

SUPLEMENTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS DE CADEIAS RAMIFICADAS SOBRE A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA

Paulo Sergio Dornelas Silva^{1*}; Jardeson de Souza Pinheiro¹; Adailton Camêlo Costa¹; Nathália Veloso Trópia¹; Dhones Rodrigues de Andrade¹; Rogério de Paula Lana¹

¹Departamento de Zootecnia/Universidade Federal de Viçosa

paulo.dornelas@ufv.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas (AGVCR), em uma dieta com relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na matéria seca (MS), sob a proteína microbiana (Pmic), o pH, o nitrogênio amoniacal (NH₃-N) e proteína solúvel (PS) *in vitro*. O experimento comparou o efeito da suplementação com AACR (0,6% na MS) e AGVCR (1,3% na MS). As dietas experimentais foram incubadas em frascos tipo penicilina (60 mL) por 6, 9, 12, 24, e 48 horas. A Pmic, o pH, N-NH₃ e PS foram analisados conforme um delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 5, três tratamentos e cinco time points pelo PROC MIXED do SAS. Para as comparações das médias foi utilizado o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% e probabilidade para o erro tipo I. A suplementação com AACR e AGVCR geraram efeito de tempo de incubação ($P < 0,050$) para Pmic, pH e PS. A concentração de N-NH₃ foi influenciada pela interação ($P = 0,027$). Em conclusão, a suplementação com AACR ou AGVCR não maximizaram o aumento de Pmic.

Palavras-chave: Celulolíticas.Desaminação. Forragem tropical. Isoácidos.

INTRODUÇÃO

O conhecimento do ambiente ruminal permite que modulações sejam realizadas no ecossistema e, através dessas alterações, é possível obter maior eficiência na fermentação da dieta e melhorar o desempenho produtivo dos ruminantes. Uma das formas de alterar esse ambiente é atendendo as necessidades nutricionais dos microrganismos (Russell, 2002). Nesse aspecto, os aminoácidos de cadeias ramificadas (AACR), valina, leucina e isoleucina, atuam no funcionamento das vias metabólicas dos microrganismos que compõem o ecossistema ruminal, podendo sua deficiência levar à menores taxas de crescimento microbiano (Roman-Garcia et al., 2021). A principal fonte de AACR do ecossistema ruminal vem da proteína degradável no

rúmen (PDR) oriunda da dieta. Segundo Roman-Garcia et al. (2021), forrageiras tropicais apresentam baixas concentrações de AACR em sua composição, sendo assim, dietas com alta relação volumoso:concentrado podem gerar uma deficiência desses aminoácidos no ambiente ruminal, comprometendo o crescimento microbiano no rúmen.

No entanto, nem todos os microrganismos conseguem absorver diretamente esses aminoácidos e utilizá-los em suas vias metabólicas. Especificamente, a maioria das cepas das bactérias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*) responsáveis pela degradação dos carboidratos estruturais da parede celular vegetal. Elas requerem ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas (AGVCR) como precursores para a biossíntese dos AACR, aldeídos e para incorporar em ácidos graxos de cadeia ímpar e ácidos graxos de cadeia longa e ramificada (Baldwin and Allison, 1983). Estes isoácidos são produzidos pelas bactérias não celulolíticas por meio da desaminação dos AACR e são excretados ao ambiente ruminal.

Portanto, objetivou-se avaliar a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas (AGVCR), em uma dieta com relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na matéria seca (MS), sobre o a proteína microbiana (Pmic), pH, nitrogênio amoniacal (NH₃-N) e proteína solúvel (PS) *in vitro*.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da UFV (CEUAP-UFV; protocolo N° 09/2021).

O inóculo ruminal foi obtido de três bovinos fistulados no rúmen. A dieta dos animais doadores foi composta por cana-de-açúcar e concentrado com 22% de proteína bruta, sendo a relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na MS. Antes das coletas de líquido ruminal, os animais foram submetidos a 14 dias de adaptação e jejum de 12 h antes das coletas.

Foram utilizados três tratamentos, o controle (sem adição de aminoácidos ou ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada), suplementado com 0,6% do blend de AACR e o suplementado com 1,3% de Isomix SPK 100® (Fonte de AGVCR), dosagem estipulada pelo fabricante por animal/dia. A porcentagem de AACR e Isomix® foram calculadas em 500 mg na MS da dieta experimental.

Os dois tratamentos e o controle foram avaliados em diferentes tempos de fermentação (6, 9, 12, 24, e 48 horas) com quatro repetições, totalizando 60 unidades experimentais. Além disso, foram realizadas quatro amostras em brancos (10 mL de inóculo ruminal + 40 mL de solução tampão de McDougall) por cada tempo de fermentação, para descontar os possíveis contaminantes oriundos do fluido ruminal nos resultados da digestibilidade e dos parâmetros ruminais que foram analisados.

A dieta experimental foi formulada para uma vaca com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite, utilizando feno de tifton 85 como volumoso, e o concentrado foi formulado com fubá de milho, farelo de soja, ureia + S.A (9:1) e núcleo (minerais e vitaminas). Foram pesadas para cada tratamento aproximadamente 500 mg da dieta, sendo então adicionados 10 mL de líquido de rúmen e 40 mL de tampão (McDougall, 1947) em frasco de 60 mL de penicilina (relação 1:4

inóculo e solução tampão), segundo Silva (2017), realizando o processo de fermentação a 39°C em ambiente anaeróbico.

A avaliação *in vitro* para o método proposto por Tilley E Terry (1963) seguiram as recomendações descritas pelos autores para o primeiro estágio (digestibilidade com inoculo ruminal), exceto o fato de utilizar frascos vedados e retirar os gases por agulhas ao invés de tubos de ensaio com válvulas de Bunsen.

O espaço livre dos frascos foi imediatamente saturado com CO₂, sendo fechados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos foram mantidos sob agitação numa mesa agitadora orbital (40 rpm) em sala climatizada (39 °C). Os frascos foram retirados da sala climatizada dentro dos tempos determinados, resfriados em água a 5 °C. Posteriormente ao resfriamento os frascos foram abertos. Foi coletado 6 ml de líquido de cada frascos e armazenados em tubos *eppendorfs* em triplicata por tratamento para a realização das análises de amônia (N-NH₃), proteína solúvel (PS) e proteína microbiana (Pmic) e, foi mensurado o pH usando um medidor de pH digital portátil (MB-10, Marte, Brasil).

A concentração de amônia nas amostras de líquido ruminal foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney & Marbach (1962). A absorbância foi medida a 630 nm, em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) e cloreto de amônio (NH₄Cl) foi utilizado como padrão. A concentração de proteína solúvel e a concentração de proteína microbiana foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

A Pmic, o pH, N-NH₃ e PS foram analisados conforme um delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 5, três tratamentos e cinco time points pelo PROC MIXED do SAS. Para as comparações das médias foi utilizado o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade para o erro tipo I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observados efeitos de tratamento, mas houve efeito de tempo sobre o pH, PS e Pmic (Tabela 1; $P \leq 0,050$). À medida que a dieta vai sendo degradada a microbiota aumenta no ambiente ruminal. O maior número de microrganismos leva a maiores produções de AGVs, o que gera uma redução no pH do meio ruminal, principalmente em um ambiente *in vitro* de circuito fechado, onde não a saída de substratos e absorção de AGVs. Roman-Garcia et al. (2021) observaram o mesmo comportamento para o pH ao longo dos tempos de fermentação, associado as maiores produções dos AGV pelo crescimento das populações microbianas.

O aumento na concentração da proteína solúvel está ligada a degradação das proteínas degradáveis no rúmen (PDR) dietética pelas bactérias proteolíticas. A fermentação de proteínas é o que permite a produção de isoácidos e N-NH₃ no ambiente ruminal. As concentrações crescentes ao longo do tempo de fermentação devem estar ligadas ao fato de não haver a saída de substrato do sistema *in vitro*. No estudo apresentado por Salinas Laura (2021), também foi observado aumento do acúmulo de proteínas solúveis ao longo do tempo de fermentação no sistema *in vitro*.

Tabela 1. Valores de pH, proteína solúvel e proteína microbiana em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite.

Item	Tratamentos			Tempo (horas)					EPM	P-valor
	C ^A	AACR ^B	AGVCR ^C	6	9	12	24	48		
pH	6,95	6,99	7,01	7,10 a	6,98 bc	6,88 c	7,01 ab	6,96 bc	0,037	0,002
PS ^D	62,60	63,89	60,36	48,80 cd	46,33 d	62,19 bc	80,44 a	73,66 ab	6,431	0,001
Pmic ^E	120,73	110,43	112,01	82,52 c	92,93 bc	117,84 ab	140,44 a	138,21 a	9,541	0,001

^AC = controle; ^BAACR = aminoácidos de cadeia ramificada; ^CAGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada; ^DPS = proteína solúvel (µg/mL); ^EPmic = proteína microbiana (µg/mL); EPM = erro padrão médio; Todos os P-valores de tratamento e interação não foram significativos (P > 0,05).

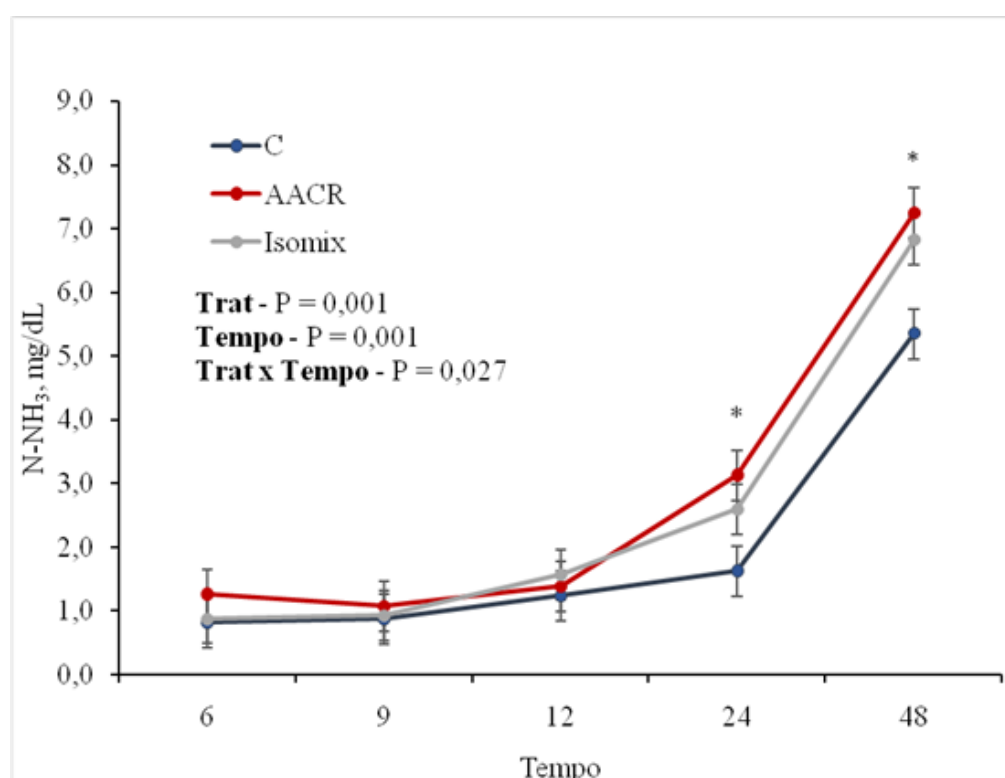


Figura 1. Nitrogênio amoniacal (N-NH₃ - mg/dL) em sistema *in vitro* com dieta para vacas com 500 kg, com produção diária de 15 kg de leite. C = controle; AACR = aminoácidos de cadeia ramificada; AGVCR = ácidos graxos de cadeia ramificada.

A concentração de N-NH₃ teve uma interação do tempo de fermentação com as suplementações (P = 0,027; Figura 1). Até as 12h de incubação, a concentração de N-NH₃ foi aumentada em todos os tratamentos, evidenciando que não houve efeito dos suplementos. No entanto, em 24 e 48 horas houve concentrações maiores de N-NH₃ no meio suplementado com os AACR e o AGVCR quando comparados ao controle. O aumento de N-NH₃ indica que a suplementação estimulou a degradação de PDR e a desaminação dos aminoácidos em relação ao controle a partir de 24 horas. Esse comportamento pode ter ocorrido devido ao estímulo a diferentes populações proteolíticas ruminais quando o meio foi suplementado com os AACR e o AGVCR. À medida que a concentração de energia disponível no sistema diminui ao longo do tempo de fermentação, um estímulo da utilização de proteínas como fonte de energia pode ter sido gerado.

nas populações proteolíticas pelas suplementações, aumentando a concentração de N-NH₃ após a desaminação dos aminoácidos dietéticos (Russell, 2002).

CONCLUSÕES

A suplementação com AACR e AGVCR *in vitro* não estimula o crescimento da proteína microbiana. Além disso, o pH, e a PS também não foram aumentadas no inoculo ruminal, com a presença de AACR e AGVCR. Por fim, as concentrações de amônia são aumentadas no inoculo ruminal após 24h e 48h de fermentação em sistema fechado *in vitro*, com o uso de AACR e AGVCR.

AGRADECIMENTOS

Às empresas Nutricattle e Suprikem, pelo suporte financeiro concedido à pesquisa, à FACEV, por administrar o projeto por meio do convênio 264, ao CNPq e ao Departamento de Zootecnia da UFV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, R. L.; ALLISON, M. J. Rumen metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. suppl_2, p. 461-477, 1983.

CHANEY, Albert L.; MARBACH, Edward P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.

MCDUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical Journal**, v. 43, n. 1, p. 99, 1948.

ROMAN-GARCIA, Y., DENTON, B. L., MITCHELL, K. E., LEE, C., SOCHA, M. T., & FIRKINS, J. L. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. I: Comparison with branched-chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6739-6755, 2021.

RUSSELL, J.B., 2002. **Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition**, 1a. ed. Ithaca, NY.

SALINAS LAURA, Sara Adriana. **Isomix e virginiamicina sobre a fermentação ruminal *in vitro***. 2021.. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2021.

SILVA, T. E. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1635-1644, 2017.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, dan RA. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and Forage Science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

WANG, M. Z., WANG, H. R., CAO, H. C., LI, G. X., & ZHANG, J. Effects of limiting amino acids on rumen fermentation and microbial community in vitro. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 12, p. 1524-1531, 2008.