor affecting voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass (*Digitaria decumbens*)

by sheep. **British Journal Nutrition**, Wallingford, v. 39, n. 1, p. 5-11, Jan. 1978.

RESENDE JÚNIOR, J.C.; PEREIRA, M.N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of Techniques to Determine the Clearance of Ruminal Volatile Fatty Acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 2006 (no prelo).

ROGER, V.; FONTY, G.; KOMISARCZUK-BONY, S.; GOUET, P. Effects of Physicochemical Factors on the Adhesion to Cellulose Avicel of the Ruminal Bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. **Applied Environmental Microbiology** Washington, v. 56, n. 10, p. 3081-3087, Out. 1990.

ROSENDO, O.; MAY, M. B.; STAPLES, C. R.; BATES, D. B. Effects of polysaccharides on fiber digestion kinetics and microbial protein production in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 89, 1999. Supplement 1.

Scot Consultoria. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/>>. Acessado em: 01 fev. 2006.

SCOTON, R. A. **Substituição do milho moído fino por polpa cítrica peletizada e/ou raspa de mandioca na dieta de vacas leiteiras em final de lactação**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SILLEY, P. A note on the pectinolytic enzymes of *Lachnospira multiparus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 145-149, 1985.

SLYTER, L. L.; CHALUPA, W.; OLTJEN, R. R. Response to elemental sulfur by calves and sheep fed purified diets. **Journal of Animal Science** Champaign, v. 66, n. 4, p. 1016-1027, Abr. 1988.

SMITH, D. **Removing and analyzing carbohydrates from plant tissue**. Madson, 1981. (Wisconsin Agricultural Experimentation Station Report, n. R2107).

SOLOMON, R.; CHASE, L. E.; BEN-GHEDALIA, D.; BAUMAN, D. E. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1322-1329, Jun. 2000.

SOMERS, G. F. The affinity of onion cell walls for calcium ions. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 60, n. 10, p. 987-990, Out. 1973.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 151-163, Abr. 1996.

SPEARS, J. W.; HATFIELD, E. E. Nickel for ruminants. I. Influence of dietary nickel on ruminal urease activity. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, n. 6, p. 1345-1350, Dez. 1978.

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 11, p. 2941-2947, Nov. 1986.

TAVARES, A. A. C.; PEREIRA, M. N.; TAVARES, R. T.; CHAVES, M. L. Performance of Holsteins-Zebu cows under partial replacement of corn by coffee hulls. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 95-101, Mar. /Abr. 2005.

TETER, B. B.; SAMPUGNA, J.; KEENEY, M. Milk fat depression in C57Bl/6J mice consuming partially hydrogenated fat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 120, n. 8, p. 818-824, Ago. 1990.

TITGEMEYER, E. C.; BOURQUIN, L. D.; FAHEY, G. C. JR. Disappearance of cell wall monometric components from fractions chemically isolated from alfalfa leaves and stems following *in situ* ruminal digestion. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v. 58, n. 4, p. 451-463, 1992.

TRENKLE, A. E.; CHENG AND BURROUGHS. Availability of different sulfur sources for rumen microorganisms in *in vitro* cellulose digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 17, p. 1191, 1958.

VAN HORN, H. H.; MARSHALL, S. P.; WILCOX, C. J.; RANDEL, P. F.; WING, J. M. Complete rations for dairy cattle. III. Evaluation of protein percent and quality, and citrus pulp-corn substitutions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 8, p. 1101-1108, Ago. 1975.

VAN RYSSSEN, J. B. J.; DEAGEN, J. T.; BEILSTEIN, M. A.; WHANGER, P. D. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1358-1363, Set. /Out. 1989.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 1. Effects on feed intake, chewing behavior, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3542-3552, Nov. 2003.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Comparison of copper lysine and copper sulfate as copper sources for ruminants using in vitro methods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 2994-2998, Oct. 1993.

WEIDNER, S. J.; GRANT, R. J. Altered ruminal mat consistency by high percentages of soybean hulls fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 522-532, Feb. 1994.

WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H.; OLDFIELD, J. E. Selenium, sulfur and nitrogen levels in ovine rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 46, n. 2, p. 515-519, Feb. 1978.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L., TROUTT Jr, H. F., LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, Mar. 1982.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; IISMAA O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 59, n. 3, p. 381-385, Nov. 1962.

WILSON, G. F. Effects of magnesium supplements on the digestion of forages and milk production of cows with hypomagnesaemia. **Animal Production**, East Lothian, v. 31, n. 2, p. 153-157, Oct. 1980.

WITT, K. E.; OWENS, F. N. **Ruminal availability of phosphorus and its effects on digestion**. **Animal Science Research Reproduction**. Oklahoma State University, 1981. p. 151-157.

WITTENBERG, K. M.; BOLIA, R. J.; SHARIF, M. A. Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molybdenum diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 895-904, Set. 1990.

WONSIL, B. J.; HERBEIN, J. H.; WATKINS, B. A. Dietary and ruminally derived trans-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 4, p. 556-565, Abr. 1994.

YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. São Paulo. CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Secretaria do Meio Ambiente do Governo de São Paulo. 2005. 45 p. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

YOUNG, R. **Cobalt in biology and biochemistry**. London: Academic Press, 1979.