

Substituição do milho pela polpa de citros sobre a fermentação ruminal e protozoários ciliados

Keli Arantes Nogueira, José Carlos Machado Nogueira Filho*, Paulo Roberto Leme, Amaury Camilo Valinote, Saulo da Luz e Silva e José Aparecido Cunha

Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13630-000, Pirassununga, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. Foram utilizados, em um delineamento em quadrado latino, 4 novilhos Nelore, com peso médio de $400 \text{ kg} \pm 12 \text{ kg}$, canulados, objetivando-se avaliar os efeitos de níveis de substituição de milho por polpa de citros na fermentação ruminal e no número de protozoários ciliados. Os tratamentos consistiram nos níveis de substituição: 0%, 40%, 60% e 80%, em base seca. Foram mensurados o pH, a concentração de AGV e os protozoários ciliados no rúmen. A inclusão de polpa de citros provocou diminuição linear nos níveis de pH do líquido ruminal ($p < 0,01$), efeito quadrático dos ácidos graxos voláteis totais, de ácido propiônico, ácido butírico e no número total de protozoários ciliados ($p = 0,03$; $p = 0,01$; $p = 0,02$; e $p < 0,01$, respectivamente). Houve aumento linear da relação acetato:propionato ($p = 0,07$). A substituição de milho por polpa de citros favoreceu melhoras no ambiente ruminal até o nível 60%.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, bovinos fistulados, pH, fauna ruminal.

ABSTRACT. Corn substitution by citrus pulp on ruminal fermentation and ciliate protozoa. Four Nellore steers cannulated with average weight of $400 \pm 12 \text{ kg}$ were utilized in a Latin square design, to evaluate the effect of substitution levels of corn by citrus pulp on rumen fermentation. The treatments consisted of substitution levels: (0, 40, 60 and 80%, in the dry matter). The pH, volatile fatty acid and ciliate protozoa of the rumen content were evaluated. The addition of citrus pulp to the diets decreased the pH of rumen liquid ($p < 0.01$) linearly, the quadratic effect of the total volatile fatty acid, of propionic acid, butyric acid and the total ciliate protozoa number ($p = 0.03$; $p = 0.01$; $p = 0.02$; e $p < 0.01$, respectively). There was linear increase of the acetate: propionate ratio ($p = 0.07$). The substitution of corn by citrus pulp improved rumen environment to 60% level.

Key words: volatile fatty acid, cannulated steers, rumen pH, ruminal fauna.

Introdução

A utilização de dietas com alto concentrado visa aumentar a velocidade de ganho de peso e acabamento, diminuindo o tempo de confinamento. A alimentação é a variável de maior impacto no custo de produção de bovinos de corte. Fontes alternativas, como subprodutos industriais, têm sido cada vez mais estudadas e utilizadas para a redução de custos.

A polpa de citros é um subproduto da indústria de suco de laranja e tem sido utilizada no Brasil na alimentação de ruminantes desde a década de 90 (Carvalho, 1995). Por possuir alta quantidade de carboidratos solúveis e de fibra, é considerada alimento intermediário entre volumoso e concentrado (Fegeros *et al.*, 1995). Na composição da parede celular, possui pectina tornando-a

altamente digestível (Fahey e Berger, 1993).

A pectina é um carboidrato que possui fermentação mais extensa no rúmen que o amido (Gillard, 1962); e mais rápida que os demais carboidratos estruturais (Strobel e Russel, 1986; Hatfield, 1987; Ben-Ghedalia *et al.*, 1989). A degradação de alimentos ricos em pectina, comparada a alimentos ricos em amido, promove maior relação acético:propiônico (Mariounek *et al.*, 1985) e mínima produção de ácido lático (Strobel e Russel, 1986). Esses dados explicam o menor decréscimo de pH provocado com a inclusão desse tipo de dieta (Highfill *et al.*, 1987; Carey *et al.*, 1993).

O milho é a fonte de carboidrato solúvel mais utilizada em dietas com bovinos em confinamento. Talvez a inclusão de polpa de citros em substituição à parte do milho favoreça a degradação da ração de

forma a manter um pH mais estável.

Sabe-se que os protozoários ciliados têm ação efetiva na degradação de carboidratos e no engolfamento de amido, principalmente em dietas com alto concentrado. Não se sabe, porém, se a substituição do amido por pectina favorece o crescimento do número de ciliados.

O objetivo desse estudo foi avaliar níveis de substituição de milho por polpa de citros em dietas com alta proporção de concentrado, através das variações nos ácidos graxos voláteis e pH, assim como no número de protozoários ciliados.

Material e métodos

O experimento foi conduzido nas instalações do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, Estado de São Paulo.

Foram utilizados 4 novilhos Nelore, com peso médio de 400 ± 12 kg, dotados de cânulas ruminais. Os animais foram alocados em um galpão experimental coberto, com piso de cimento, presos individualmente em sistema de correntes, com acesso a comedouros e a bebedouros individuais.

A alimentação foi oferecida na forma de dieta total, em quantidade equivalente a 2% do peso vivo, às 8h e às 16h em porções iguais. As sobras foram recolhidas e pesadas diariamente para controle e ajuste da ingestão.

Os tratamentos experimentais consistiram de níveis de substituição do milho pela polpa de citros em 0%, 40%, 60% e 80%, em base seca. As composições percentuais e bromatológica das dietas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Na dieta sem inclusão de polpa de citros, foi utilizado calcário para balancear a quantidade de cálcio necessária. Nas demais dietas, não houve essa adição pelo fato da polpa de citros possuir uma quantidade alta de cálcio.

Tabela 1. Composição percentual das dietas, com diferentes proporções de milho e polpa de citros, na matéria seca.

Ingredientes	Níveis de substituição*			
	0	40	60	80
Milho grão	68,65	41,76	27,55	13,70
Polpa de citros	0,00	27,87	41,40	54,15
Farelo de soja	12,90	13,20	14,00	14,55
Uréia	0,70	0,90	0,90	0,90
Bagaço de cana <i>in natura</i>	15,00	15,00	15,00	15,00
Cloreto de potássio	0,50	0,22	0,10	0,00
Sulfato de amônia	0,05	0,05	0,05	0,05
Calcário	1,20	0,00	0,00	0,00
Sal mineral	1,00	1,00	1,00	1,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

* Porcentagens de polpa de citros em substituição ao milho da dieta.

Tabela 2. Composição bromatológica* das rações em base seca.

Tratamentos**	MS	PB	FB	EE	MM	FDN	FDA
0	89,43	12,95	2,61	3,59	3,28	10,10	6,00
40	89,12	14,00	5,01	2,71	4,81	13,35	13,28
60	89,10	13,24	6,53	2,33	5,67	14,40	17,00
80	89,23	13,66	7,78	2,00	6,08	16,48	18,18

* MS – Matéria seca; PB – Proteína bruta; FB – Fibra bruta; MM – Matéria mineral; FDN – Fibra em detergente neutro; FDA – Fibra em detergente ácido. ** Porcentagens de polpa de citros em substituição ao milho da dieta

Foram realizados 4 períodos experimentais, divididos em 13 dias de adaptação e um dia de colheita de amostras do conteúdo ruminal.

As colheitas foram executadas no 14º dia experimental de cada período, através de bomba de vácuo. O conteúdo ruminal foi captado em kitassato e subamostrado para as diferentes análises. As colheitas foram realizadas às 0h, 2h, 6h, e 8 horas após a alimentação.

A mensuração de pH foi realizada logo após a colheita através de peagâmetro de mesa calibrado com padrões pH 4,0 e pH 7,0.

Uma alíquota de 20 mL de conteúdo ruminal foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de formaldeído a 37% para determinação dos protozoários ciliados. A metodologia utilizada foi a preconizada por Dehority (1977), utilizando-se câmara de contagem de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1 mL. Utilizou-se microscópio ótico comum provido de retículo com área de 0,4362 mm².

Uma subamostra do conteúdo ruminal foi filtrada em filtro simples de 2 mm, sendo a fase líquida utilizada para as determinações de AGV.

Uma alíquota de 5 mL de líquido ruminal foi transferida para frascos de vidro contendo 2 mL de ácido metafosfórico. As amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C para posterior análise. A metodologia utilizada foi a preconizada por Erwin *et al.* (1961), utilizando-se cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gas Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro de 2 m de comprimento x 1/4", empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M. Os gases utilizados foram o nitrogênio, como gás de arraste na vazão de 25 mL/minuto, oxigênio, como gás comburente na vazão de 175 mL/minuto, e hidrogênio, como gás combustível na vazão de 15 mL/minuto. As temperaturas utilizadas para a operação foram, do vaporizador 240°C, da coluna de separação, iniciando-se com 175°C aumentando 10°C por minuto até 205°C e detector de ionização de chamas 260°C. Soluções padrões a 0,1N de ácido acético, propiônico e butírico, foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio KOH a 0,1N, a fim de produzir solução padrão de ácidos graxos voláteis de concentração conhecida.

As determinações foram realizadas injetando-se 1 microlitro de amostra em cromatógrafo, integrado a um computador que processava os cálculos de quantificação, utilizando o software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

O delineamento experimental foi o quadrado latino 4 x 4. Foram realizadas análises de regressão para todos os dados do experimento. Foram testados os efeitos de tratamentos utilizando separação por contraste gerado pelo Proc GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 1988).

Resultados e discussão

Os valores médios do pH ruminal, os ácidos graxos voláteis e número total de protozoários estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias dos dados de fermentação e protozoários ciliados do rúmen de novilhos Nelore.

	Tratamento ¹				Probabilidade		
	0	40	60	80	CV	Linear	Quadrática
pH	7,00	6,69	6,38	6,62	8,55	<0,01	0,10
AGV _{total} ²	46,71	77,90	98,29	90,06	49,34	<0,01	0,03
Acético ²	63,34	67,25	66,22	66,49	9,36	0,15	0,27
Propiônico ²	28,31	22,58	21,54	24,89	25,85	0,01	0,01
Butírico ²	9,63	10,14	12,25	8,62	39,19	0,58	0,02
A:P ³	2,41	2,82	2,98	2,77	28,35	0,07	0,14
Protozoários ⁴	43,20	86,48	87,67	78,52	47,8	<0,01	<0,01

¹ Porcentagens de polpa de citros em substituição ao milho da dieta. ² Concentração dos ácidos graxos (mM). ³ Proporção acético:propiônico. ⁴ Número total de protozoários (x 10³/mL).

O pH do líquido ruminal diminuiu linearmente (<0,01) com a inclusão de polpa do citros na dieta. O tratamento sem polpa foi o que apresentou valores de pH mais elevados, semelhante ao relatado por Pinzon e Wing (1976), que estudaram a inclusão 0%, 19%, 38% ou 55% de polpa de citros na dieta e verificaram redução do pH com aumento do nível de inclusão da polpa na dieta. Em contrapartida, Highfill *et al.* (1987) não verificaram diferenças no pH ruminal em vacas alimentadas com dietas de feno suplementadas com milho e polpa de citros.

O pH também diminuiu linearmente (p<0,05) com o tempo de amostragem (Figura 1), possivelmente decorrente da fermentação e da degradação do alimento.

De acordo com Van Soest (1994), dietas contendo polpa de citros apresentam queda do pH, bem como alta taxa de degradação da pectina (30 a 50%/hora).

Foi observado efeito quadrático (p=0,028) dos tratamentos sobre a concentração molar de ácidos graxos totais. A dieta com 60% de substituição de milho por polpa resultou em maior valor. O incremento na quantidade total de ácidos graxos voláteis pode explicar a redução do pH com a

inclusão da polpa na dieta. Possivelmente a adição da polpa tenha beneficiado a eficiência microbiana aumentando a fermentação no rúmen.

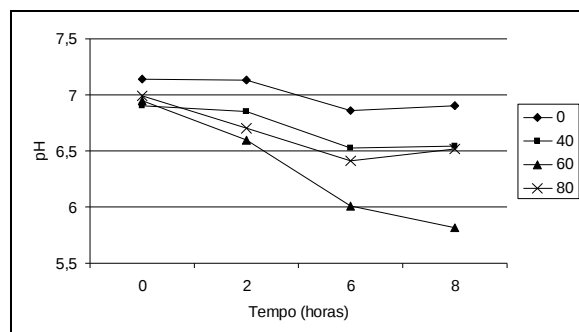


Figura 1. Efeitos de níveis crescentes de polpa de citros sobre o pH no líquido ruminal em diferentes horários.

Houve efeito quadrático significativo (p=0,003) de tempo de amostragem aumentando em média de 61,35 mM na colheita de tempo 0 hora para 83,03 mM em 8 horas após a alimentação (Figura 2).

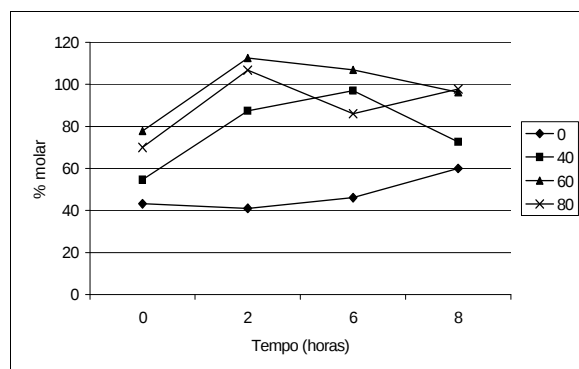


Figura 2. Efeitos de níveis crescentes de polpa de citros sobre a concentração molar total de ácidos graxos voláteis no líquido ruminal.

Não houve efeito significativo de tratamento ou tempo de amostragem na concentração de ácido acético (p>0,10); entretanto é possível observar maiores valores absolutos nos tratamentos com polpa. Esperava-se maior produção de ácido acético com a redução do milho, devido ao conseqüente aumento de FDN e FDA. Alguns autores têm associado a presença de polpa de citros na dieta com maiores concentrações de acetato ruminal (Schaibly e Wing, 1974; Highfill *et al.*, 1987).

A inclusão de polpa na dieta influenciou de forma quadrática (p<0,01) a concentração de ácido propiônico, reduzindo sua percentagem até 60% de substituição, com um pequeno aumento no tratamento 80%.

O tempo após a alimentação também afetou a produção de ácido propiônico (p=0,01), atingindo a

maior média duas horas após a alimentação, com valor de 27,21 mM (Figura 3). Após esse horário, há diminuição na quantidade de amido, pela fermentação dele, com conseqüente redução da quantidade de propionato.

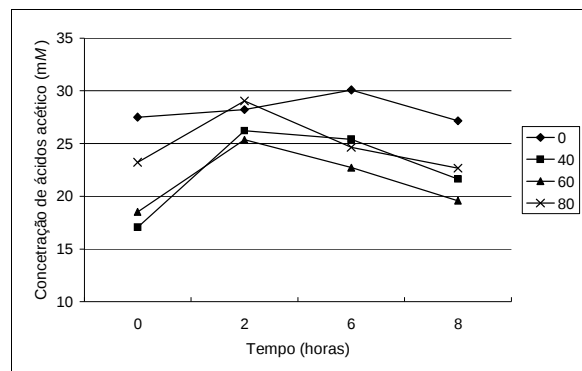


Figura 3. Efeitos de níveis crescentes de polpa de citros sobre a concentração molar total de ácido propiônico no líquido ruminal.

A dieta com milho sem adição de polpa de citros apresentou a maior concentração de ácido propiônico, conforme o esperado, pois dietas com alto teor de amido estão associadas à maior produção de propionato (Stern e Ziemer, 1993).

Houve efeito quadrático na concentração de ácido butírico em função do nível de substituição ($p=0,02$). No entanto não foi observado um efeito significativo de tempo de amostragem.

Embora não tenha havido diferença entre os tratamentos em relação ao ácido acético, a alteração nas proporções de ácido propiônico causou tendência de aumento linear ($p=0,073$) na proporção acetato/propionato à medida que aumentou o nível de substituição do milho por polpa. Esses resultados concordam com Mariounek *et al.* (1985), Highfil *et al.* (1987), Durand *et al.* (1988) e Ben-Ghedalia *et al.* (1989), que relataram que a inclusão de polpa de citros na dieta cria condições favoráveis para degradação da celulose no rúmen, traduzida pela maior relação acetato/propionato. Rocha Filho *et al.* (1999), trabalhando com vacas lactantes alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por polpa de citros ou milho, assinalam que o padrão de fermentação da polpa de citros é similar ao das forragens, dado que sua inclusão resulta em mudanças favoráveis no ambiente ruminal, aumentando a atividade microbiana e, por conseguinte, a produção total de ácidos graxos voláteis.

Não foi observado efeito do tempo de amostragem para a taxa de acético:propiônico.

A substituição do milho pela polpa de citros

resultou em efeito quadrático ($p<0,05$) no número total de protozoários ciliados, sendo que o maior número de células foi observado no tratamento 60%. Esses resultados estão de acordo com os observados por Nogueira Filho *et al.* (1999) trabalhando com tourinhos cruzados, alimentados com bagaço de cana e polpa de citros em dietas com elevada proporção de concentrado, onde encontraram o valor total de protozoários próximos aos níveis de 40% e 60% de substituição de milho pela polpa de citros, utilizados neste trabalho. Por serem os protozoários responsáveis por boa parte da degradação da fibra em dietas contendo alta proporção de concentrado, os valores encontrados nesse ensaio podem justificar o aumento no número de ciliados nas dietas com inclusão de polpa de citros.

No entanto resultados diferentes foram relatados por Franzolin *et al.* (2000), os quais concluíram que a substituição de milho por polpa de citros promoveu a diminuição na concentração total de protozoários ciliados no rúmen de bubalinos, contrariando a hipótese de que a fibra da polpa favoreceria o aumento no número de protozoários. Talvez em condições similares de pH, o amido seja melhor utilizado pelos protozoários como fonte de energia que a fibra.

O número de protozoários não foi influenciado pelo tempo de amostragem (Figura 4).

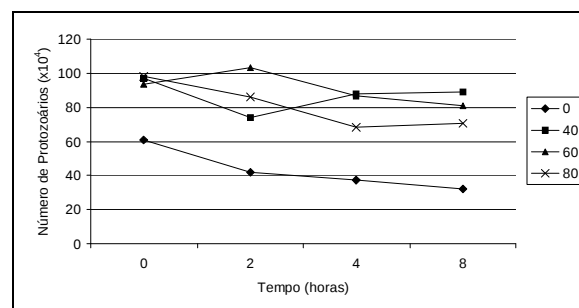


Figura 4. Efeito de níveis crescentes de polpa de citros sobre o número total de protozoários ($\times 10^4$ por mL) em diferentes tempos no líquido ruminal.

O aumento na quantidade de protozoários ciliados em animais recebendo dietas com polpa de citros pode favorecer a degradação da dieta pelo aumento da digestão ruminal da fibra, permitindo que a eficiência energética não seja comprometida pela redução da quantidade de amido.

A substituição do milho pela polpa de citros até o nível de 60% melhorou o ambiente ruminal, conforme pode ser verificado pelo aumento da produção de ácidos graxos voláteis e do número total de protozoários. A redução nas concentrações de AGV e no número de ciliados no tratamento com

80% indica que, a partir de 60% de substituição, pode haver um efeito negativo no ambiente ruminal.

Conclusão

A inclusão dos níveis crescentes de polpa de citros em substituição ao milho em dietas com elevada proporção de concentrado oferecida a animais da raça Nelore resultou em aumento dos ácidos graxos voláteis totais, em decréscimo de ácido propiônico, em aumento da relação acetato:propionato, e em aumento do número total de protozoários ciliados.

O padrão de fermentação verificado, assim como o número de protozoários ciliados, indicam que a substituição em até 60% do milho pela polpa de citros nas dietas oferecidas a animais da raça Nelore resultou em mudanças favoráveis no ambiente ruminal.

Referências

- BEN-GHEDALIA, D. *et al.* The effects of starch-and-pectin rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 24, p. 289-298, 1989.
- CAREY, D. A. *et al.* Influence of energy source on forage intake, digestibility in situ forage degradation, ruminal fermentation in beef steers fed medium-quality Bromegrass hay. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 71, p. 2260-2269, 1993.
- CARVALHO, M. P. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. Citros. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6., 1985, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 1995.
- DEHORITY, B. A. *Classification and morphology of rumen protozoa*. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 82 p., 1977.
- DURAND, M. *et al.* Use of the rumen simulation technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various by products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 21, p. 197-204, 1988.
- ERWIN, W. S. *et al.* Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 44, p. 1768-1771, 1961.
- FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, D. C. (Ed.). *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 305-337.
- FEGEROS, K. *et al.* Nutritive value of dried citrus pulp and its effects on milk yield and milk composition of lactating ewes. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 78, p. 1116-1121, 1995.
- FRANZOLIN, R. *et al.* Efeito de dietas com polpa cítrica em substituição ao milho em grãos no concentrado sobre a degradabilidade e a fauna ruminal em bubalinos. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2109-2118, 2000.
- GILLARD, B. D. E. The relationship between the cell-wall constituents of roughages and their digestibility of the organic matter. *J. Agric. Sci.*, Cambridge, v. 59, p. 369-373, 1962.
- HATFIELD, R. D. Pectin polysaccharides of forages and their degradability. *Agron. J.*, Madison, v. 81, p. 39-46, 1987.
- HIGHFILL, B. D. *et al.* Effects of high fiber energy supplements on fermentation characteristics and in situ digestibilities of low quality fescue hay. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 65, p. 224-234, 1987.
- MARIOUNEK, M. *et al.* Factors influencing the production of volatile fatty acids from hemicellulose, pectin and starch by mixed culture of rumen microorganisms. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, Hamburg, v. 53, p. 50-58, 1985.
- NOGUEIRA FILHO, J. C. M. *et al.* Bagaço de cana-de-açúcar em dietas com alto concentrado para bovinos jovens. 2. Protozoários ciliados no rúmen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SBZ, 1999.
- PINZON, F. J.; WING, J. M. Effects of citrus pulp in high urea rations for steers. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 59, p. 1100, 1976.
- ROCHA FILHO, R. R. *et al.* Citrus and corn pulp related to rumen volatile acid production. *Sci. Agric.*, Piracicaba, v. 56, p. 471-477, 1999.
- SAS. *Sas User's Guide*. 8. ed. Cary. N.C.: Sas Institute Inc., 1988.
- SCHAIBLY, G. E.; WING, J. M. Effects of roughage concentrate ratio on digestibility and rumen fermentation of corn silage-citrus pulp rations. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 38, p. 697-701, 1974.
- STERN, M. D.; ZIEMER, C. J. Consider value, cost when selecting nonforage fiber. *Feedstuffs*, Minnetonka, v. 11, p. 14, 1993.
- STROBEL, H. J.; RUSSEL, J. B. Effects of pH and energy spilling on bacterial proteins synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 69, p. 2941-2947, 1986.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

Received on June 02, 2004.

Accepted on February 09, 2005.