

## Efeitos da administração de uréia protegida sobre a população de protozoários ciliados em rúmen de cordeiros

José Carlos Machado Nogueira Filho<sup>1\*</sup>, Evaldo Antonio Lencioni Titto<sup>1</sup>, Maria Ely Miserochi de Oliveira<sup>2</sup>, Denise de Souza Ablas<sup>1</sup> e Tatiana Sá Barreto Miserochi de Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias, Norte, C.P. 23, 13.630-000, Pirassununga-São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-São Paulo, Brazil. \*Author for correspondence. e-mail: jocamano@usp.br

**RESUMO.** Doze ovinos machos da raça Hampshire Down, com peso médio 29,37 kg ( $\pm 3,89$  kg) e 6 meses de idade, foram utilizados em um experimento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, à base de feno de capim *Andropogon*, farelo de soja e rolão de milho (GPS), em diferentes proporções. Os níveis protéicos foram fornecidos com 100% das exigências do NRC (rações A e B) e 70% (rações C e D). Aos tratamentos B e C foram acrescentados 18g de uréia protegida. Amostras do líquido ruminal foram colhidas no último dia de ensaio de digestibilidade, uma hora após a oferta de alimentos. A presença de uréia estimulou a divisão dos ciliados entodimomorfos (tratamentos B e C,  $p \leq 0,01$ ). Os valores médios dos ciliados foram  $49,54 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  e  $39,02 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  respectivamente para os tratamentos com e sem uréia. Os resultados permitiram concluir que a inclusão de doses de até 18 g de uréia protegida não causou prejuízos metabólicos aos animais.

**Palavras-chave:** ovinos, protozoários ciliados (Ciliophora), rúmen, uréia.

**ABSTRACT.** Effect of protected urea feeding on ciliated rumen protozoa population of lambs. Twelve male Hampshire Down lambs, average weight 29,37 kg ( $\pm 3,89$  kg) and 6 months old, were used in a trial with 4 handlings, using *Andropogon* grass hay, soy meal and (GPS) at different rates. 18 g of protected urea were added to handlings B and C. Protein levels were given at 100% of NRC requirements (A and B rations) and at 70% (C and D rations). Ruminal fluid samples were obtained at the last day of the trial, one hour after the feeding of animals. Urea stimulated the division of entodimomorphous ciliates (handlings B and C,  $p \leq 0,01$ ). Average values for ciliates were  $49,54$  and  $39,02 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  respectively for handlings with and without urea. Results show that included quantities of 18 g of protected urea failed to induce metabolic disorder in animals.

**Key words:** lambs, ciliate protozoa (Cilliophora), rumen, urea.

Os microrganismos ruminais obtêm a energia necessária para a sua manutenção e crescimento a partir da fermentação de carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose e pectinas) e solúveis (açúcares e amido).

Os protozoários ciliados constituem parte substancial do sistema ecológico do rúmen, desempenhando funções bioquímicas e fisiológicas importantes para a economia dos ruminantes. Em determinadas circunstâncias de alimentação e localização geográfica, podem representar mais de 75% da massa total de microrganismos presentes no

rúmen-retículo (Harrison e McAllan, 1980; Church, 1974).

A presença de quantidades importantes de protozoários ciliados no rúmen incrementa consideravelmente a renovação do N ruminal, descendendo significativamente a eficiência de síntese (Ushida *et al.*, 1990). A oferta de quantidades moderadas de concentrado incrementa a presença de ciliados no rúmen (Harrison e McAllan, 1980), ainda que quantidades elevadas acelerem os processos de fermentação propiônica; incrementa-se a láctica, decrescendo o pH e, conseqüentemente,

ocorre uma diminuição drástica de protozoários ciliados ou mesmo uma defaunação no meio (Mackie, 1987).

A importância quantitativa de protozoários ciliados na biomassa ruminal dependerá da dieta alimentar. Quando o conteúdo protéico do alimento é baixo, a quantidade de proteína microbiana disponível para o animal hospedeiro pode decrescer pelo aumento significativo de protozoários ciliados no rúmen (Bird *et al.*, 1979), e com a presença de conteúdos adequados de proteína na ração, os ciliados participam na degradação da proteína dietética (Nugent e Morgan, 1981), contribuindo na liberação para o meio ruminal de compostos intermediários como peptídeos, aminoácidos e N-amoniaco (Ushida *et al.*, 1990), colaborando para a estabilização da fermentação ruminal e exercendo uma ação tamponadora à acidez ruminal (Jouany e Ushida, 1990).

Campos e Rodrigues (1984) preconizam que a eficiência da utilização da uréia, em rações para ruminantes, será maior quando a amônia for o primeiro fator limitante para a síntese de proteína microbiana. Assim, a utilização será maior em dietas com baixo nível de proteína e que contenham altos níveis de energia, minerais e outros componentes que aumentam a atividade microbiana no rúmen.

Nogueira Filho *et al.* (2000) concluíram que utilizando dieta basal de silagem de cana-de-açúcar, níveis crescentes de uréia aumentam a concentração de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. Kuimov *et al.* (1982) e Belogradov (1981), todos trabalhando com ovinos, notaram que aumentava o número de protozoários ciliados, quando feno, gramíneas ou suplementos protéicos eram substituídos parcialmente por uréia na dieta dos animais.

Apesar de tudo, parece que os protozoários ciliados não são essenciais para o funcionamento normal do rúmen-retículo e sua presença tende a reduzir a eficiência energética do metabolismo protéico. Mesmo assim seria um fator de estabilidade da fermentação ruminal, com indubitáveis vantagens em condições práticas de alimentação.

O propósito deste trabalho foi detectar as concentrações de protozoários ciliados no rúmen de cordeiros, quando partes das exigências protéicas das dietas foram substituídas por uréia protegida.

## Material e métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São

Paulo, no *Campus* Administrativo de Pirassununga, Estado de São Paulo.

Foram utilizados 12 ovinos machos não-emasculados da raça Hampshire Down, puros de origem, com peso médio de 29,37 kg ( $\pm 3,89$  kg) e com idades de 6 meses.

Os animais foram sorteados em um delineamento experimental, inteiramente casualizado (Gomes, 1972), totalizando 3 repetições por tratamento, para 4 rações, todas compostas de feno de capim andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth), farelo de soja e rolão (GPS: grão, palha e sabugo) de milho, em diferentes proporções, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das rações experimentais

Ingrediente	Rações experimentais (%)			
	A	B	C	D
Feno de andropogon	20	20	20	20
Farelo de Soja	31	22	6	16
Rolão de milho	49	58	74	64
Uréia (g)	-	18	18	-

A ração D serviu como testemunha negativa e a ração A como testemunha. As rações B e C implicaram em dois níveis de equivalente protéico que atenderam às exigências dos animais, segundo o NRC (1985) em 100 e 70%, respectivamente.

Todos os animais receberam mistura mineral na quantia de 42 g/cabeça/dia, na seguinte composição por kg: P-70 g; Ca-87 g; Mg-2.600 mg; Mn-1.200 mg; Fe-1.300 mg; Zn-2.580 mg; Cu-300 mg; Co-200 mg; I-195 mg; Se-9 mg; S-4 g e NaCl-320 g. Os cordeiros dos tratamentos B e C receberam 18 g de uréia protegida\*, acrescida à mistura mineral diária, totalizando 60 g de suplemento adicionado à ração na hora do fornecimento.

Os cordeiros permaneceram em baias individuais por um período de 30 dias, passando a receber as respectivas dietas "à vontade", sempre às 09 horas, até a detecção do consumo voluntário individual, e então foram submetidos a ensaio de digestibilidade em gaiolas de metabolismo.

Amostras dos líquidos ruminais foram efetuadas no último dia do experimento de digestibilidade, uma hora após o arraçoamento, através de sonda esofágica. O conteúdo colhido (30-40 ml) era depositado em um balão *kitasato*, e uma parcela de 10 ml, transferida para um tubo de ensaio com 20 ml de formaldeído diluído em água destilada a 1:2. O tubo

\* Uréia Protegida, produto patenteado, da empresa CVA Zootecnia Ltda; uréia com revestimento para retardar a hidrólise no rúmen. Apresentada misturada ao suplemento mineral, na base de 300g de uréia por kg de mistura, ou 780g de equivalente protéico por kg (41,6% de N na uréia).

de ensaio era agitado imediatamente, com o propósito de fixar os protozoários ciliados. O pH da amostra foi mensurado no momento da colheita, utilizando-se de peagâmetro digital portátil.

O material obtido ficava em repouso por uma noite antes de ser submetido a uma diluição 1:20 em solução de glicerol a 30% em água destilada. O "verde-brilhante" foi o corante utilizado (Dehority, 1977).

Uma alíquota de 1 ml do material era transferida para uma câmara de Sedgwick-Rafter, para contagem diferencial dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Polyplastron*.

Procedeu-se à análise de variância dos dados e as médias foram comparadas pelo teste f.

### Resultados e discussão

A Tabela 2 mostra a análise químico-bromatológica e o equivalente protéico das rações, incluindo o nitrogênio não protéico (NNP).

**Tabela 2.** Análise químico-bromatológica da mistura oferecida aos ovinos e equivalente protéico

Nutriente	Tratamento (%)			
	A	B	C	D
Matéria Seca	88,10	88,31	87,58	87,68
Proteína Bruta*	21,86	18,10	13,25	16,97
Fibra Bruta*	14,85	15,43	14,85	13,32
Extrato Etéreo*	2,41	2,45	3,04	2,72
Extrativos Não Nitrogenados**	56,09	59,72	65,23	63,25
Matéria Mineral*	4,79	4,30	3,63	3,74
Equivalente Protéico	21,86	22,78	17,93	16,97

\*Resultados em 100% de matéria seca; \*\*Calculados por diferença na matéria seca

Os níveis protéicos foram fornecidos nos níveis de 100% das exigências do NRC (1985) (rações A e B) e 70% (rações C e D).

A Tabela 3 revela o número médio de protozoários ciliados por ml de líquido ruminal em cada tratamento.

**Tabela 3.** Número médio de protozoários ciliados por mililitro de líquido ruminal em cada tratamento ( $\times 10^3$  ml<sup>-1</sup>)

Tratamentos	Protozoários Ciliados/ml
A	42,78 $\times 10^3$ /ml ( $\pm 0,38 \times 10^3$ /ml)
B	56,61 $\times 10^3$ /ml ( $\pm 0,69 \times 10^3$ /ml)**
C	42,47 $\times 10^3$ /ml ( $\pm 0,71 \times 10^3$ /ml)**
D	35,25 $\times 10^3$ /ml ( $\pm 0,96 \times 10^3$ /ml)

C.V. (%) = 1,635; \*\*p  $\leq$  0,01

Pela análise da Tabela 3 verifica-se que houve diferença significativa (p  $\leq$  0,01) entre tratamentos com e sem uréia protegida, em ambos os níveis (100% e 70%), sempre com valores mais elevados para os tratamentos com uréia (valores médios de  $49,54 \times 10^3$  ml<sup>-1</sup> com uréia contra  $39,02 \times 10^3$  ml<sup>-1</sup> sem uréia).

A Tabela 4 mostra a composição genérica percentual dos protozoários ciliados do rúmen por tratamento.

**Tabela 4.** Composição genérica percentual dos protozoários ciliados do rúmen por tratamento

Gênero	Tratamento (%)			
	A	B	C	D
<i>Entodinium</i> spp	93,75	93,63	92,11	94,15
<i>Diplodinium</i> spp	3,81	3,97	4,55*	3,86
<i>Epidinium</i> spp	0,60	0,64	0,73*	0,58
<i>Polyplastron</i> spp	0,56	0,70	0,91*	0,55
<i>Isotricha</i> spp	0,49	0,53	0,76*	0,54
<i>Dasytricha</i> spp	0,79	0,53	0,94*	0,32
Total	100	100	100	100

\* p  $\leq$  0,05

Kuimov *et al.* (1982) e Belogradov (1981), ressaltaram que a presença de uréia nas rações de ruminantes estimulam a divisão celular dos pequenos ciliados entodiniomorfidas (*Entodinium* spp), em detrimento dos grandes gêneros de ciliados. Pela Tabela 4 nota-se que as porcentagens de *Entodinium* spp foram superiores a 90%, o que vem ao encontro dos dados observados por Nogueira *et al.* (2000), quando trabalharam com ovinos alimentados com silagem de cana-de-açúcar suplementada com níveis crescentes de uréia, onde observaram concentrações superiores a 80% de *Entodinium* spp.

As medidas de pH do líquido ruminal não mostraram diferenças (p > 0,05) entre tratamentos nos níveis em que a uréia foi oferecida aos ovinos, mesmo com quantidades elevadas de concentrado nas rações, que não provocaram diminuição do pH, contrariando as afirmações de Harrison e McAllan (1980) e Mackie (1987).

A ração C (Tabela 4), com apenas 70% das exigências protéicas preconizadas pelo NRC (1985), apresentou concentrações de ciliados dos gêneros *Diplodinium*, *Epidinium*, *Polyplastron*, *Isotricha* e *Dasytricha*, significativamente (p < 0,05) mais elevadas que a ração A, provavelmente pela quantidade de proteína microbiana estar aquém das necessidades dos animais (Bird *et al.*, 1979), e pelo efeito positivo da degradação lenta da uréia protegida, fato este também detectado quando se compara com a ração B, onde provavelmente o efeito da uréia foi menor que na ração C.

Neste trabalho, a população de bactérias pode ter sido significativa, nos tratamentos B e C devido à deficiência de enxofre. Tal fato poderia explicar o maior número de protozoários naquelas dietas.

### Referências bibliográficas

Belogradov, I.G. Urea in diets for ewes. *Ovtsevodstvo*, 8:23-24, 1981

- Bird, S.H.; Hill, N.K.; Leng, R.A. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein high-energy diets. *Brit. J. Nutr.*, 42:81-87, 1979.
- Campos, O.F.; Rodrigues, A.A. Uréia para bovinos em crescimento. In: ANAIS DO SEMINÁRIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS: URÉIA PARA RUMINANTES, 2, 1984, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: Fealq, 1984, p.142-173.
- Church, D.C. *Fisiología digestiva y nutrición de los ruminantes*. Zaragoza: Ed.Acribia, 1974. 379p. v.1.
- Dehority, B.A. *Classification and morphology of rumen protozoa*. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977. 82p.
- Gomes, F.P. *Curso de estatística experimental*. Ed. Nobel, 1972. 430p.
- Harrison, D.G.; McAllan, A.B. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen. In: Ruckebusch, Y.; Thivend, P. (eds.) *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Lancaster: Reino Unido, M.T.P. Press, 1980. p.205-226.
- Jouany, J.P.; Ushida, K. Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: Moshino, S.; Onodera, R.; Minato, H.; Iwabashi, H. (eds.). *The rumen ecosystem*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, Pringer-Verlag, 1990. p.139-150.
- Kuimov, D.K.; Mikhailenko, V.K.; Larskaya, L.V.; Tituzov, I.G.; Usacheva, V.A.; Afanasenko, V.M. Effect of feeding urea concentrate on the physiological state of sheep. *Sel'Skokhozaistvennaya Biologiya*, 17:256-259, 1982.
- Mackie, R.J. Microbial digestion of forages in herbivores. In: Hacker, J.B.; Ternouth, J.H. (eds.). *The nutrition of herbivores*. 1987. p.233-265.
- Nogueira Filho, J.C.M.; Zanetti, M.A.; Oliveira, M.E.M.; Cunha, J.A. Efeitos de níveis crescentes de uréia na dieta de ovinos da raça Ideal sobre a população de protozoários ciliados do rúmen. *Ars Veterinária*, Jaboticabal. (no prelo)
- N.R.C. *Nutrient requirements of sheep*. National Academy Press, 6.ed. Washington, DC., 1985. 99p.
- Nugent, J.H.A.; Morgan, J.L. Characteristics of the rumen proteolysis on fraction I (185) leaf protein from lucerne (*Medicago sativa*). *Brit. J. Nutr.*, 37:333-343, 1981.
- Ushida, K.; Kayouli, C.; Desmet, S.; Jouany, J.P. Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *Brit. J. Nutr.*, 64:765-775, 1990.

Received on May 11, 2000.

Accepted on July 28, 2000.