

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA**

**ADERÊNCIA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA
BACTERIANA RUMINAL: EFEITO DO PH E DA
CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Farenzena

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ADERÊNCIA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA BACTERIANA
RUMINAL: EFEITO DO PH E DA CONCENTRAÇÃO DE
CARBOIDRATOS SOLÚVEIS**

por

Roberta Farenzena

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ADERÊNCIA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA BACTERIANA RUMINAL:
EFEITO DO PH E DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS
SOLÚVEIS**

elaborada por
Roberta Farenzena

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Gilberto Vilmar Kozloski, Dr.
(Presidente/ Orientador)

Juliano Perottoni, Dr. (UFSM/CESNORS)

João Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

“No retrato que me faço
- traço a traço –
às vezes me pinto nuvem,
às vezes me pinto árvore...
às vezes me pinto coisas
de que nem há mais lembrança...
ou coisas que não existem
mas que um dia existirão...
e, desta vida, em que busco
- pouco a pouco –
minha eterna semelhança,
no final, que restará?
Um desenho de criança...
Corrigido por um louco!”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, acima de tudo, pois acredito que existe uma força maior que nos guia para seguir sempre no caminho certo.

Aos meus pais, pela compreensão e amor incondicional recebidos durante todo o tempo, nunca medindo esforços para que eu pudesse seguir meus projetos.

Ao Gilberto, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional, por todo o apoio e incentivo.

A toda equipe de estagiários do laboratório pela fundamental participação e colaboração durante o experimento, em especial a Mariana e ao Cristiano, por toda dedicação nas tarefas realizadas.

Aos estagiários do CESNORS que também deixaram sua participação neste trabalho.

Aos colegas de mestrado que sempre que puderam também deram aquela força. Em especial a Lisandre, a Carla, a Ana e a Fernanda, que além da amizade e diversão nos momentos de descontração, sempre estiveram presentes pra socorrer quando a situação não era das melhores.

Aos meus irmãos e aos amigos que estão sempre na torcida por mim.

Ao Cledeu pelo amor, compreensão e companheirismo a mim sempre dedicados.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos estes, o meu Muito Obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

ADERÊNCIA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA BACTERIANA RUMINAL: EFEITO DO PH E DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS

AUTORA: ROBERTA FARENZENA

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

Ensaios *in vitro* foram conduzidos com o objetivo de desenvolver um método para estimar atividade de enzimas bacterianas do rúmen e avaliar os efeitos da alteração no pH e na concentração de carboidratos solúveis sobre a aderência às partículas de forragem e sobre a atividade fibrolítica bacteriana ruminal. Para avaliação de métodos de extração enzimática, amostras de azevém (*lolium multiflorum*) foram incubadas no rúmen de um bovino durante 24 horas e utilizadas para obtenção de extratos enzimáticos por diferentes métodos de extração: sonicação, sonicação + lisozima, lisozima e sem tratamento prévio (controle). O extrato enzimático foi então incubado com carboximetilcelulose (CMC) e medido a liberação de açúcares redutores. O método de extração de enzimas não afetou significativamente a atividade enzimática, mas o desvio padrão foi menor quando a extração foi somente por sonicação. Em outro ensaio metodológico foi testado o efeito do tempo de reação entre extrato enzimático e substrato sobre a atividade relativa das enzimas (nmol de açúcares redutores/g de matéria seca de resíduo de amostra/minuto). A atividade relativa diminuiu exponencialmente com o tempo, estabilizando-se a partir de 240 minutos de incubação. Para avaliar o efeito do pH e da concentração de açúcares sobre a aderência bacteriana às partículas de alimento e sobre a sua degradabilidade, amostras de azevém (*Lolium multiflorum*) ou cynodon (*Cynodon dactylon*) foram incubadas *in vitro* durante 24h em meios com diferentes pHs (5,5; 6,0; 6,5 ou 7,0) ou diferentes concentrações iniciais de glicose (0, 100, 200 e 300 mg/dl). No resíduo da fermentação foi determinado o teor de matéria seca e analisado o teor de P, assumindo-se ser de origem bacteriana. A degradabilidade e o teor de P residual foram mais altos nas amostras de azevém que de cynodon ($P<0,01$) e ambos fatores foram linearmente e positivamente afetados pelo pH ($P<0,01$). O aumento da concentração de carboidratos solúveis exerceu efeito linear e negativo sobre a aderência das bactérias ($P<0,01$), mas não afetou a degradação da forragem. O efeito do pH e da concentração de açúcares sobre a atividade enzimática fibrolítica foi avaliada no resíduo destas amostras forrageiras incubadas ruminalmente durante 24h e extraídas por sonicação. O extrato enzimático foi incubado durante 240 minutos com xilana ou CMC em meios de reação a diferentes pHs ou concentração de açúcares. Em média, a atividade de enzimas extraídas de resíduo de azevém foi superior à atividade daquelas oriundas de cynodon ($P<0,01$). No entanto, o efeito de ambos fatores variou entre ensaios e com o tipo de amostra. Por exemplo, em diferentes ensaios foi observado que o efeito de pH foi linear ($P<0,05$), quadrático ($P<0,05$) ou mesmo não foi ajustado à nenhuma destas regressões. Da mesma forma, a presença de diferentes concentrações de açúcares no meio exerceu efeito, na maioria das vezes quadrático, sobre a atividade enzimática ($P<0,01$). Em conclusão, a aderência bacteriana às partículas de forragem foi diretamente relacionada com o pH e inversamente relacionada com a concentração de açúcares solúveis no meio de incubação. Estes efeitos, contudo, foram menos evidentes sobre a atividade enzimática fibrolítica.

Palavras-chave: açúcares; aderência; bactérias ruminais; degradação; enzimas; fibra; pH.

ABSTRACT

Dissertation of Mastership
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

ADHERENCE AND BACTERIAL ENZYME ACTIVITY IN THE RUMEN: EFFECT OF PH AND CONCENTRATION OF SOLUBLE CARBOHYDRATES

AUTHOR: ROBERTA FARENZENA

ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Date and defense's place: Santa Maria, February 26, 2010.

In vitro assays were conducted to develop a method to estimate activity of bacterial enzymes in the rumen and the effect of changes in pH (5.5, 6.0, 6.5 and 7.0) and concentration of soluble carbohydrates (0, 100, 200 and 300 mg / dl) on adhesion to forage particles and ruminal bacterial fibrolytic activity. To evaluate the enzymatic extraction methods, samples of ryegrass (*Lolium multiflorum*) were incubated in a bovine rumen during 24-h and used to obtain enzymatic extracts through different extraction methods: sonication, sonication + lysozyme, lysozyme and without previous treatment (control). Then, the enzymatic extract was incubated with carboxymethylcellulose (CMC) and measured the reducing liberated sugars. The enzymatic extraction method did not affect significantly the enzymatic activity, but the standard deviation was lower when extraction only was through sonication. In another methodological assay, the effect of the reaction time between enzymatic extract and substrate on relative enzymatic activity (nmol of reducing sugars/ g DM of sample residue/ min) was tested. The relative activity decreased exponentially with time and stabilized after 240-min of incubation. To evaluate the effects of pH and concentration of sugars on bacterial attachment to feed particles and his degradability, samples of ryegrass (*Lolium multiflorum*) or cynodon (*Cynodon dactilon*) were incubated *in vitro* for 24-h in mediums with different pH (5,5; 6,0; 6,5 or 7,0) or different initial concentrations of glucose (0, 100, 200 and 300 mg/dl). The DM and phosphorus content (phosphorus was assumed be of bacterial origin) were determined in the fermentation residue. In ryegrass samples degradability and the residual phosphorus content were higher than in cynodon ($P<0.01$) and both factors were affected linearly and positively by pH (<0.01). The increase of soluble carbohydrates concentration exerted linear and negative effects on bacterial attachment ($P<0.01$), but it did not affected forage degradability. The effect of pH and sugar concentration was evaluated on fibrolytic enzyme activity in residues of the samples incubated in the rumen for 24-h and extracted through sonication. The enzymatic extract was incubated for 240-min with xylan or CMC in reaction mediums with different pH or sugar concentrations. In average, the activity of the enzymes extracted from the ryegrass residue was superior to the cynodon ones ($P<0.01$). On the other hand, the effect of both factors varied among assays and with the sample type, e.g. in different assays was observed that the pH effect was linear ($P<0.05$), quadratic ($P<0.05$) or even do not adjusted to none of the regressions. In the same way, the effect of presence of different concentrations of sugars in the medium on enzyme activity was quadratic mainly ($P<0.01$). In conclusion, the bacterial attachment to the forage particles was related directly to pH and inversely with concentration of soluble sugars in the incubation medium. However, these effects were less evident on enzymatic fibrolytic activity.

Keywords: adhesion; degradation; enzymes; fiber; pH; rumen bacteria; sugars

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentração de açúcares solúveis no meio de incubação no início (0 hora) e ao final (24 horas) da incubação em cada ensaio.....	34
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal fresco ou congelado	28
FIGURA 2 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal	30
FIGURA 3 - Fluxograma do processo de extração de enzimas	35
FIGURA 4 - Atividade enzimática de bactérias fibrolíticas ruminais, extraídas de resíduo ruminal fresco (n=74) ou congelado (n=64) pelos métodos de sonicação (S), liozima (L), sonicação + liozima (SL) ou sem tratamento prévio - controle (C). O desvio padrão é representado por barras. Letras diferentes sobre as colunas indicam que os métodos diferem entre si dentro dos ensaios pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	39
FIGURA 5 - Atividade enzimática absoluta de bactérias ruminais utilizando celulose (n=70) ou carboximetilcelulose (n=70) como substrato, aos 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos de incubação de enzima:substrato. As barras representam o desvio padrão das médias. Probabilidade da análise de regressão: CMC e celulose, efeito linear (P<0,01).....	40
FIGURA 6 - Atividade enzimática relativa de bactérias ruminais utilizando celulose (n=70) ou carboximetilcelulose (n=70) como substrato, aos 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos de incubação de enzima:substrato. As barras representam o desvio padrão das médias. OBS: O valor de R ² foi obtido pela análise de regressão linear do logaritmo (base 10) dos valores de atividade. Probabilidade da análise de regressão: CMC e celulose (P<0,01).	40
FIGURA 7 - Aderência microbiana (purinas) sobre o resíduo de cynodon (n=30) e azevém (n=30) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 1). Probabilidade da análise de regressão: não significativa. As barras representam o desvio padrão das médias.....	41
FIGURA 8 - Aderência microbiana (fósforo) sobre o resíduo de cynodon (n=28) e azevém (n=32) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 2), sem correção para o teor de P insolúvel das forragens. Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear (P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	42

FIGURA 9 - Aderência microbiana corrigida (fósforo) sobre o resíduo de cynodon (n=32) e azevém (n=32) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 3). Correção para o teor de P insolúvel das forragens após a fermentação. Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear (P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	43
FIGURA 10 - Degradabilidade da MS em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 1). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear (P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	44
FIGURA 11 - Degradabilidade da MS em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 2). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear (P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	44
FIGURA 12 - Degradabilidade da FDN em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 3). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear (P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	45
FIGURA 13 - Aderência bacteriana (fósforo) sobre o resíduo de cynodon (n=63) incubado durante 24 horas com diferentes concentrações iniciais de glicose. Probabilidade da análise de regressão: efeito linear (P<0,01).....	46
FIGURA 14 - Aderência bacteriana (fósforo) sobre o resíduo de azevém (n=63) incubado durante 24 horas com diferentes concentrações iniciais de glicose. Probabilidade da análise de regressão: efeito linear (P<0,01).....	46
FIGURA 15 – Degradabilidade da FDN em amostras de cynodon (n=77) após 24 horas de fermentação a diferentes concentrações iniciais de açúcares solúveis. Probabilidade da análise de regressão: não significativo (P>0,05).....	47
FIGURA 16 - Degradabilidade da FDN em amostras de azevém (n=77) após 24 horas de fermentação a diferentes concentrações iniciais de açúcares solúveis. Probabilidade da análise de regressão: não significativo (P>0,05).....	47
FIGURA 17 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (1º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	48

FIGURA 18 – Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (1° ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito linear (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	49
FIGURA 19 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (2° ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	50
FIGURA 20 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (2° ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	50
FIGURA 21 - Atividade fibrolítica média de enzimas bacterianas extraídas de resíduo ruminal de cynodon (n=159) ou azevém (n=169) incubadas a diferentes pHs. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as enzimas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão das médias.	51
FIGURA 22 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas com xilana (n=39) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (1° ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	52
FIGURA 23 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (1° ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.	52
FIGURA 24 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas com xilana (n=32) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao	

substrato (2º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias. 53

FIGURA 25 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas com xilana (n=32) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (2º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito linear (P<0,01); CMC, efeito quadrático(P<0,05). As barras representam o desvio padrão das médias. 54

FIGURA 26 - Atividade fibrolítica média de enzimas bacterianas extraídas de resíduo ruminal de cynodon (n=152) ou azevém (n=151) incubadas com diferentes concentrações de glicose. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as enzimas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão. 55

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Aderência bacteriana (mg de purina/g de MS incubada ou mg de P/g de MS incubada) e degradabilidade de gramíneas forrageiras (degradabilidade MS ou FDN).incubadas a diferentes pHs, nos 3 ensaios.....	78
APÊNDICE B - Aderência bacteriana (mg de P/g de MS incubada) e degradabilidade da FDN de gramíneas forrageiras incubadas com diferentes concentrações iniciais de glicose, nos 4 ensaios.....	83
APÊNDICE C - Atividade de enzimas bacterianas ruminais (nmol de açúcares redutores liberados/ g de MS/ minuto) extraídas de resíduo de azevém ou cynodon incubadas com carboximetilcelulose (CMC) ou xilana a diferentes pHs.....	87
APÊNDICE D - Atividade de enzimas bacterianas ruminais (nmol de açúcares redutores liberados/ g de MS/ minuto) extraídas de resíduo de azevém ou cynodon incubadas com carboximetilcelulose (CMC) ou xilana com diferentes concentrações de glicose adicionadas ao substrato.....	95

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Solução tampão fosfato.....	71
ANEXO B - Solução de 3,5-dinitro-salicilato (DNS 1%)	72
ANEXO C - Composição da solução tamponante ¹	73
ANEXO D – Solução complexante	74
ANEXO E – Solução redutora.....	75
ANEXO F - Composição da solução tamponante.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 HIPÓTESE.....	18
3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....	19
3.1 Aderência e atividade fibrolítica de bactérias ruminais	19
3.2 Efeito do pH e dos açúcares sobre a aderência e sobre a atividade fibrolítica bacteriana ruminal.....	22
3.3 Metodologias para estimar a aderência bacteriana	23
3.3 Métodos para determinação da atividade enzimática de bactérias ruminais	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Local e época	27
4.2 Avaliação de metodologias para determinação da atividade enzimática microbiana ruminal	27
4.2.1 Efeito do método de extração de enzimas e do congelamento	27
4.2.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação.....	29
4.3 Aderência bacteriana ruminal	30
4.3.1 Efeito do pH.....	30
4.3.2 Efeito da concentração de açúcares solúveis	33
4.4 Atividade de enzimas fibrolíticas bacterianas.....	34
4.4.1 Efeito do pH.....	34
4.4.2 Efeito dos açúcares solúveis	36
4.5 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Avaliação de metodologias para determinação da atividade enzimática microbiana ruminal	38
5.1.1 Efeito do método de extração de enzimas e do congelamento	38
5.1.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação.....	39
5.2 Aderência bacteriana ruminal	41
5.2.1 Efeito do pH.....	41
5.2.2 Efeito dos açúcares solúveis	45
5.3 Atividade de enzimas fibrolíticas bacterianas.....	48
5.3.1 Efeito do pH.....	48
5.3.2 Efeito dos açúcares solúveis	51
6 DISCUSSÃO	56
6.1 Metodologias	56
6.1.1 Efeito do método de extração e do congelamento sobre a atividade enzimática.....	56
6.1.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação sobre a atividade enzimática	57
6.1.3 Métodos para estimar aderência bacteriana ruminal.....	57
6.2 Degradabilidade, aderência bacteriana e atividade enzimática	58

6.2.1 Efeito do pH.....	58
6.2.2 Efeito da concentração de açúcares solúveis	59
7 CONCLUSÕES.....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

Ruminantes alimentados com dietas a base de forragens usualmente necessitam receber suplementação com concentrados para alcançar níveis aceitáveis de ganho de peso ou produção de leite. No entanto, a suplementação com alimentos ricos em amido ou açúcares deprimem a digestibilidade da fibra e o consumo de forragem (PATERSON et al., 1994). Vários fatores podem estar envolvidos nestes efeitos, como competição entre espécies bacterianas por nutrientes limitantes, como amônia (TAMMINGA, 1993), produção de proteínas, pelas bactérias que usam açúcares solúveis, que inibem o crescimento daquelas que degradam fibra (PIWONKA; FIRKINS, 1996) e, principalmente, inibição do crescimento e da atividade das bactérias que degradam fibra devido à queda do pH ruminal (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; MOULD; ØRSKOV, 1983; MOULD et al, 1983; GRANT; MERTENS, 1992; GRANT; WEIDNER, 1992; MOURIÑO et al., 2001). Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado também que a suplementação com alimentos ricos em amido deprimem a degradação ruminal da fibra mesmo em situações em que não há redução significativa do pH ruminal, indicando a existência de um mecanismo de inibição direta das enzimas fibrolíticas pelos carboidratos não fibrosos (MOULD; ØRSKOV, 1983; MOULD et al, 1983; GRANT; MERTENS, 1992; KOZLOSKI et al., 2006a; KOZLOSKI et al, 2006b).

Embora estes efeitos foram amplamente identificados e documentados, os mecanismos pelos quais a queda do pH e/ou a presença de carboidratos não estruturais reduzem a atividade fibrolítica no rúmen não estão claramente estabelecidos.

O estudo foi conduzido com o objetivo de: a) implantar e avaliar metodologias para medir a atividade de enzimas bacterianas ruminais e b) avaliar o efeito da presença de carboidratos solúveis e do pH sobre a aderência bacteriana e sobre a atividade de enzimas fibrolíticas ruminais.

2 HIPÓTESE

A redução do pH e o aumento da concentração de açúcares solúveis do meio deprime a degradação ruminal da fibra dos alimentos por afetar negativamente ambos, a aderência bacteriana às partículas de alimento e a atividade de enzimas fibrolíticas.

3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Aderência e atividade fibrolítica de bactérias ruminais

Os alimentos que chegam ao rúmen são constituintes de estruturas moleculares complexas e de alto peso molecular, indisponíveis às células bacterianas ruminais. Assim, para atender as necessidades nutricionais bacterianas, estas estruturas são degradadas extracelularmente até porções monoméricas, passíveis de entrarem na célula e serem metabolizadas (WHITERS, 1992; HOOVER; STOKES, 1991).

Os microorganismos ruminais que interagem com as partículas de alimento podem ser funcionalmente descritos em três sub populações distintas: 1) Bactérias livres, associadas ao fluido ruminal; 2) bactérias fracamente associadas as partículas; e 3) bactérias fortemente aderidas as partículas de alimento (McALLISTER et al., 1994).

Para o início da degradação do alimento no rúmen, o primeiro passo é a aderência da célula bacteriana ao alimento (WEIMER, 1996). No caso de espécies que degradam carboidratos estruturais, a aderência bacteriana as partículas permitem a aproximação de enzimas presentes na superfície externa da membrana das células bacterianas ao substrato (CHURCH, 1993).

A necessidade da adesão, para digestão da celulose por bactérias ruminais, foi demonstrada observando-se que uma baixa concentração de metilcelulose, a qual bloqueia a adesão da bactéria a celulose, também bloqueou a digestão da celulose (CHESSON; FORSBERG, 1997).

Miron et al (2001) relata que a adesão bacteriana aos tecidos das plantas pode ser descrita em quatro fases:

Fase I: inicia poucos minutos após a ingestão do alimento e envolve o contato aleatório das populações bacterianas que estão livres no fluido ruminal com a partícula recém ingerida.

Fase II: ocorre adesão não específica, envolvendo a participação de moléculas de natureza protéica, lipídica e glicídica, presentes na superfície externa da célula bacteriana, as quais interagem com moléculas da superfície das partículas por meio de interações iônicas, hidrofóbicas e forças de Van Der Waals.

Fase III: processo pelo qual há interação específica e induzida entre moléculas presentes na superfície externa bacteriana, denominadas ligantes ou adesinas, que reconhecem receptores na superfície exposta da partícula.

Fase IV: ocorre a proliferação celular e formação de colônias bacterianas, na forma de biofilmes, sobre as áreas expostas e potencialmente digestíveis das partículas de alimento.

De acordo com os autores, cada uma destas fases depende da conclusão bem sucedida da fase anterior.

Até mesmo em espécies de bactérias que se aderem fortemente ao substrato, sua população não se encontra totalmente aderida, e uma proporção desta população está sempre disponível para colonizar novas fontes de substrato (CHESSON; FORSBERG, 1997).

A população aderida às partículas representa 70 – 80% da biomassa bacteriana e contém cerca de 90% das atividades de celulase e xilanase presente no ambiente ruminal (WILLIAMS; STRACHAN, 1984; CRAIG et al. 1987). Martin e Michalet-Doreau (1995) observaram que a maior parte da população microbiana do rúmen encontra-se aderida a fase sólida do conteúdo em comparação ao fluido ruminal, e Michalet-Doreau et al. (2001) concluíram que as bactérias não são igualmente distribuídas por todo o conteúdo ruminal: espécies celulolíticas estão presentes em maior proporção na fase sólida do conteúdo ruminal.

De acordo com Chesson e Forsberg (1997), bactérias fibrolíticas como *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* apresentam diferentes especificidades para ligação ao substrato, as quais servem para reduzir a competição entre elas.

Weimer (1996) relata que a digestão da celulose envolve a adesão de células microbianas às fibras através do glicocálix, uma estrutura glicoprotéica que protege tanto as células de engolfamento por protozoários quanto as enzimas celulolíticas da degradação por proteases ruminais, enquanto mantém os produtos da degradação enzimática disponíveis para serem utilizadas pelas bactérias. Estas propriedades, em geral, fornecem uma enorme vantagem seletiva as bactérias celulolíticas no ambiente ruminal, pois otimiza a hidrólise da celulose e utilização eficaz dos produtos da hidrólise.

A digestão ruminal depende tanto da atividade microbiana quanto do tempo e grau de contato entre os microorganismos e as partículas. O tamanho da partícula determina a área útil para o ataque enzimático das bactérias e contribui para a interação entre partículas e microorganismos (DOREAU et al., 2003)

A digestão do alimento é concentrada numa pequena área, em que as enzimas ficam protegidas e uma maior proporção de nutrientes, que são liberados por hidrólise, são capturados pelas células aderidas (McALLISTER et al., 1994).

A população de bactérias aderentes crescerá sobre o substrato com o avanço da digestão até que as células são liberadas passando para o fluído ruminal para recolonizarem um novo substrato (CHURCH, 1993).

Em sua revisão, Krause et al. (2003) relataram que uma complexa população de microorganismos fibrolíticos catalisam a degradação da fibra no rúmen, e que a maior parte das enzimas extracelulares envolvidas na degradação da celulose e hemicelulose são glicosil hidrolases que hidrolisam as ligações glicosídicas entre carboidratos, ou ainda entre uma molécula de carboidrato e outra que não seja, necessariamente, um hidrato de carbono.

A estratégia utilizada pelas bactérias ruminais para aumentar a hidrólise da celulose e hemicelulose é o uso de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas localizadas principalmente na superfície celular, provavelmente em complexos multienzimáticos, os chamados Celulossomas (WEIMER, 1996).

A composição e funções do celulossoma têm sido bastante estudadas, no entanto, o que mais se encontra na literatura são descrições da estrutura do celulossoma da bactéria *Clostridium thermocellum* (BAYER et al., 1994). Pouco se conhece sobre a estrutura do celulossoma de uma bactéria ruminal, mas acredita-se que as funções deste complexo sejam semelhantes entre as bactérias celulolíticas.

O celulossoma é uma estrutura de alto peso molecular que está associada a célula bacteriana, constituída por subunidades catalíticas, onde estão presentes celulasas, glicosidades e xilanasas, entre outras; e subunidades não catalíticas, que ligam o complexo enzimático com a parede celular bacteriana e são também responsáveis pela adesão específica da bactéria ao substrato (BAYER et al., 1998).

A eficiente quebra da celulose no rúmen, geralmente necessita certo número de glicosil hidrolases, incluindo endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidasas, as quais trabalham sinergicamente para hidrolisar a celulose. O produto final da degradação da celulose é a glicose, mas celodextrinas e celobiose também são liberadas como produtos intermediários. A degradação da hemicelulose libera como produto final, principalmente, xilose, e é catalisada por endoxilanasas e β -xilosidades (KRAUSE et al., 2003).

Morgavi et al. (2000) quantificaram cada um dos produtos liberados durante a incubação de enzimas fibrolíticas bacterianas com silagem de milho. Eles observaram que em pH 6,0, glicose foi o monossacarídeo liberado em maior quantidade, em torno de 63 % do total, xilose foi segundo mais abundante (19%), seguido por arabinose (13%), manose, e galactose (em torno de 2,5% cada). Em pH 5,0 a concentração relativa de glicose aumentou para 85% em detrimento aos demais monossacarídeos.

Michalet-Doreau, et al (2001) determinaram as atividades específicas das polissacaridases e glicosidases envolvidas na degradação dos polissacarídeos estruturais no rúmen. Eles mostraram que a atividade enzimática da xilanase e carboximetilcelulase varia consideravelmente com a natureza da bactéria. Segundo os autores, a atividade destas enzimas é mais alta na população de bactérias aderidas que na população total de microorganismos (associados a fase sólida e líquida do conteúdo ruminal), e maior na população bacteriana fortemente aderidas que nos microorganismos fracamente aderidos as partículas.

Diversos fatores podem afetar a adesão e colonização ao substrato, assim como a atividade fibrolítica das bactérias ruminais. Entre eles: 1) fatores relacionados às bactérias, como maturidade, condições dos componentes do glicocálix e competição microbiana; 2) fatores relacionados ao substrato incluindo, proteção dos tecidos da planta pela cutícula, área de superfície, hidratação, carga iônica e capacidade de troca catiônica; e 3) fatores relacionados ao ambiente como, pH, temperatura e a presença de O₂, cátions e carboidratos solúveis (MIRON et al, 2001).

3.2 Efeito do pH e dos açúcares sobre a aderência e sobre a atividade fibrolítica bacteriana ruminal

Estudos *in vitro* (HADDAD; GRANT, 2000; GRANT; MERTENS, 1992) demonstraram que a digestibilidade da fibra é limitada em pH em torno de 6,0 e pode ser também afetada negativamente pela presença de carboidratos solúveis (RUSSEL, 1998). Por outro lado, uma baixa disponibilidade de açúcares para o crescimento de populações celulolíticas também podem limitar a atividade destas espécies (KOZLOSKI, et al. 2006a).

Grigsby et al. (1993) sugerem que a competição, entre os diferentes grupos de bactérias, é a primeira razão para a inibição da celulólise, principalmente, quando uma fonte de amido é adicionado a dieta, estimulando o crescimento das bactérias amilolíticas, inibindo as celulolíticas e afetando negativamente a digestão da fibra

Piwonka e Firkins (1993) demonstraram que a adição de glicose ao início do período de 72 horas de fermentação reduziu a taxa de digestão da fibra em detergente neutro (FDN) e a atividade da carboximetilcelulase, mesmo com o pH da cultura mantido acima de 6,2. Contudo, a adição de glicose após 24 horas de incubação, assumido ser o tempo para máxima

colonização microbiana, não diminuiu a taxa de digestão da FDN, mas diminuiu a atividade da carboximetilcelulase.

Mould et al. (1983) também deixam claro, o efeito negativo que o incremento na proporção de açúcares solúveis, na dieta, exerce sobre a digestibilidade da fibra, mesmo sem a redução significativa do pH. Os autores descrevem dois aspectos negativos que carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen exercem sobre a celulólise: a redução da celulólise que não pode ser atenuada pelo aumento do pH ruminal foi designado “efeito de carboidrato” e a parte devido à redução do pH foi designado “efeito do pH”.

Segundo Russel e Wilson (1996) o baixo pH ruminal diminui a atividade ou o número de microorganismos celulolíticos, e até mesmo uma modesta redução no pH ruminal pode inibir severamente a digestão da celulose. Os autores relatam que bactérias celulolíticas não conseguem crescer com um baixo pH intracelular, e quando há redução do pH extracelular ocorre um desequilíbrio no gradiente de pH, a nível de membrana, acarretando uma toxicidade por acúmulo de ânions no interior da célula bacteriana.

Huhtanen e Khalili (1991; 1992) também constataram que a taxa de digestão da FDN e da atividade da carboximetilcelulase *in situ* foi menor quando sacarose (1 kg / d) foi infundida no rúmen do que sem infusão de sacarose. Contudo, os efeitos do pH baixo não puderam ser corrigidos e o pH ruminal ficou abaixo de 6,0, durante 5 h do dia.

Mouriño et al. (2001), no entanto, observaram que a presença de espécies não-celulolíticas em co-cultura com celulolítica, em condições de pH baixo, aumentam a degradação da celulose *in vitro*, indicando que há competição entre essas espécies para os produtos de degradação de celulose

3.3 Metodologias para estimar a aderência bacteriana

Alguns métodos têm sido descritos para se estimar a adesão de bactérias ruminais ao substrato.

Rasmussen et al. (1989) estimaram a aderência bacteriana através da radioatividade de células marcadas com ^{14}C . Em 1997, Mosoni et al., (1997) também estimaram a colonização bacteriana em celulose pura pela absorção do ^{14}C , determinado pela medida da radioatividade e do peso seco da suspensão celular. O tempo de contato da celulose com as bactérias,

previamente marcadas com ^{14}C , foi de 45 minutos. A percentagem de células aderidas foi determinada pelo cálculo da proporção da radioatividade em relação a radioatividade total da celulose.

Firkins et al. (1991) relatam que marcadores bacterianos são necessários para avaliar a colonização bacteriana da fibra. Purinas estão entre os marcadores mais utilizados, mas isótopos como ^{15}N , podem ser mais específicos porque os alimentos não estão contaminados por eles.

As bases púricas são constituintes dos ácidos nucléicos presentes no RNA e DNA de todos os seres vivos. Os ruminantes podem ingerir quantidades apreciáveis de ácidos nucléicos na dieta, no entanto, estes são rapidamente degradados no rúmen. A utilização das bases púricas como marcador bacteriano está baseada na idéia de que os ácidos nucléicos presentes na digesta ruminal sejam predominantemente de origem bacteriana (MCALLAN, 1982).

No estudo de Bhat et al. (1990), a adesão de bactérias ruminais ocorreu pela adição de 7 ml de suspensão bacteriana em 0,25 g de palha, incubados a 39°C , por 30 min. Segundo os autores este tempo permitiu máxima aderência de bactérias celulolíticas a celulose. A mistura foi filtrada, e a população microbiana foi estimada pela determinação da densidade óptica do filtrado a 650 nm.

Kozloski et al (2008) estimaram a adesão microbiana por método gravimétrico. Após a fermentação bacteriana *in vitro*, eles lavaram o resíduo com solução fisiológica (NaCl 0,9 %) para retiradas das bactérias não aderidas e determinaram a matéria seca (MS) residual. Depois disso, trataram as amostras com uma solução de dissociação. Os autores supõem que com este tratamento cerca de 80% dos microorganismos aderidos tenham se desligado das amostras. Em seguida, analisaram novamente a MS do resíduo. A adesão microbiana foi estimada pela diferença entre o teor de MS residual antes e após o tratamento de dissociação.

Apesar de não terem verificado efeito do pH inicial sobre a aderência, utilizando esta metodologia os autores verificaram que a máxima colonização microbiana sobre o resíduo ocorreu após 24 horas de incubação.

Mouriño et al. (2001) propuseram o uso de N e P como marcadores microbianos. No entanto, eles estimaram a colonização bacteriana em culturas de celulose pura, a qual não possui estes elementos em sua composição. Assim, todo o N e P presente no resíduo foi considerado ser de origem microbiana. Silva et al. (1987) sugerem que a colonização microbiana pode ser estimada através da atividade da carboximetilcelulase bacteriana ruminal, ao longo do tempo de incubação. Piwonka e Firkins (1993) utilizaram este método e

observaram que o pico da atividade enzimática foi após 24 horas de incubação, indicando ser este o tempo adequado para máxima colonização microbiana da fibra.

3.3 Métodos para determinação da atividade enzimática de bactérias ruminais

Enzimas bacterianas podem ser extraídas diretamente do conteúdo ruminal, retirando-se uma amostra do alimento que foi ingerido, ou podem ainda serem extraídas de amostras previamente incubadas ruminalmente *in situ*.

Huhtanen et al. (1998) observaram que a atividade enzimática da xilanase e carboximetilcelulase foram consideravelmente maiores no conteúdo ruminal que no resíduo de incubação *in situ*. E que a porosidade do tecido utilizado afetou a atividade das enzimas, quanto menor o tamanho do poro, menor foi a atividade.

O processo de extração enzimática pode ocorrer sob diferentes condições. A sonicação de células microbianas para rompimento da membrana celular e enzimas extracelulares é um método bastante utilizado (GROLEAU; FORSBERG, 1981; SILVA et al., 1987; MARTIN; MICHALET-DOREAU, 1995; HRISTOV et al., 1999; MORGAVI et al., 2000).

O método de extração através da lisozima também é recomendado (HUHTANEN; KHALILI, 1992; HRISTOV et al. 1999; HUHTANEN et al., 1998). A lisozima é uma enzima que catalisa a clivagem catalítica de polissacarídeos nas paredes celulares protetoras de algumas famílias de bactérias. É assim chamada porque ela pode lisar, ou degradar, as paredes celulares bacterianas, funcionando como um agente bactericida (LEHNINGER et al., 2004).

Ambos os métodos tem a função de romper com a estrutura bacteriana, e ao mesmo tempo liberar enzimas extracelulares presentes em sua membrana externa, mantendo-se a integridade destas enzimas.

Algumas peculiaridades são observadas no uso destes métodos. O uso da sonicação, geralmente, ocorre em baixas temperaturas, pois o processo causa o aquecimento da amostra, e para permitir o resfriamento o processo ocorre em ciclos com pequenos intervalos.

Hristov et al. (1999) sonicaram suas amostras, sob gelo, em três ciclos de 30 s cada, com intervalo de 30 s entre eles. Por sua vez, Silva et al. (1987) utilizaram dez ciclos de 30 s, intercalados por 30 s, a 0° C. ; Martin e Michalet-Doreau (1995) submeteram as amostras a sonicação por quatro períodos de 30 s, a 4° C.

Entre as particularidades da extração enzimática pelo uso de lisozima, está a adição de tetracloreto de carbono na solução em que a amostra é submetida (HRISTOV et al., 1999; HUHTANEN; KHALILI, 1992; HUHTANEN, 1998).

No entanto, os autores não justificam o uso de deste componente em seus ensaios. Um estudo prévio demonstrou que o uso de tetracloreto de carbono não influenciou a atividade de enzimas bacterianas. Nos estudos citados acima, o tempo da incubação da lisozima com as células microbianas foi de 3 horas, a 39°C, o que torna o processo mais demorado em relação a sonicação.

Após o processo de ruptura da membrana celular, tanto com uso de lisozima como de sonicação, as amostras são, geralmente, centrifugadas e o sobrenadante é utilizado como extrato enzimático.

Celulases extracelulares e outras enzimas, produzidas por bactérias celulolíticas, degradam celulose e hemicelulose liberando como produto final, principalmente, celobiose, glicose, xilose, xilobiose e arabinose (KOZLOSKI, 2009). Então são realizadas incubações dos sobrenadantes enzimáticos adicionados de substrato, determinando-se a atividade das enzimas pela concentração de produtos liberados durante a incubação.

De acordo com o propósito dos estudos são utilizados diferentes substratos, como xilana, celulose, carboximetilcelulose (CMC), celobiose, amido.

O tempo de incubação enzima:substrato e concentração do substrato podem variar.

Martin e Michalet-Doreau (1995) incubaram enzimas bacterianas com xilana e CMC 2% (p/v) durante 60 min.

Groleau e Forsberg (1981) utilizaram xilana, CMC e amido 2% (p/v) como substratos, e incubaram por 2 horas.

Este passo é seguido pela interrupção da atividade enzimática, aquecendo as amostras para desnaturação das proteínas (NOZIÈRE; MICHALET-DOREAU, 1997), e determinação dos produtos liberados durante a ação das enzimas sobre o substrato (por exemplo: açúcares redutores, ρ -nitrofenol).

A atividade enzimática pode ser expressa das seguintes maneiras: nmol de açúcares redutores ou ρ -nitrofenol liberados por mg de proteína por minuto (MARTIN; MICHALET-DOREAU, 1997); nmol de açúcares redutores liberados do substrato por minuto por 1 g de MS de conteúdo ruminal amostrado (HRISTOV et al., 1999); μ mol de açúcares redutores liberados/g MS/minuto (HUHTANEN et al, 1998); μ mol de glicose liberada/g MS/minuto (SILVA et al., 1987).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

Os ensaios foram desenvolvidos no período de junho de 2008 a novembro de 2009. No Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Para condução dos ensaios foram utilizadas amostras de azevém (*Lolium multiflorum*) e de cynodon (*Cynodon dactylon* var. Dactylon), coletadas no estágio vegetativo de pastagens implantadas em área pertencente ao laboratório.

4.2 Avaliação de metodologias para determinação da atividade enzimática microbiana ruminal

4.2.1 Efeito do método de extração de enzimas e do congelamento

Foram confeccionados 20 saquinhos de nylon com porosidade de 50 micras medindo 10 x 10 cm e, em cada um deles, foi pesado aproximadamente 5 g de azevém previamente seco e moído em peneira de 5 mm, coletado de uma pastagem em fase vegetativa. Estas amostras foram incubadas ruminalmente durante 24 horas em um bovino alimentado à base de azevém. Para a incubação, os saquinhos foram colocados dentro de sacos maiores de tecido sintético com grande porosidade, sendo este preso a uma peça de metal, com a função de manter os sacos na parte ventral do rúmen, e fixado externamente com uma corda de náilon. Ao final da incubação ruminal os saquinhos foram retirados do rúmen, lavados em água corrente, submersos em solução salina 0,9% durante aproximadamente 10 minutos, com o objetivo de retirar do material as bactérias não aderidas às partículas de resíduo ruminal, e lavadas em água corrente novamente.

Metade das amostras foi processada ainda fresca, logo após a lavagem. A outra metade foi previamente congelada por um período de aproximadamente 30 dias. O material fresco ou

congelado foi submetido a três tratamentos para extração das enzimas: sonicação (S), sonicação+lisozima (S+L) ou somente lisozima (L), e, ainda, foram incubadas amostras sem tratamento prévio (C). No processo de sonicação utilizou-se uma lavadora ultra sônica (UNIQUE, Modelo 1450A, frequência de 25kHz). A lisozima foi diluída em tampão fosfato pH 6,8, descrito por Coleman (1985), (ANEXO A) numa concentração de 0,5% (p/v). As amostras de cada saquinho foram processadas conforme Figura 1.

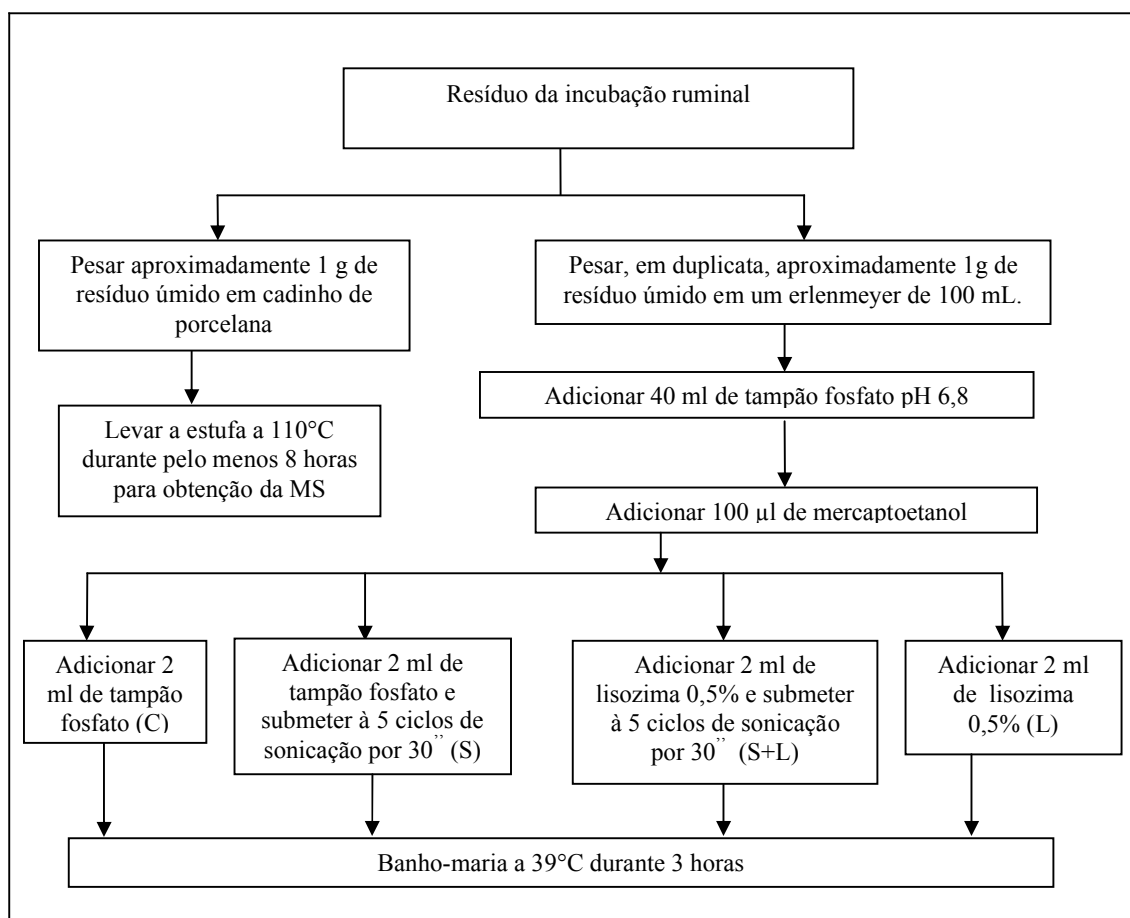


Figura 1 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal fresco ou congelado

As amostras foram sonicadas sob gelo, para evitar o aquecimento das mesmas.

Após a última etapa deste processo, onde as amostras permaneceram em banho-maria durante 3 horas a 39°C, as mesmas foram filtradas e em seguida coletado o fluido filtrado.

As amostras filtradas, assumido conter as enzimas, foram incubadas com o substrato CMC (SIGMA – Carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade) 2%. Em tubos de ensaio

foram adicionados 2 mL de filtrado e 4 mL do substrato. Os tubos foram submetidos à incubação em banho-maria a 39°C durante 30 e 60 minutos. Ao final desse período, as amostras eram, imediatamente, colocadas em outro banho-maria, a 100°C por seis minutos, com a finalidade de interromper a atividade das enzimas. Essa incubação teve o propósito de determinar a atividade enzimática das amostras pela degradação do substrato.

Neste material foi determinada a concentração de açúcares redutores pelo método DNS (3,5-dinitro-salicilato), adaptado de Miller et al (1960): em um tubo de ensaio era pipetado 1 mL de amostra e 1 mL da solução DNS (ANEXO B), os tubos eram agitados e levados à incubação em banho-maria de aproximadamente 100° C por 10 minutos. O material foi resfriado e adicionado 8 ml de água destilada. Foi realizada leitura de absorvância em espectrofotômetro num comprimento de onda de 575 nanômetros contra o branco (1 mL de água + 1 mL de solução DNS + 8 mL de água), o padrão utilizado foi uma solução de glicose (1g/L).

A atividade enzimática foi expressa em nmol de açúcares redutores/g MS incubada/ minuto de incubação, utilizando-se uma média da atividade obtida após 30 e 60 minutos de incubação.

4.2.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação

Foram incubadas ruminalmente amostras de azevém conforme descrito anteriormente. Após a lavagem das amostras, foram realizados, para cada saquinho, os procedimentos descritos na Figura 2.

Após a última etapa deste processo as amostras foram filtradas e em seguida coletou-se o filtrado, o qual foi incubado com o substrato CMC ou celulose (SIGMA – Avicel® PH – 50 UM) 2%. Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de filtrado e 4 mL de substrato. Os tubos foram incubados em banho-maria a 39°C durante 15, 30, 60, 120, 240 ou 360 minutos. Ao final desse período, as amostras eram, imediatamente, colocadas em outro banho-maria, a 100°C por seis minutos. A concentração de açúcares redutores nestas amostras foi determinada com DNS como descrito acima. A atividade enzimática relativa foi expressa como nmol de açúcares redutores liberados/g MS incubada/ minuto de incubação e a atividade absoluta expressa em µmol de açúcares redutores liberados/g MS.

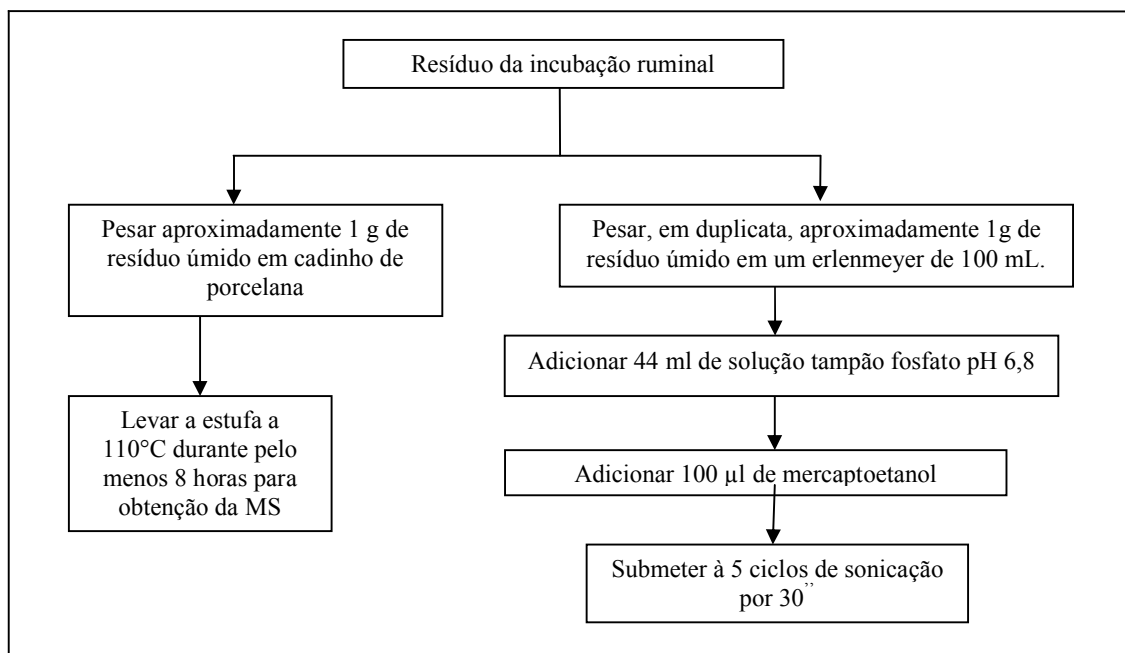


Figura 2 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal

4.3 Aderência bacteriana ruminal

4.3.1 Efeito do pH

Ensaio *in vitro* foram conduzidos para avaliar o efeito do pH sobre a aderência microbiana ruminal e a digestibilidade *in vitro* de amostras de azevém e de cynodon:

Ensaio 1:

Aproximadamente 1g de amostra parcialmente seca e moída (2 mm) de Azevém ou Cynodon foram pesadas e colocadas em saquinhos de poliéster de tamanho 5 x 5 cm, com área superficial de 24 cm² e porosidade 50 µ, selados e submetidos à digestão *in vitro* em meios com pH 5,5, 6,0, 6,5 ou 7,0, durante 24 horas de incubação. Para cada amostra e valor de pH, foram confeccionados 10 saquinhos.

As amostras foram incubadas anaerobicamente em frascos de vidro equipados com válvula de Busen e mantidos em banho-maria a 39°C em um sistema de agitação lenta, numa

relação de 1g de amostra/ 100 mL do meio de incubação. Cada frasco continha 800 ml de uma solução tampão e 200 ml de fluido ruminal (TILLEY; TERRY, 1963), modificado pela ANKOM (Ankom Tecnology Corporation, New York, USA))

O composto de fluido ruminal tamponado foi preparado de modo a ter uma concentração de N de 8 mg/dL (HÄRTER, 2009) (ANEXO C). O líquido ruminal foi coletado de um bovino fistulado, filtrado através de duas camadas de gaze sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39°C.

No momento da incubação, o pH dos meios foram alterados pela adição de ácidos minerais (solução ácida contendo 0,1M de cada: ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico) ou de uma solução de bicarbonato de sódio a 10%. As quantidades adicionadas na hora da incubação foram as necessárias para atingir os valores de pH 5,5; 6,0; 6,5 ou 7,0, medido com um pHâmetro. Depois de 24 horas, a fermentação foi interrompida, os saquinhos foram retirados dos frascos e lavados em água corrente. Após foram colocados em uma solução com NaCl 0,9% durante 5 minutos, para retirada das bactérias não aderidas, lavados novamente com água destilada e secos em estufa à ar forçado a 55°C. A seguir os saquinhos foram pesados para determinação da degradação da MS.

Para cada amostra e valor de pH foi retirado um saquinho para determinação da MS do resíduo de incubação, as demais amostras foram utilizadas para determinação de purinas, a qual seria relacionada com a aderência bacteriana ruminal as partículas.

O teor de purinas foi quantificado nas amostras de resíduo segundo Makkar; Becker (1999). A técnica foi realizada como descrito a seguir:

Para o a confecção do padrão foram utilizadas 25mg de adenina e 25mg de guanina que passaram pelos mesmos processos das amostras .

Foram pesados 200mg de resíduo seco, em duplicata para cada saquinho, e colocados em tubos de 25ml com tampa de rosca (com borracha para vedação).

Foi adicionado 2,5 ml de HClO₄ 2M e as amostras foram então submetidas a banho-maria por 1 hora a 90 – 95°C, agitando-se periodicamente.

Após este processo, foi adicionado 7,5 ml NH₄H₂PO₄ 28,5mM. O material foi novamente submetido a banho-maria, desta vez por 15 minutos a 90 – 95°C. As amostras foram centrifugadas 4000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado.

Uma alíquota de 0,25ml do sobrenadante foi retirada, adicionou-se 4,5ml de NH₄H₂PO₄ 0,2M misturando-se vigorosamente e adicionou-se 0,25ml de AgNO₃ 0,4 M. As amostras foram mantidas a 4°C por um período de 12 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas (4000 x g por 20minutos) descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se

água destilada (4,5ml) com o pH ajustado para 2,0 (adicionando H₂SO₄). A seguir, as amostras foram novamente submetidas a centrifugação a 4000xg por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet foi suspenso em 5ml de HCl 0,5M. Agitou-se vigorosamente e as amostras foram colocadas em banho-maria a 90 – 95°C por 30 minutos (desta vez coberta com condensadores).

Realizou-se uma nova centrifugação (4000 x g por 20 minutos) e absorvância do sobrenadante foi lida a 260nm contra HCl 0,5M (branco).

Ensaio 2:

O procedimento para a fermentação das amostras *in vitro* foi o mesmo do ensaio 1, exceto que, para acidificação do meio de incubação, a concentração dos ácidos minerais foi aumentada para 0,5 M.

Para a estimativa da aderência bacteriana ao substrato, determinou-se o teor de fósforo (P) contido nas amostras residuais.

Foram pesadas aproximadamente 0,2 g do resíduo da incubação em um Becker com capacidade de 20 mL e queimados em mufla à 600° C por três horas. Após, foi adicionado 10 mL de uma solução ácida contendo 3 partes de ácido clorídrico (HCl) 10% e 1 parte de ácido nítrico (HNO₃) 10%, colocados em uma chapa de aquecimento e deixados em fervura até evaporar e restar um volume residual no Becker de aproximadamente 2 mL. Este conteúdo foi transferido, lavando-se com água destilada, para um balão volumétrico de 50 ml e completado o volume com água destilada. Esta solução foi então filtrada em papel de filtração rápida para posterior determinação colorimétrica de fósforo. Para tal, foram pipetados em um tubo de ensaio, 1000 µl do filtrado, 1000 µl de uma solução complexante (ANEXO D) e 100 µl de solução redutora (ANEXO E). Este meio de reação foi mantido durante 20 minutos em temperatura ambiente e a absorvância em 660 nm foi lida contra um branco que incluiu HCl 0,1 N em vez do filtrado. A aderência bacteriana foi expressa como mg de P/g de MS residual.

Ensaio 3:

Foram realizados os mesmos procedimentos descritos no ensaio 2, exceto que nas amostras originais e nos resíduos foi também analisado o teor de FDN. Para tal, as amostras foram submetidas à solução em detergente neutro em saquinhos de poliéster e em autoclave a 110°C durante 40 minutos (SENGER et al, 2008). Posteriormente determinou-se a concentração de P. Este procedimento foi feito para descontar do teor de P total do resíduo,

aquele associado à forragem, insolúvel durante a fermentação. O P associado às bactérias aderidas foi estimado então pela diferença entre o teor de P no resíduo não tratado menos o P do resíduo tratado com solução detergente neutro.

4.3.2 Efeito da concentração de açúcares solúveis

Foram conduzidos quatro ensaios *in vitro* que avaliaram o efeito da concentração de açúcares solúveis sobre a aderência bacteriana e a digestibilidade ruminal *in vitro* de amostras de azevém e cynodon.

Os procedimentos de incubação para fermentação *in vitro* foram os mesmos dos ensaios anteriores, exceto que no lugar da adição de ácidos minerais, os meios de incubação foram modificados pela adição de 10, 20 e 30 mL de uma solução de glicose (10g/dL), ou sem adição de glicose, de maneira que a concentração de açúcares solúveis no meio de incubação fosse de, aproximadamente, 0, 100, 200 e 300 mg de glicose/ dL. A solução tamponante utilizada na fermentação era mais concentrada, para manter o pH acima de 6,2 durante todo o processo (PIWONKA; FIRKINS, 1996) (ANEXO F).

No início e ao final das 24 horas de fermentação foi coletado uma amostra (9 mL) do meio de incubação, sendo adicionado 1mL de uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 20%. A seguir, as amostras foram submetidas a um processo de centrifugação (4000 x g, 20 min), coletada a porção sobrenadante de cada amostra, armazenada e congelada para posterior análise do teor de açúcares solúveis, conforme método descrito por Dubois et al. (1956).

A concentração de açúcares solúveis no meio de incubação no início e ao final da incubação em cada um dos ensaios é apresentada na Tabela 1.

Além da determinação da degradação da MS e FDN das amostras, foi estimada a aderência bacteriana às partículas de forragem a partir do P residual utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente (Ensaio 3 do efeito de pH).

Tabela 1 - Concentração de açúcares solúveis no meio de incubação no início (0 hora) e ao final (24 horas) da incubação em cada ensaio.

[] pretendida de açúcares	<i>Ensaio</i>							
	1		2		3		4	
	0 hora	24 horas	0 hora	24 horas	0 hora	24 horas	0 hora	24 horas
0 mg/dL	18	11	18	11	4	6	16	19
100 mg/dL	107	14	105	15	110	12	105	18
200 mg/dL	255	13	180	18	229	13	231	18
300 mg/dL	369	14	264	15	338	15	328	24

4.4 Atividade de enzimas fibrolíticas bacterianas

4.4.1 Efeito do pH

Foram conduzidos dois ensaios para avaliar o efeito do pH sobre a atividade xilanásica e carboximetilcelulásica de bactérias ruminais. Em cada ensaio aproximadamente 5 g de azevém ou cynodon previamente seco e moído em peneira de 2 mm foram colocados em saquinhos de nylon (porosidade de 50 micras e medindo 10 x 10 cm) selados para posterior incubação. Para cada tipo de amostra foram confeccionados 5 saquinhos, os quais foram incubados durante 24 horas no rúmen de um bovino alimentado à base de azevém. No momento da incubação os saquinhos foram colocados dentro de sacos maiores de tecido sintético com grande porosidade presos a uma peça de metal, com a função de manter os sacos na parte ventral do rúmen, e fixados externamente com uma corda de nylon.

Ao final da incubação os saquinhos foram retirados do rúmen, lavados em água corrente, submersos em solução salina 0,9% durante aproximadamente 10 minutos e lavados com água destilada. O conteúdo residual dos saquinhos contendo o mesmo tipo de amostra foi misturado e processado como descrito na Figura 3.

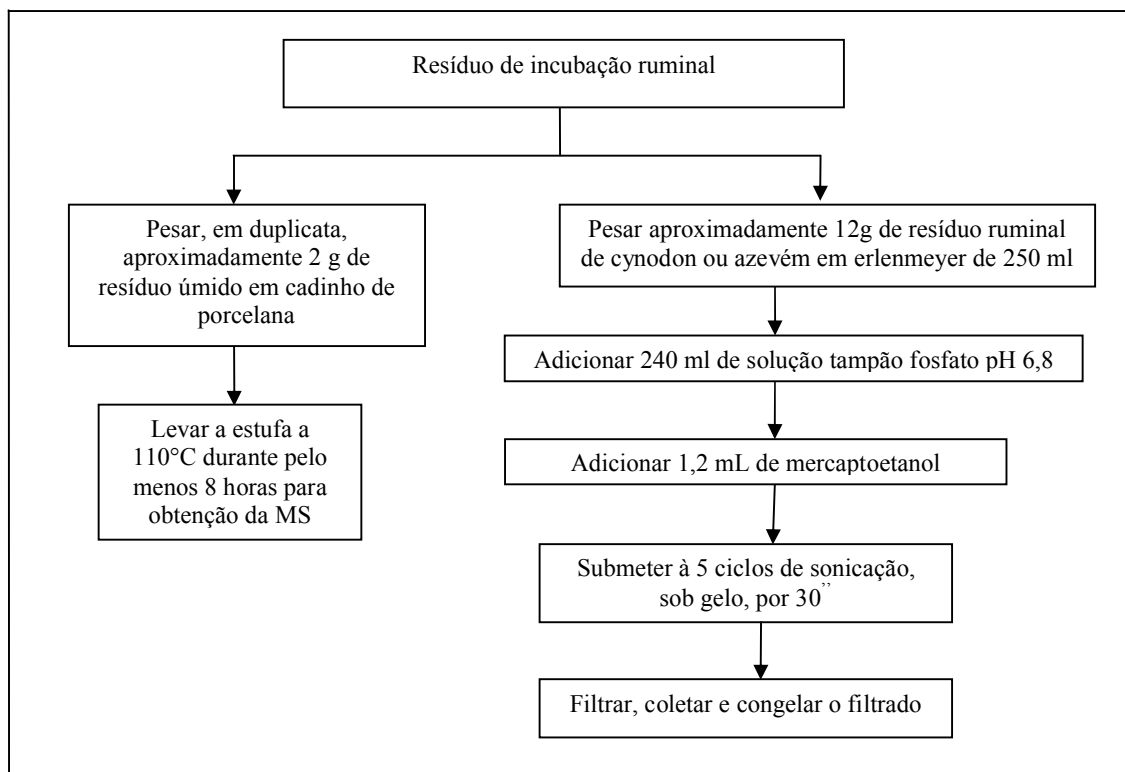


Figura 3 -- Fluxograma do processo de extração de enzimas

No dia seguinte ao processo de extração das enzimas foi realizada a incubação do filtrado enzimático com os substratos xilana (SIGMA – Xilano obtido de madeira de bétula) ou CMC 2% (p/v) a diferentes pHs iniciais.

Os substratos foram solubilizados, com uso de aquecimento, em solução tampão fosfato com pH modificado pela adição de ácidos minerais (composto por solução ácida contendo 0,5 M de cada: ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico) ou de uma solução de bicarbonato de sódio a 10%. As quantidades adicionadas à solução tampão foram as necessárias para que o pH do meio de reação enzima+substrato fosse de 5,5; 6,0; 6,5 ou 7,0.

Pipetou-se, em tubos de ensaio, 2 mL de enzima e 4 mL dos substratos, agitou-se em vortex e o material foi incubado em banho-maria a 39° C por um período de 240 minutos em um sistema de agitação lenta. Para cada amostra e valor de pH foram utilizadas 10 repetições de tubo. Incubou-se, também, 2 mL de enzima com 4 mL de solução tampão sem substrato (controle 1) ou 2 mL de tampão, sem conter enzimas, com 4 mL dos substratos (controle 2), ambas combinações em triplicatas. Ao término da incubação todos os tubos foram submetidos a banho-maria em água fervente, durante 6 minutos. O conteúdo dos tubos foram então

armazenados em congelador para posterior determinação da concentração de açúcares redutores pelo método DNS. A atividade relativa das enzimas foi expressa como nmol açúcares redutores liberados/g de MS residual/minuto de incubação, descontando-se a concentração de açúcares das amostras em branco (soma da concentração dos açúcares nos controles 1 e 2).

4.4.2 Efeito dos açúcares solúveis

Foram realizados dois ensaios seguindo os mesmos procedimentos de incubação ruminal, extração enzimática, incubação enzima:substrato e determinação da atividade enzimática descritos acima, exceto que os substratos foram diluídos em solução tampão fosfato pH 6,8 sem adição de glicose ou contendo 100, 200 ou 300 mg/dL de glicose. Os tubos controle incluíram 2 mL de solução tampão sem glicose com 4 mL das soluções com substratos (controle 1) ou 2 mL de extrato enzimático com 4 mL de solução tampão sem glicose (controle 2).

4.5 Análise estatística

Os resultados de atividade enzimática nos diferentes métodos de extração da enzima foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A atividade média dos ensaios utilizando resíduo fresco ou previamente congelado para extração enzimática foi comparada pelo teste “F”.

Para o ensaio metodológico que testou diferentes tempos de incubação os dados foram submetidos à análise de variância seguida pela análise de regressão, e a comparação entre os substratos foi feita através do teste “F”.

Os dados de degradabilidade da MS ou FDN em diferentes pHs foram submetidos à análise de variância que incluiu os efeitos da espécie forrageira, do pH e das suas interações. Adicionalmente, os efeitos do pH sobre a degradabilidade foram também analisados por regressão, separadamente por ensaio. Os dados de aderência microbiana foram analisados da mesma forma.

Os efeitos da concentração de açúcares solúveis sobre a degradabilidade e a aderência microbiana foram analisados por regressão, considerando-se a concentração real de açúcares no momento da incubação.

Os dados de atividade enzimática em diferentes pHs foram submetidos à análise de variância que incluiu os efeitos da espécie forrageira, do pH e das suas interações. Os efeitos do pH para cada tipo de amostra foram também analisados por regressão. Os dados foram analisados, separadamente, por ensaio.

No ensaio que testou a atividade de enzimas em diferentes concentrações de açúcares solúveis os resultados foram submetidos à análise de variância que incluiu os efeitos da espécie forrageira, da concentração de açúcares solúveis no meio e das suas interações. O efeito dos açúcares para cada tipo de amostra foi também analisado por regressão.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o procedimento GLM do programa estatístico SAS (2001).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação de metodologias para determinação da atividade enzimática microbiana ruminal

5.1.1 Efeito do método de extração de enzimas e do congelamento

A atividade enzimática de bactérias fibrolíticas em resíduos de amostras de forragem incubadas no rúmen e extraídas por diferentes tratamentos, submetidas ou não a congelamento prévio são apresentadas na Figura 4.

Houve interação entre método de extração e congelamento ($P < 0,01$). No ensaio com amostras de resíduo ruminal congelado o método de extração de enzimas por sonicação apresentou atividade inferior aos demais ($P < 0,01$). Porém, com o uso de material fresco, a menor atividade foi observada no material extraído com sonicação + lisozima ($P < 0,01$). A atividade mais alta foi obtida no material tratado somente com sonicação ($P < 0,01$), mas que não diferiu significativamente do tratamento controle ou somente lisozima, que resultaram em atividade fibrolítica intermediária.

O processamento das amostras frescas resultou numa maior atividade de enzimas, quando comparadas aquelas processadas após o congelamento ($P > 0,01$). Enzimas provenientes de resíduo ruminal fresco apresentaram uma atividade em torno de quatro vezes mais alta que a atividade de enzimas oriunda do material congelado.

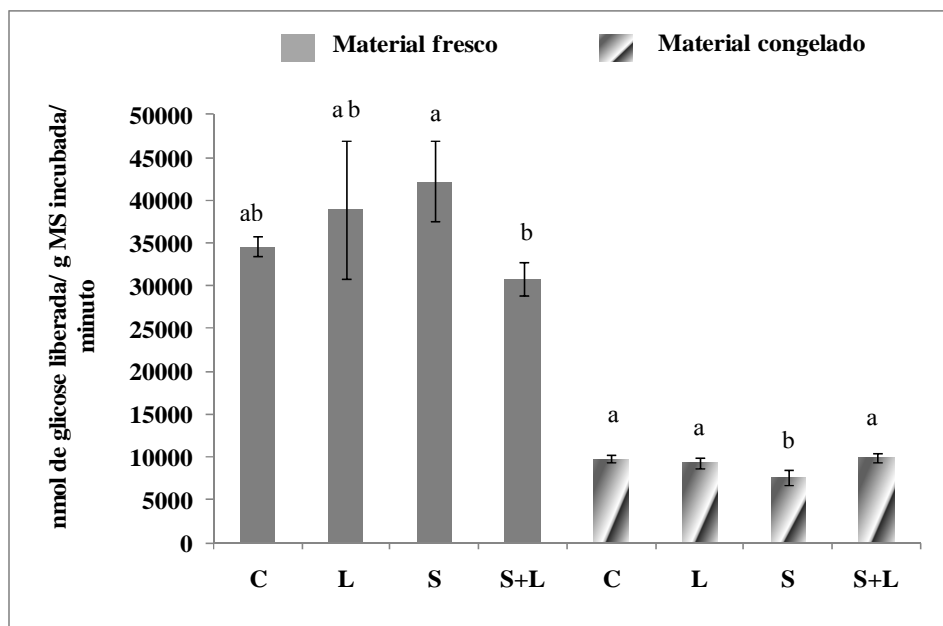


Figura 4 - Atividade enzimática de bactérias fibrolíticas ruminais, extraídas de resíduo ruminal fresco (n=74) ou congelado (n=64) pelos métodos de sonicação (S), lisozima (L), sonicação + lisozima (SL) ou sem tratamento prévio - controle (C). O desvio padrão é representado por barras. Letras diferentes sobre as colunas indicam que os métodos diferem entre si dentro dos ensaios pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.1.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação

Os efeitos do tipo de substrato e tempo de incubação sobre a atividade absoluta das enzimas bacterianas ruminais são apresentados na Figura 5.

Tanto com o uso da CMC quanto da celulose como substrato enzimático, a atividade absoluta aumentou linearmente ($P < 0,01$) com o tempo de incubação. No entanto, enzimas incubadas com CMC liberaram maiores quantidades de açúcares redutores quando comparadas as incubadas com celulose ($P < 0,01$).

A atividade enzimática relativa, de outro modo, diminuiu exponencialmente com o aumento do tempo de incubação ($P < 0,01$). Essa redução ocorreu a taxas mais altas nos primeiros minutos de incubação e teve uma tendência a se estabilizar a partir de 240 minutos (Figura 6).

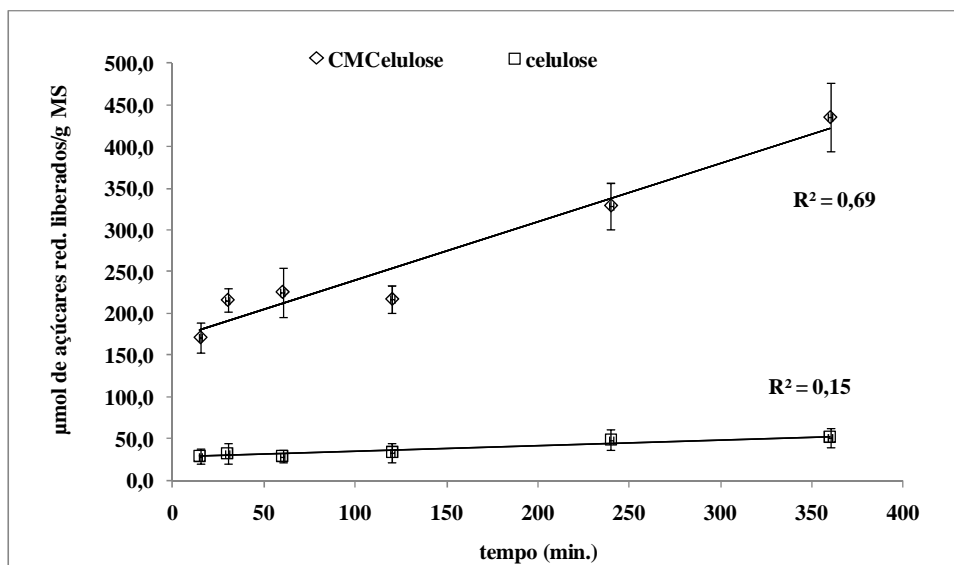


Figura 5 - Atividade enzimática absoluta de bactérias ruminais utilizando celulose (n=70) ou carboximetilcelulose (n=70) como substrato, aos 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos de incubação de enzima:substrato. As barras representam o desvio padrão das médias. Probabilidade da análise de regressão: CMC e celulose, efeito linear ($P < 0,01$)

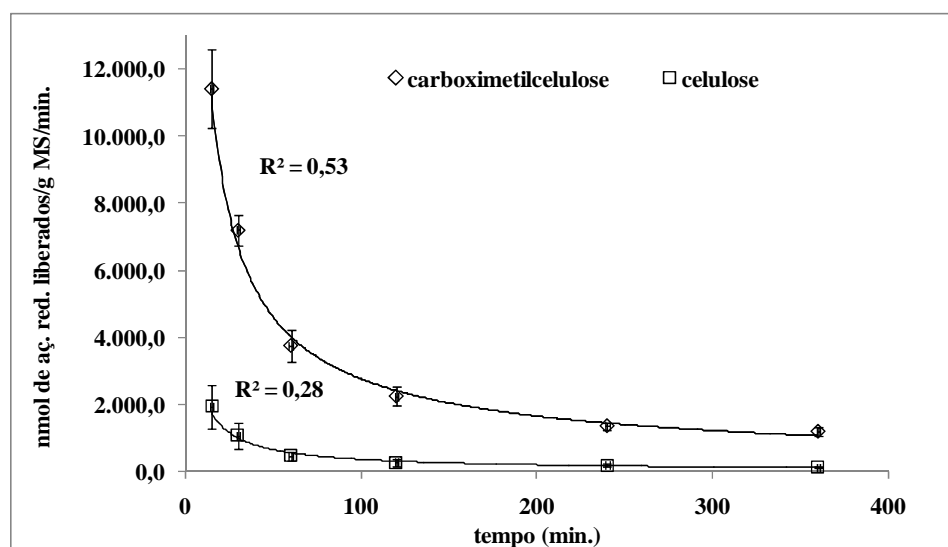


Figura 6 - Atividade enzimática relativa de bactérias ruminais utilizando celulose (n=70) ou carboximetilcelulose (n=70) como substrato, aos 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos de incubação de enzima:substrato. As barras representam o desvio padrão das médias. OBS: O valor de R^2 foi obtido pela análise de regressão linear do logaritmo

(base 10) dos valores de atividade. Probabilidade da análise de regressão: CMC e celulose ($P < 0,01$).

5.2 Aderência bacteriana ruminal

5.2.1 Efeito do pH

Na Figura 7 são apresentados os dados de aderência bacteriana em amostras de resíduo de cynodon e azevém incubados *in vitro* a diferentes pHs iniciais por 24 horas obtidos no ensaio 1 (i.e. estimado pelas purinas). Houve interação entre amostra e pH ($P < 0,01$). Para amostras de azevém o pH não exerceu efeito sobre a aderência bacteriana mas a adesão foi afetada pela alteração do pH ($P < 0,01$) nas amostras de cynodon. No entanto, esse efeito não se ajustou aos modelos de regressão linear ou quadrático. Os dados de aderência bacteriana em amostras de azevém e cynodon a diferentes pHs, estimados pelo teor de P no resíduo, calculados sem correção (ensaio 2) e com correção (ensaio 3) para o P insolúvel da forragem, são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

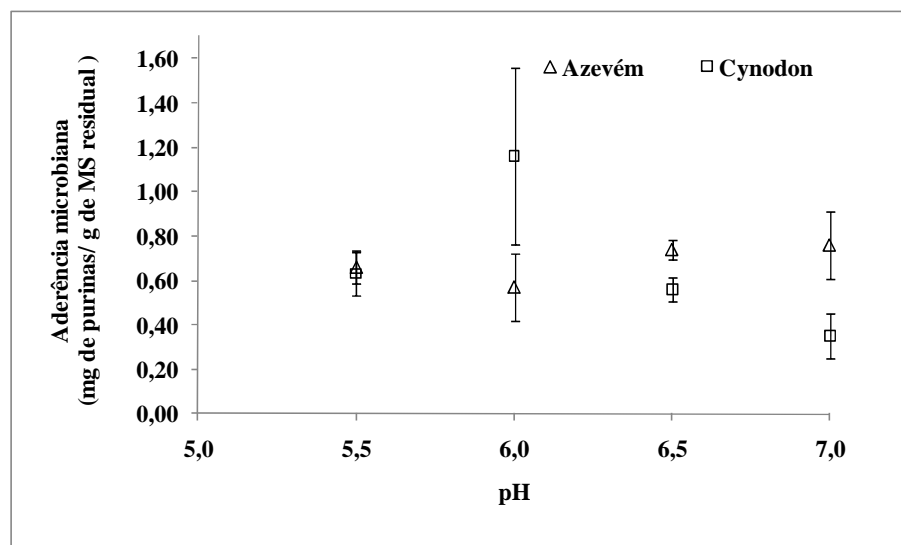


Figura 7 - Aderência microbiana (purinas) sobre o resíduo de cynodon (n=30) e azevém (n=30) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 1). Probabilidade da

análise de regressão: não significativa. As barras representam o desvio padrão das médias.

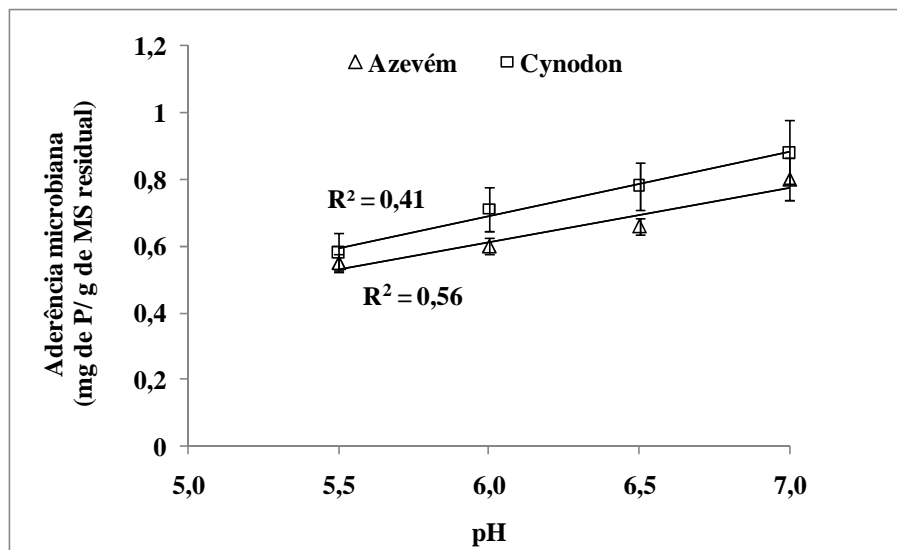


Figura 8 - Aderência microbiana (fósforo) sobre o resíduo de cynodon (n=28) e azevém (n=32) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 2), sem correção para o teor de P insolúvel das forragens. Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

Em ambos os ensaios o aumento do pH exerceu um efeito linear e positivo sobre a aderência ($P < 0,01$), e não houve interação entre amostra e pH.

Porém, no ensaio em que a adesão bacteriana não foi corrigida para o teor de P contido no material após processamento com solução em detergente neutro, a aderência foi maior nas amostras de cynodon em relação às amostras de azevém ($P < 0,05$). Com a correção, as amostras de azevém apresentaram maior quantidade de P aderido ($P < 0,01$) em comparação as amostras de cynodon.

A degradabilidade da MS aumentou linearmente com o aumento do pH do meio de incubação ($P < 0,01$), nos ensaios 1 e 2 (Figuras 10 e 11, respectivamente). Em ambos os ensaios a degradação média da MS do azevém foi maior que a degradação do cynodon ($P < 0,01$).

O aumento do pH do meio exerceu um efeito linear e positivo sobre a degradação da FDN (ensaio 3) ($P < 0,01$). Contudo, este efeito foi mais evidente nas amostras de azevém que nas amostras de cynodon e a degradação da FDN do azevém foi mais alta que do cynodon ($P < 0,01$) (Figura 12).

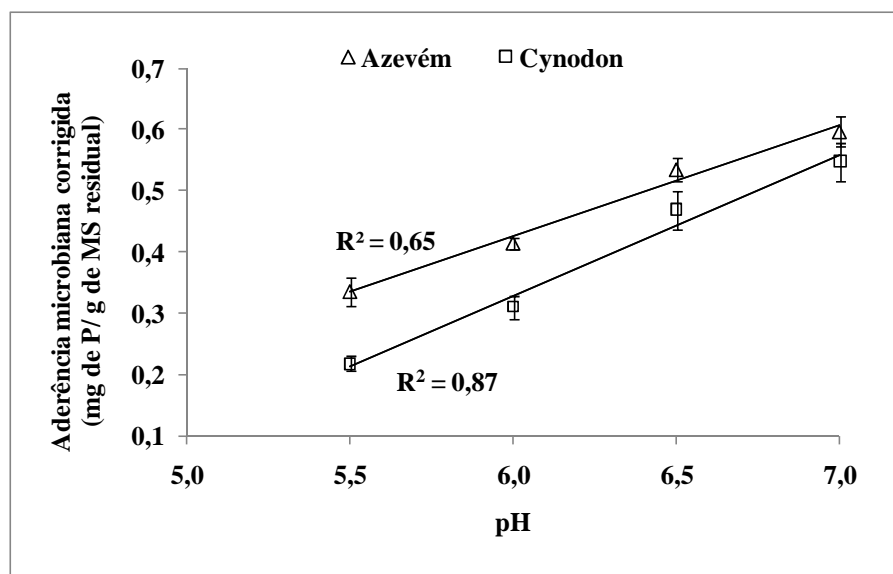


Figura 9 - Aderência microbiana corrigida (fósforo) sobre o resíduo de cynodon ($n=32$) e azevém ($n=32$) incubados durante 24 horas a diferentes pHs (ensaio 3). Correção para o teor de P insolúvel das forragens após a fermentação. Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

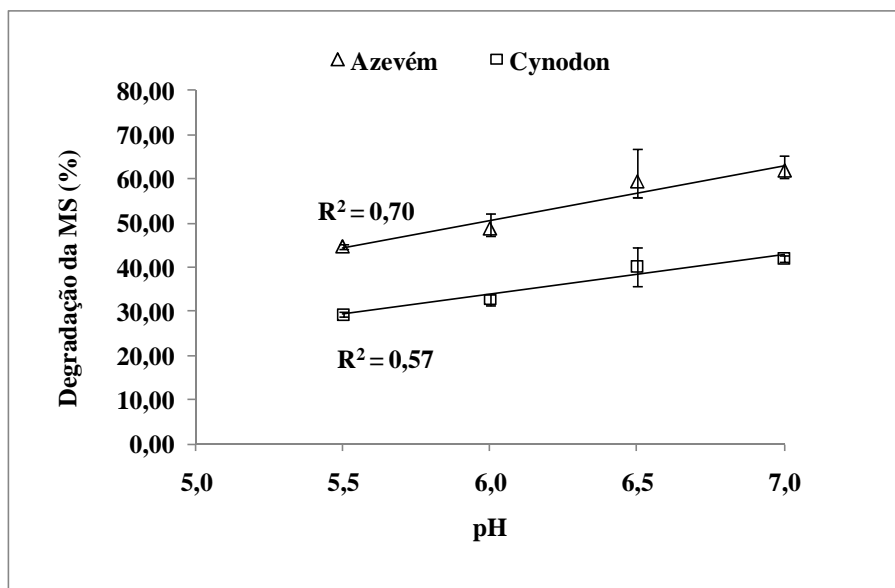


Figura 10 - Degradabilidade da MS em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 1). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

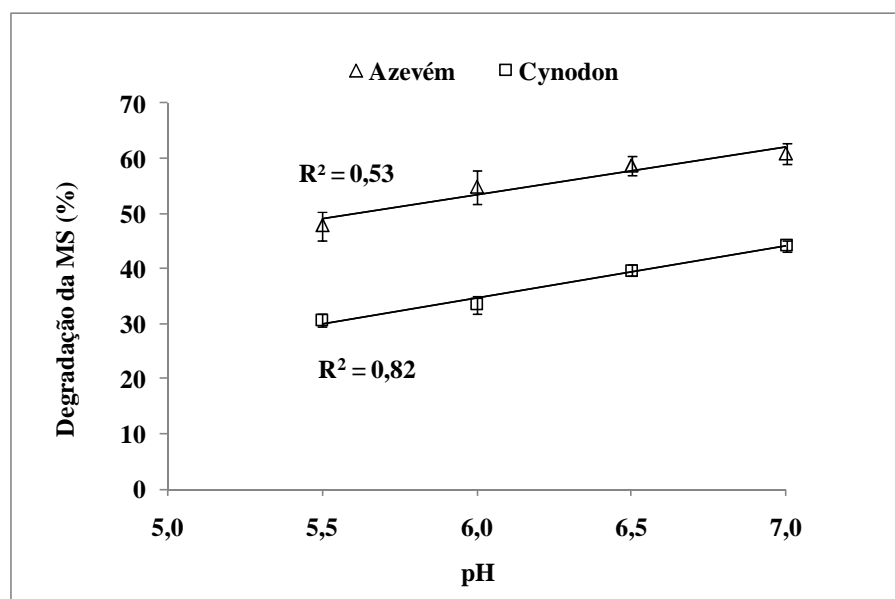


Figura 11 - Degradabilidade da MS em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 2). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

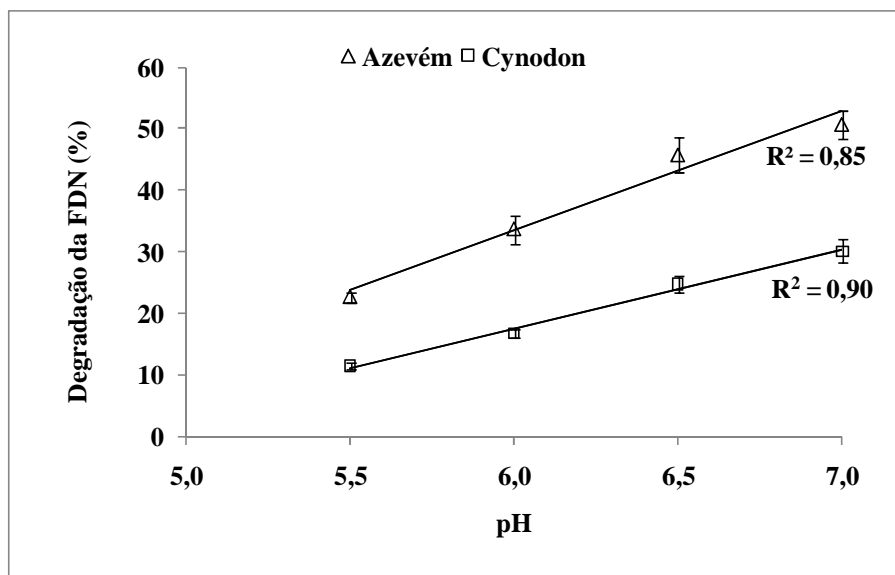


Figura 12 - Degradabilidade da FDN em amostras de azevém (n=32) e cynodon (n=32) após 24 horas de fermentação a diferentes pHs (ensaio 3). Probabilidade da análise de regressão: azevém e cynodon, efeito linear ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

5.2.2 Efeito dos açúcares solúveis

A aderência microbiana às partículas de forragem diminuiu linearmente com o aumento da concentração inicial de açúcares solúveis no meio de fermentação ($P < 0,01$), tanto para amostras de cynodon (Figura 13) como para amostras de azevém (Figura 14).

O aumento na concentração de açúcares solúveis no meio de incubação, ao início da fermentação, não influenciou a digestibilidade da FDN de amostras de cynodon (Figura 15) e azevém (Figura 16).

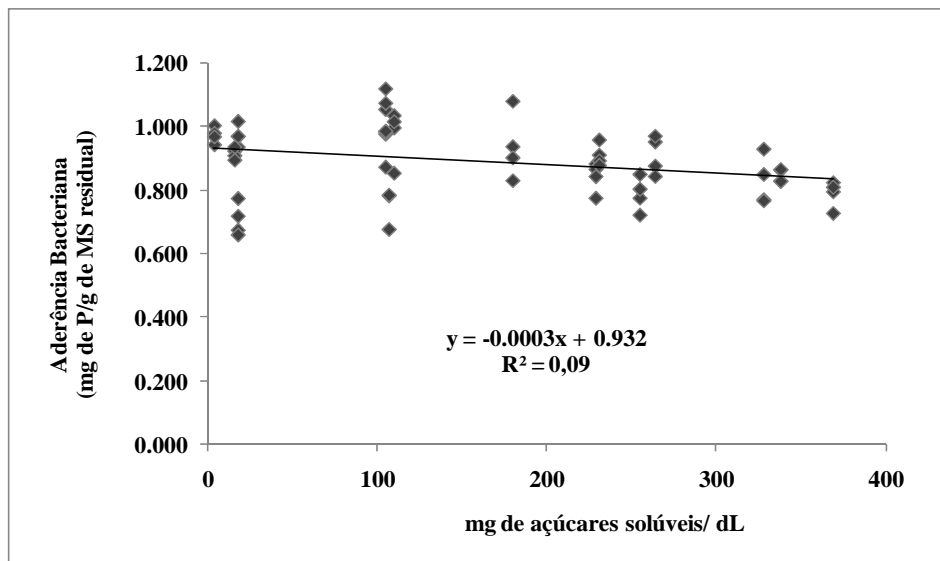


Figura 13 - Aderência bacteriana (fósforo) sobre o resíduo de cynodon (n=63) incubado durante 24 horas com diferentes concentrações iniciais de glicose. Probabilidade da análise de regressão: efeito linear (P<0,01).

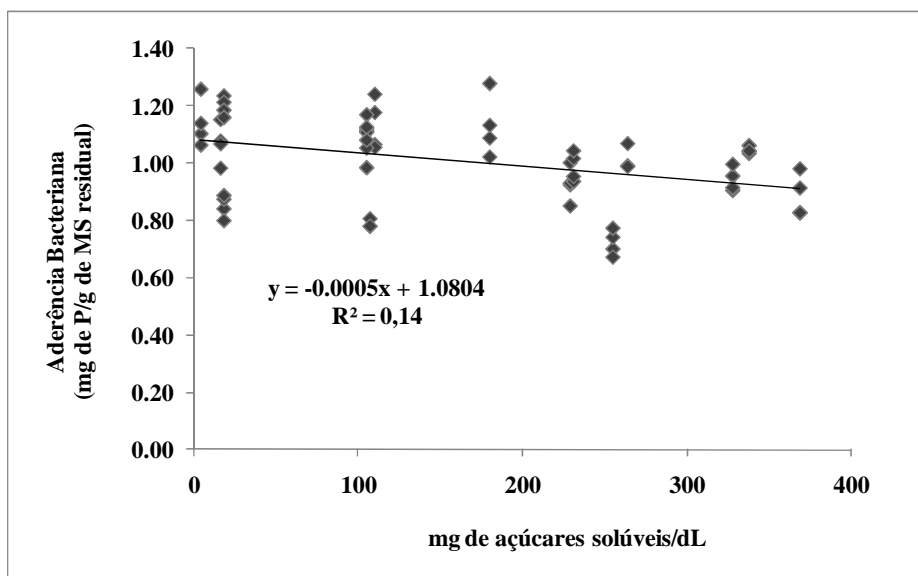


Figura 14 - Aderência bacteriana (fósforo) sobre o resíduo de azevém (n=63) incubado durante 24 horas com diferentes concentrações iniciais de glicose. Probabilidade da análise de regressão: efeito linear (P<0,01).

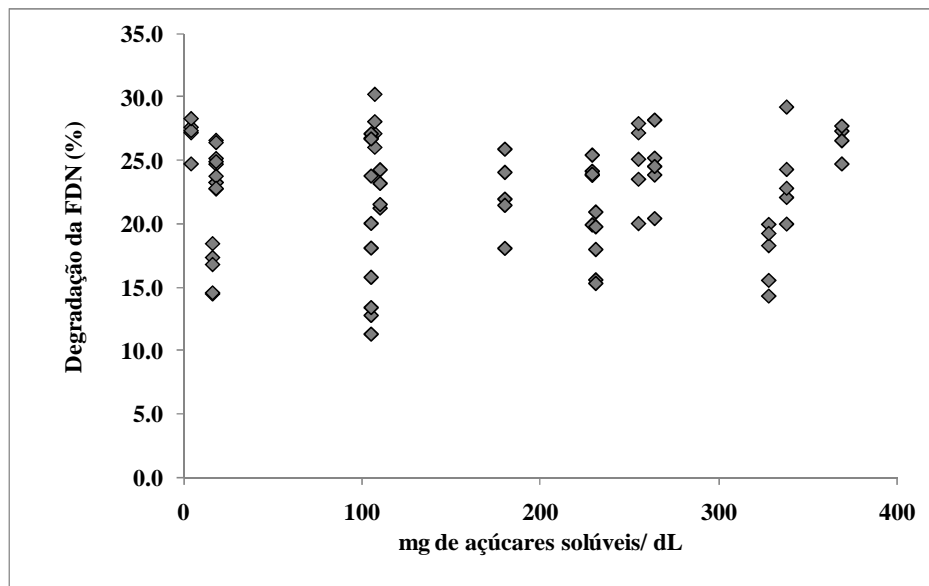


Figura 15 – Degradabilidade da FDN em amostras de cynodon (n=77) após 24 horas de fermentação a diferentes concentrações iniciais de açúcares solúveis. Probabilidade da análise de regressão: não significativo ($P>0,05$).

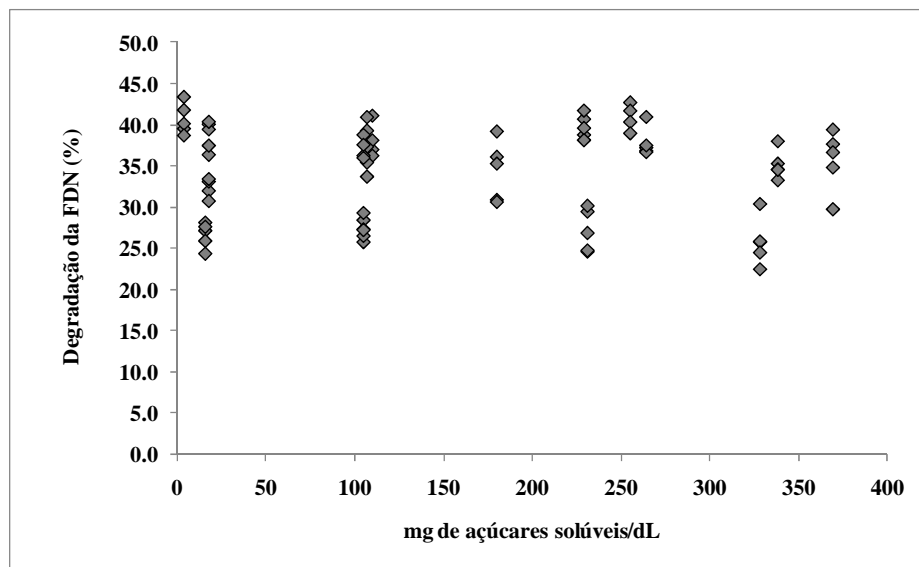


Figura 16 - Degradabilidade da FDN em amostras de azevém (n=77) após 24 horas de fermentação a diferentes concentrações iniciais de açúcares solúveis. Probabilidade da análise de regressão: não significativo ($P>0,05$).

5.3 Atividade de enzimas fibrolíticas bacterianas

5.3.1 Efeito do pH

No primeiro ensaio, o pH exerceu um efeito quadrático sobre a atividade de enzimas fibrolíticas extraídas de resíduo de azevém, incubadas tanto com xilana como com CMC ($P < 0,01$) (Figura 17).

Com o aumento do pH a atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de cynodon apresentou variação linearmente negativa quando incubadas com xilana ($P < 0,01$), e variação quadrática quando incubadas com CMC ($P < 0,01$) (Figura 18). Para ambas enzimas e ambos substratos, maiores valores de atividade enzimática foram observados na faixa de pH 6,0.

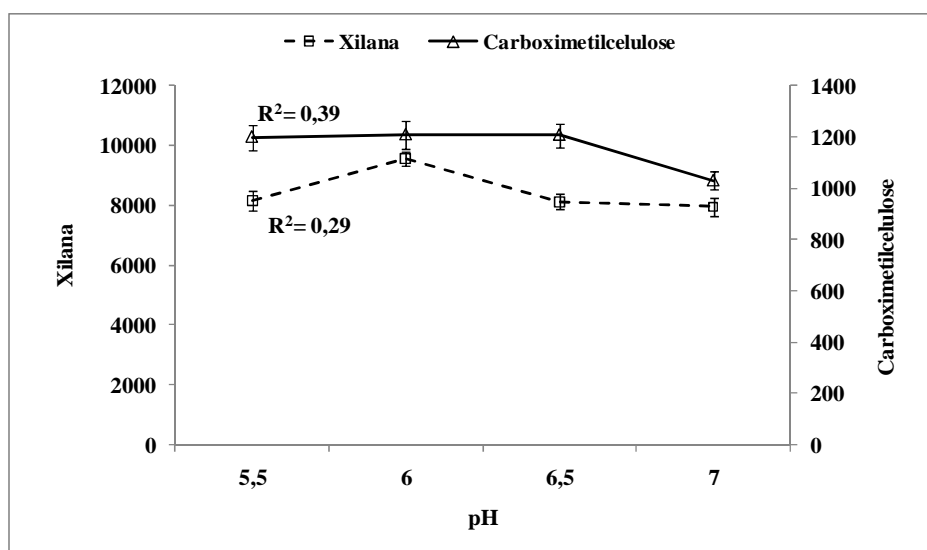


Figura 17 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (1º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático ($P < 0,01$); CMC, efeito quadrático ($P < 0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

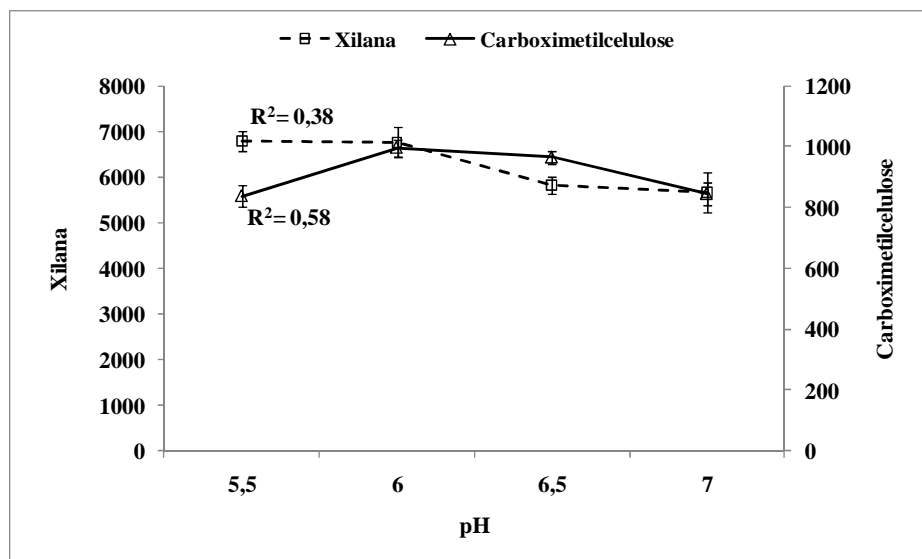


Figura 18 – Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (1º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito linear ($P<0,01$); CMC, efeito quadrático ($P<0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

No segundo ensaio, observou-se um efeito quadrático do pH sobre a atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém incubadas com xilana ($P<0,01$) (Figura 19). Nas enzimas incubadas com CMC, foi observado efeito do pH sobre a atividade enzimática ($P<0,01$), no entanto esse efeito não se ajustou aos modelos de regressão linear ou quadrático.

A atividade de enzimas bacterianas extraídas de cynodon, no segundo ensaio, apresentaram uma variação quadrática em resposta a alteração do pH do meio de incubação ($P<0,01$) (Figura 20). O pico da atividade foi observado em pH 6,0, diminuindo gradativamente até pH 7,0. Este efeito foi observado em enzimas incubadas com xilana e CMC.

Na figura 21 é apresentada a média da atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém ou cynodon nos dois ensaios testando pH. Observou-se que a atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém foi maior que a atividade de enzimas extraídas de resíduo de cynodon ($P<0,01$).

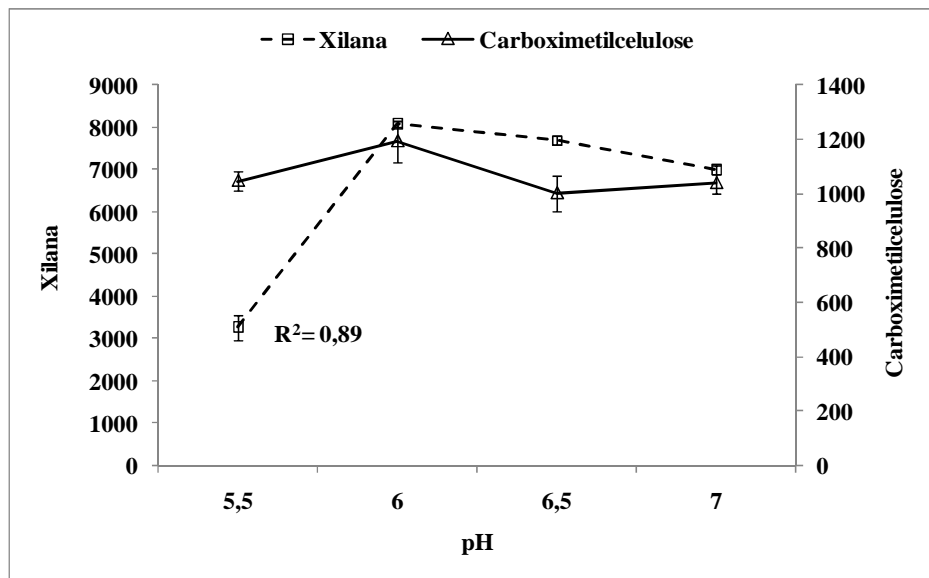


Figura 19 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (2º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático(P<0,01). As barras representam o desvio padrão das médias.

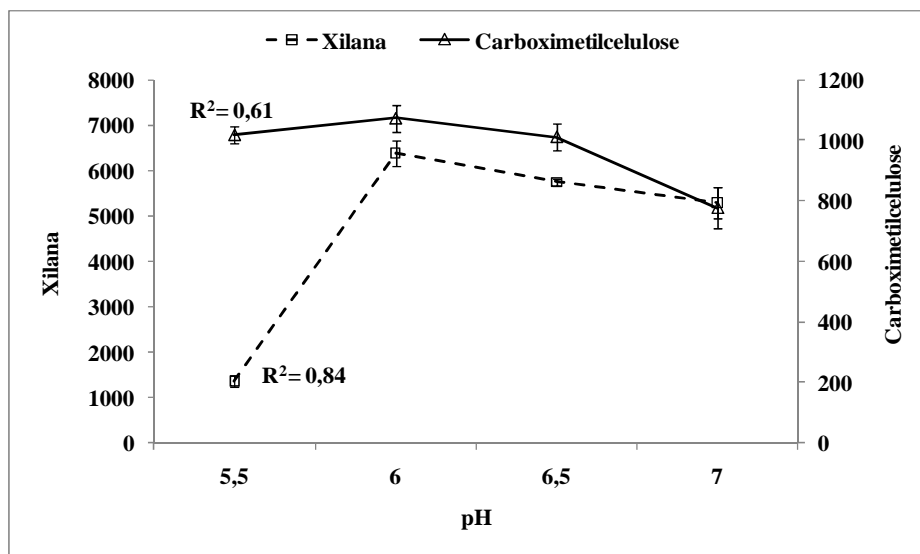


Figura 20 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas a diferentes pHs com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) (2º ensaio).

Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático ($P<0,01$); CMC, efeito quadrático($P<0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

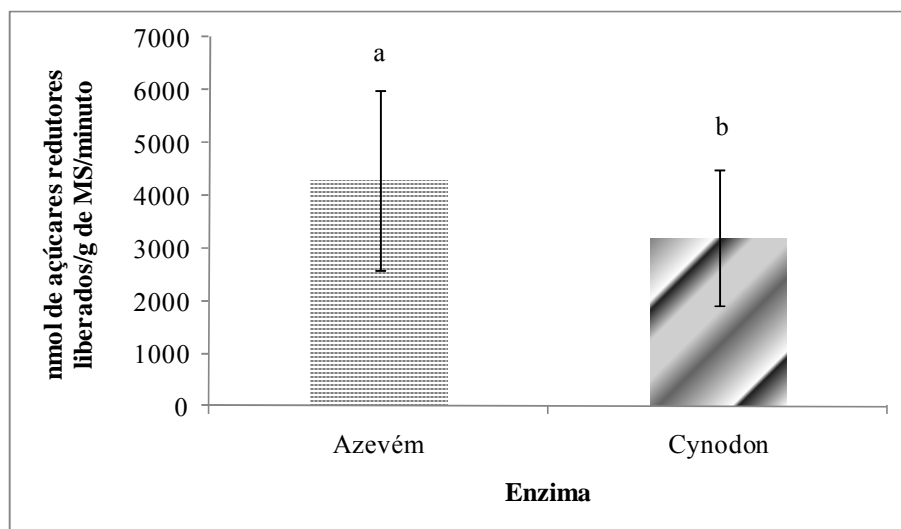


Figura 21 - Atividade fibrolítica média de enzimas bacterianas extraídas de resíduo ruminal de cynodon (n=159) ou azevém (n=169) incubadas a diferentes pHs. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as enzimas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão das médias.

5.3.2 Efeito dos açúcares solúveis

No primeiro ensaio, a atividade enzimática de bactérias ruminais extraídas de resíduo de azevém, incubadas com xilana ou CMC apresentou variação quadrática em resposta a inclusão de níveis crescentes de glicose ao substrato ($P<0,01$). O pico de atividade, para ambos substratos, foi observado com a inclusão de 200 mg de glicose/dL de substrato, diminuindo bruscamente com a adição de 300 mg/dL (Figura 22).

Avaliando-se a atividade de enzimas extraídas de resíduo de cynodon, o efeito da inclusão de glicose ao substrato foi quadrático para ambos os substratos ($P<0,01$) e o pico da atividade também ocorreu com a inclusão de 200 mg de glicose/ dL de substrato(Figura 23). A atividade das enzimas incubadas com xilana reduziu bruscamente no maior nível de inclusão de glicose. No entanto, para enzimas incubadas com CMC a atividade pareceu se estabilizar quando se adicionou 300 mg de glicose/ dL de substrato.

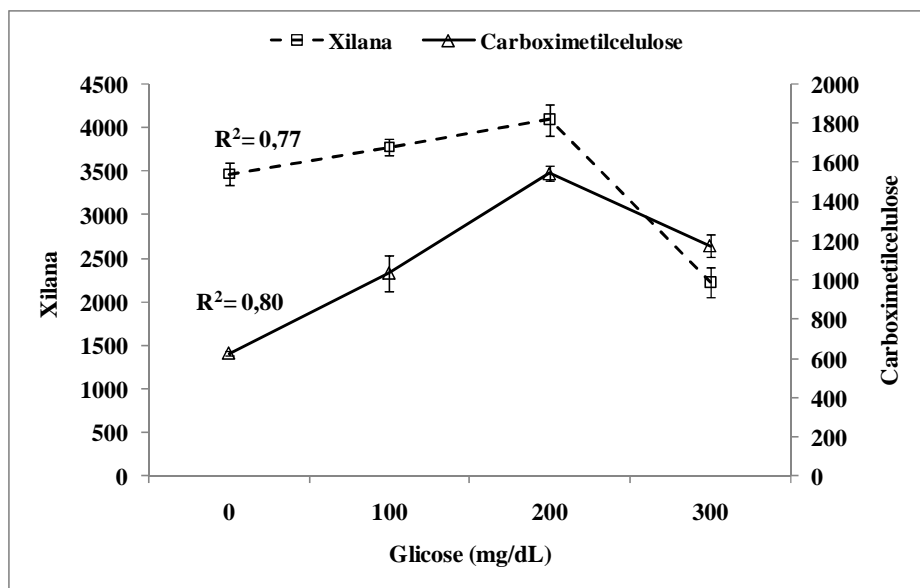


Figura 22 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas com xilana (n=39) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (1º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático ($P<0,01$); CMC, efeito quadrático ($P<0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

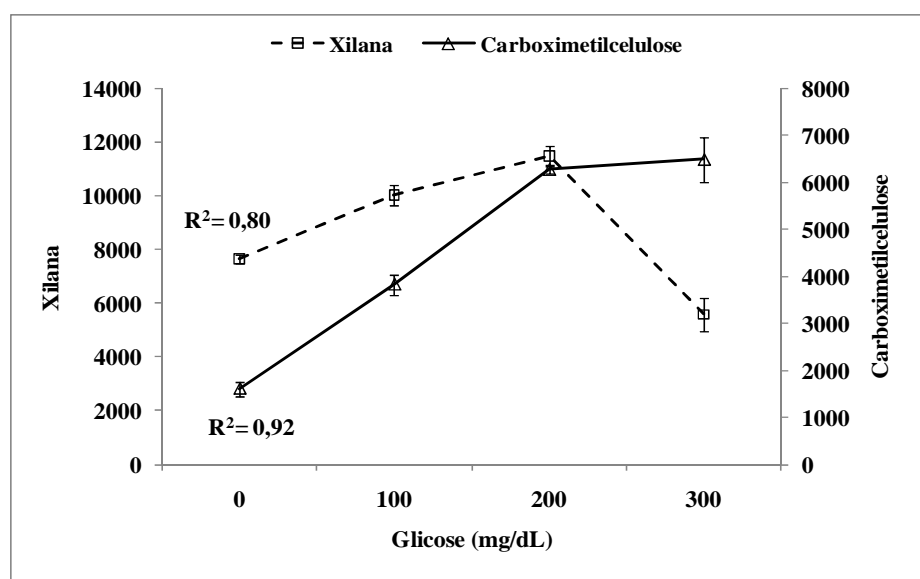


Figura 23 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas com xilana (n=40) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes

concentrações de glicose ao substrato (1º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático ($P<0,01$); CMC, efeito quadrático($P<0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

O segundo ensaio realizado para determinação da atividade enzimática com uso de diferentes concentrações de açúcares mostrou que enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém apresentaram variação quadrática com o aumento da concentração de açúcares no meio, para o uso de ambos os substratos ($P<0,01$) (Figura 24). A atividade foi mais alta quando se adicionou 200 mg de glicose/dL de substrato.

O aumento da concentração de açúcares no meio exerceu um efeito quadrático sobre a atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de cynodon incubadas com CMC ($P<0,05$), no entanto, para enzimas incubadas com xilana o efeito foi linear ($P<0,01$) (Figura 25).

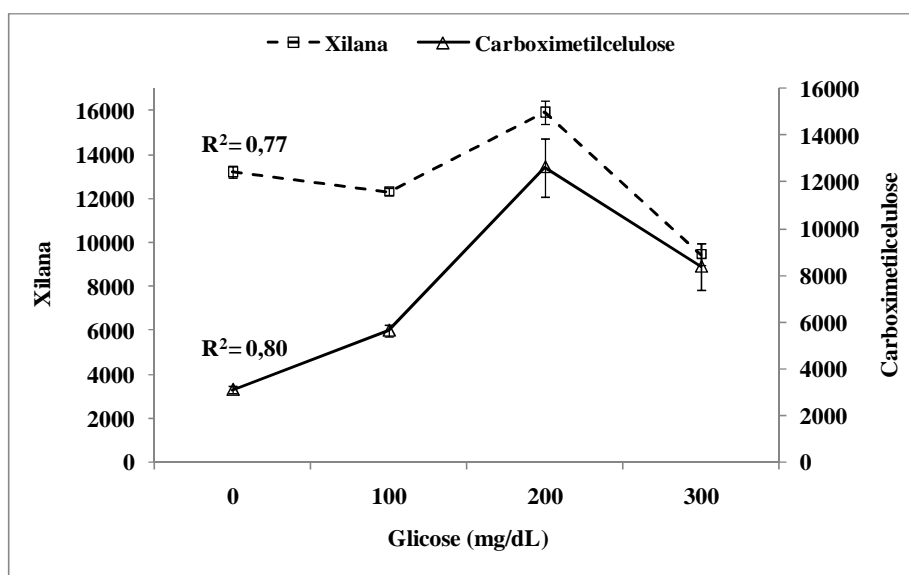


Figura 24 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de azevém, incubadas com xilana (n=32) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (2º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito quadrático ($P<0,01$); CMC, efeito quadrático($P<0,01$). As barras representam o desvio padrão das médias.

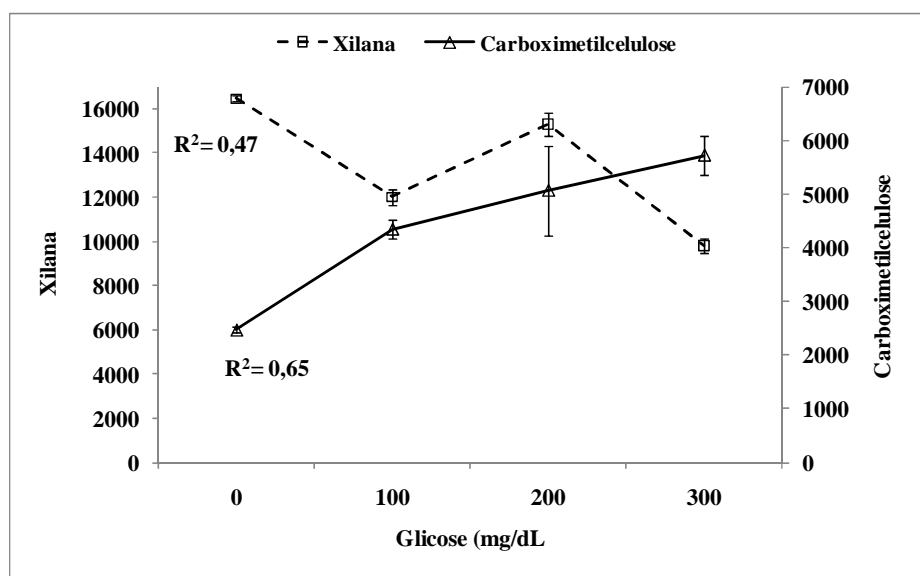


Figura 25 - Atividade fibrolítica de enzimas bacterianas (nmol de açúcares redutores liberados/g de MS/minuto) extraídas de resíduo ruminal de cynodon, incubadas com xilana (n=32) ou Carboximetilcelulose (n=40) adicionando-se diferentes concentrações de glicose ao substrato (2º ensaio). Probabilidade da análise de regressão: xilana, efeito linear ($P < 0,01$); CMC, efeito quadrático ($P < 0,05$). As barras representam o desvio padrão das médias.

Na figura 26 é apresentada a média da atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém ou cynodon nos dois ensaios a diferentes concentrações de açúcares. Similarmente aos resultados encontrados nos ensaios de pH, observou-se que a atividade de enzimas bacterianas extraídas de resíduo de azevém foi maior que a atividade de enzimas extraídas de resíduo de cynodon ($P < 0,01$).

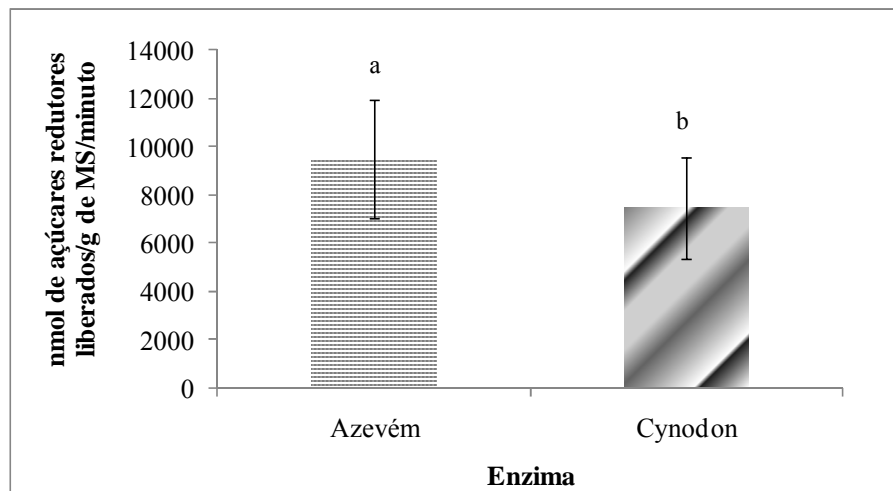


Figura 26 - Atividade fibrolítica média de enzimas bacterianas extraídas de resíduo ruminal de cynodon (n=152) ou azevém (n=151) incubadas com diferentes concentrações de glicose. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as enzimas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologias

6.1.1 Efeito do método de extração e do congelamento sobre a atividade enzimática

Comparado ao uso de resíduo fresco, a extração em resíduo armazenado em congelador reduziu consideravelmente a atividade enzimática bacteriana. Hristov et al (1999), já haviam observado que no método de extração de enzimas por lizozima, o congelamento inativou em 22% e 52% a atividade da amilase e xilanase respectivamente, quando comparada à atividade destas enzimas no fluido ruminal fresco. Essa redução na atividade enzimática proveniente de material congelado pode ocorrer devido a oxidação que estas enzimas sofrem durante o período de congelamento.

No presente estudo, nenhuma das metodologias testadas para extrair as enzimas do resíduo de incubação fresco foi claramente mais eficiente que o tratamento controle (sem tratamento). O tratamento somente com sonicação, no entanto, tendeu a ser mais eficiente e mais preciso que os demais métodos. Estes resultados divergem dos encontrados por Silva et al. (1987). Eles testaram as atividades da carboximetilcelulase e da glutamato desidrogenase e verificaram que enzimas extraídas por lizozima apresentaram maior atividade em relação as enzimas extraídas por sonicação. Hristov et al (1999) também observaram que a atividade de enzimas extraídas com uso de lizozima apresentaram atividades mais altas quando comparadas a extração por sonicação, lizozima + EDTA ou controle (sem tratamento prévio), utilizando amostras frescas.

A explicação para a discrepância de resultados entre o presente estudo e os demais não é clara. Entretanto, no presente estudo, em função da sua alta toxicidade, foi excluído o uso de tetracloreto de carbono na solução utilizada durante o processo de extração com lizozima. Adicionalmente, enquanto nos estudos de Silva e Hristov não utilizaram antioxidante no processo de extração, no presente estudo foi utilizado mercaptoetanol durante a extração enzimática, tanto por lizozima quanto por sonicação.

6.1.2 Efeito do tipo de substrato e tempo de incubação sobre a atividade enzimática

A hidrólise enzimática do polissacarídeo depende da interação da enzima com o substrato em solução aquosa. Desse modo, em ensaios *in vitro* a solubilidade do substrato interfere na medida da atividade enzimática das bactérias ruminais. Substratos insolúveis como celulose são pouco hidrolisados e, como verificado no presente estudo, são inadequados para uso nesta técnica. Por outro lado CMC e, principalmente xilana, são altamente solúveis e rapidamente hidrolisados pelos extratos enzimáticos.

Não existe uma metodologia padrão descrita na literatura e vários métodos tem sido utilizados para medir, assim como para expressar a atividade de enzimas bacterianas ruminais. Isto, muitas vezes, dificulta a comparação de resultados. Por exemplo, a forma mais comum de expressão da atividade enzimática verificada na literatura é a relativa ao tempo de incubação (SILVA et al., 1987; MARTIN; MICHALET-DOREAU 1995; HUHTANEN, P., et al, 1998; HRISTOV, et al 1999; MICHALET-DOREAU et al., 2001; MORGAVI, et al 2004). No entanto, Hristov (1999), por exemplo, incubaram a enzima com o substrato durante 120 minutos, Michalet-Doreau et al. (2001); Martin e Michalet-Doreau (1995) utilizaram 60 minutos de incubação e Piwonka; Firkins (1993) procederam incubação durante 30 minutos. Foi observado no presente estudo que tanto a atividade absoluta quanto a relativa das enzimas bacterianas variam com o tempo, e que esta última tende a estabilizar somente após 240 minutos de incubação.

6.1.3 Métodos para estimar aderência bacteriana ruminal

Quando a adesão microbiana foi estimada pelo método das purinas, os resultados apresentaram alta variabilidade e não foi possível detectar um efeito claro do pH. Kozloski et al. (2008), que usaram um método gravimétrico, também não observaram efeito de pH sobre a adesão bacteriana sobre amostras de gramíneas forrageiras.

A estimativa da aderência pelo P, por outro lado, foi mais precisa e permitiu verificar claramente o efeito de pH no presente estudo. Essa diferença nos resultados entre metodologias pode ser a atribuída a maior complexidade na determinação de purinas em relação a determinação de P. A primeira apresenta diversos procedimentos e centrifugações e

realizados por etapas, com maiores chances de ocorrer variações nos resultados, enquanto a análise de P é realizada por metodologia mais simples. A determinação do P é mais rápida, menos trabalhosa e mais precisa, o que pode aumentar a confiabilidade deste método para a estimativa da aderência em relação a análise de purinas.

Adicionalmente, no ensaio em que o teor de P não foi corrigido para o teor de P insolúvel após o processo de fermentação (ensaio 2), a adesão bacteriana as partículas foi maior para amostras de cynodon. Porém, quando o P microbiano aderido foi corrigido para o P insolúvel (ensaio 3), a aderência foi maior em amostras de azevém. Então para que método de estimativa da adesão por P apresente maior acurácia, o P microbiano deve ser corrigido para a fração do P insolúvel da amostra.

6.2 Degradabilidade, aderência bacteriana e atividade enzimática

6.2.1 Efeito do pH

No presente estudo, a degradação da forragem foi claramente prejudicada pela redução do pH do meio de incubação, e isso teve uma relação direta com a aderência bacteriana as partículas, demonstrando que o processo de adesão tem um papel fundamental na degradação da fibra. De outra forma, o efeito do pH sobre a atividade enzimática fibrolítica não apresentou relação com a degradabilidade da forragem. Estes resultados indicam que a degradabilidade da forragem depende mais da aderência e colonização do que da atividade específica de enzimas bacterianas.

Rasmussen et al. (1989) não observaram efeitos da mudança do pH entre 6,0 e 8,0 sobre a aderência bacteriana. No entanto, Russell e Wilson (1996) já haviam relatado o efeito negativo que a redução do pH ruminal exerce sobre a atividade microbiana celulolítica e Mould et al. (1983) verificaram que a celulólise ruminal *in vivo* foi totalmente inibida quando o pH ficou abaixo de 6,0. Mouriño et al. (2001) também demonstraram que em valores de pH abaixo de 5,4, a digestão de celulose é inibida, coincidindo com a lise ou descolamento de células microbianas aderidas as fibras não digeridas. Entretanto, com a queda do pH a valores

abaixo de 6,0, as bactérias celulolíticas aderentes param de crescer, mas a hidrólise da celulose por enzimas celulares aderidas continua.

A queda do pH pode exercer este efeito sobre a aderência bacteriana às partículas de alimento, provavelmente por afetar negativamente as interações iônicas, hidrofóbicas e forças de Van Der Waals existentes entre a superfície externa da bactéria e a superfície do alimento (McALLISTER et al., 1994). Outra possível explicação para este efeito, segundo McBurney et al. (1986), citado por Huhtanen e Khalili (1992), é que em baixo pH ruminal, íons hidrogênio deslocam cátions ligados a fibra, reduzindo o número de sítios disponíveis para a adesão.

Com base nos resultados de degradabilidade e aderência, esperava-se que com o aumento do pH de 5,5 para 7,0 a atividade enzimática fibrolítica também fosse incrementada. No entanto, diferente do esperado, em vez de aumentar, a atividade xilanásica e CMCelulásica tendeu a ser máxima em pH 6,0 e diminuiu com o aumento do pH de 6,0 para 7,0. Entretanto, Russell e Wilson (1988) e Russell e Wilson (1996) relataram que celulasas geralmente apresentam um baixo pH ótimo, em torno de 5,5. Morgavi et al. (2000) observaram que a celulase expressou sua atividade máxima em pH 6,0, e que a atividade da xilanase foi mais alta em pH entre 6,0 e 6,5. Ao incubarem enzimas microbianas do rúmen com silagem, a máxima hidrólise do substrato foi obtida em pH 6,0 e como observado também para celulase, a atividade decresceu rapidamente em pH mais baixo.

McAllister et al. (1994), afirma que fatores relacionados ao substrato, como grau de lignificação e proteção da cutícula formam uma barreira a adesão e degradação. Paciullo (2002) observa que características comuns às gramíneas tropicais, como o alto teor de lignina e a elevada espessura da parede celular, aliado à sua estrutura anatômica e histológica, inibem a aderência e a acessibilidade dos microorganismos ruminantes às partículas do alimento e, conseqüentemente, a degradação da forrageira. Como também observado por Kozloski et al. (2008), tanto a colonização microbiana quanto a degradação foram mais altas nas amostras de azevém do que nas de cynodon. Os resultados de degradação das diferentes forrageiras confirmam a qualidade apresentada por forrageiras temperadas em relação às tropicais (VAN SOEST, 1994).

6.2.2 Efeito da concentração de açúcares solúveis

Estudos já mostraram que a suplementação com carboidratos prontamente fermentáveis deprimem a digestibilidade da fibra no rúmen (MERTENS; LOFTEN, 1980; GOESTCH et al., 1991; PATERSON et al., 1994; PIWONKA; FIRKINS, 1996). Suplementação de dietas a base de forragem com carboidratos não fibrosos usualmente reduzem o pH ruminal e a digestão da fibra (HADDAD; GRANT, 2000). Tradicionalmente, o efeito depressivo na digestão da fibra têm sido atribuído a redução do pH. No entanto, Khalili e Huhtanen (1991) e Piwonka e Firkins (1993) observaram a existência de um efeito negativo sobre a digestão da fibra independente do pH. No presente estudo, para testar este efeito sem confundir com o efeito de pH, utilizou-se um tampão concentrado no processo de fermentação *in vitro*. Esta metodologia proposta por Piwonka e Firkins (1996) manteve o pH do meio de fermentação em torno de pH 7,0 ao longo das 24 horas de incubação. Logo, os efeitos observados neste estudo podem ser atribuídos somente a adição de glicose ao meio de fermentação.

O aumento na concentração de açúcares solúveis no meio disponibiliza carboidratos prontamente fermentáveis às células bacterianas ruminais, suprimem a necessidade energética destes microorganismos e com isso podem reduzir a aderência de bactérias às partículas de alimento. Apesar de ter apresentado um baixo coeficiente de determinação, o aumento da concentração inicial de açúcares no meio de incubação exerceu um efeito negativo sobre a adesão bacteriana sem afetar, no entanto, a degradação da FDN. Rasmussen et al. (1989), no entanto, não verificaram efeito da presença de carboidratos solúveis (celobiose ou glicose) sobre a adesão microbiana a celulose.

Em estudo *in vitro* Piwonka e Firkins (1993) adicionaram diferentes concentrações de glicose no meio de fermentação *in vitro* e concluíram que a taxa de digestão da FDN diminuiu com a presença de glicose, aparentemente por reduzir a colonização microbiana sobre a fibra. Mais tarde Piwonka e Firkins (1996) atribuíram este efeito negativo sobre a degradação da fibra a produção de proteínas, pelas bactérias que usam açúcares solúveis, que inibem o crescimento daquelas que degradam fibra. Miron et al. (1990), constataram que a taxa de digestão da FDN por culturas mistas e a adesão de culturas celulolíticas puras a FDN diminuíram quando celobiose foi adicionada ao meio. Por outro lado, Morris, (1988) observou que a presença de glicose e celobiose estimularam a aderência microbiana a celulose.

No presente estudo, ao final da incubação a concentração de açúcares solúveis nos diferentes tratamentos foi semelhante à concentração de açúcares nos frascos que, inicialmente, não receberam adição de glicose. Isto indica que a glicose adicionada ao meio de incubação foi consumida pelas bactérias ao longo do processo de fermentação. Bactérias

celulolíticas utilizam primeiramente açúcares solúveis antes de iniciar a degradação da parede celular dos carboidratos (Mertens, 1977; Huhtanen; Khalili, 1992). No presente estudo não foi medido a taxa de desaparecimento da glicose do meio ao longo da incubação. É possível que as bactérias tenham consumido inicialmente os açúcares prontamente disponíveis retardando momentaneamente a necessidade de aderência e colonização da forragem. Posteriormente, no entanto, este efeito negativo na aderência foi compensado parcialmente pelo rápido crescimento inicial das populações bacterianas não aderidas favorecendo o processo de colonização das partículas de forragem num momento posterior. Em outros termos, é possível que a presença de maior concentração de açúcares tenha aumentado tanto o *lag time* quanto a taxa de colonização. Para testar estas hipóteses, novos ensaios deveriam ser conduzidos utilizando uma metodologia que, por um lado, mantenham constante a concentração dos açúcares no meio ao longo de todo o tempo de incubação e/ou, por outro, incluam medidas à vários tempos de incubação e não somente após 24 horas como no presente estudo.

Huhtanen e Khalili (1992) observaram *in vivo* que a suplementação com sacarose diminuiu a atividade xilanásica e carboximetilcelulásica no conteúdo ruminal. Eles associaram este efeito à redução tanto da adesão de microorganismos fibrolíticos às partículas de alimento quanto à redução na síntese de enzimas extracelulares pelas bactérias aderidas. Os autores também observaram correlação positiva entre a atividade de enzimas microbianas aderidas com a digestibilidade da celulose e hemicelulose, com o desaparecimento da FDN e com a taxa de digestão da FDN. Groleau e Forsberg (1981) observaram que *Bacteroides succinogenes* cultivada em meio contendo celulose apresentou atividade carboximetilcelulásica em torno de sete vezes maior que a atividade das bactérias que cresceram em meio de cultura com glicose ou celobiose.

No presente estudo foi testado a atividade de enzimas bacterianas ruminais provenientes de um animal alimentado a base de volumoso, em que somente o meio de reação enzimática foi alterado. Em geral foi observado que o aumento na concentração de glicose no meio de reação inicialmente estimula a atividade fibrolítica, a qual é afetada negativamente a altas concentrações (acima de 200 mg/dl). Observa-se adicionalmente, que este efeito não é similar sobre a xilanase e sobre a carboximetilcelulase. Estes resultados indicam que os açúcares podem afetar alostericamente estas enzimas e que este efeito alostérico pode ser positivo ou negativo (LEHNINGER et al., 2004). Não foi encontrado na literatura, no entanto, estudos que tenham isolado e identificado a estrutura e/ou a cinética destas enzimas.

7 CONCLUSÕES

A aderência bacteriana às partículas de forragem foi diretamente relacionada com o pH e inversamente relacionada com a concentração de açúcares solúveis no meio de incubação. Estes efeitos, contudo, foram menos evidentes sobre a atividade enzimática fibrolítica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAT, S.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Adhesion of Cellulolytic Ruminant Bacteria to Barley Straw. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2698-2703, Sep., 1990.

BAYER, E. A.; MORAG, E.; LAMED, R. The cellulosome – a treasure-trove for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, n. 9, p. 379-386, Sep. 1994.

BAYER, E. A. et al. Cellulose, cellulase and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 548 – 557, Oct., 1998.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed. London: [s.n.], 1997. p. 251-284.

CHURCH, D. C. **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. Zaragoza: Acríbia, 1993. 641 p.

COLEMAN, G. S. The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa, mixed bacteria and plant debris isolated from the ovine rumen. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 104, n. 2, p. 349 – 360, Apr. 1985.

CRAIG, W. M.; BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B., Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 117, n. 1, p. 56–62, Jan. 1987.

DOREAU, M. et al. Consequences of underfeeding on digestion and absorption in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v49, n. 3, p. 289 – 301, Sep. 2003.

DRYHURST, N; WOOD, C. D. The effect of nitrogen source and concentration on in vitro gas production using rumen micro-organisms. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 71, n. 1-2, p. 131-143, Mar. 1998.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p.350–356, Mar. 1956.

FIRKINS, J. L. et al. Effects of protein, carbohydrate, and fat sources on bacterial colonization and degradation of fiber in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 4273 – 4283, Dec. 1991.

GOESTCH, A. L. et al. Relationships of body weight, forage composition, and corn supplementation to feed intake and digestion by Holstein steer calves consuming bermudagrass hay ad libitum. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 6, p. 2634-2645, Jun. 1991.

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

GRANT, R. J.; WEIDNER, S. J. Digestion kinetics of fibre: Influence of in vitro buffer pH varied within observed physiological range. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 4, p. 1060-1068, Apr. 1992.

GRIGSBY, K. N. et al. Combinations of starch and digestible fibre in supplements for steers consuming a low-quality bromegrass hay diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1057–1064, Apr. 1993.

GROLEAU, D.; FORSBERG, C. W. Cellulolytic activity of the rumen bacterium. *Bacteroides succinogenes*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 5, p. 517 - 530, May 1981.

HADDAD, S. G.; GRANT, R. J. Influence of nonfibre carbohydrate concentration on forage fibre digestion in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 1 - 2, p. 107– 115, July 2000.

HÄRTER, C. J. **Desenvolvimento e avaliação de um método *in vitro* para estimar a degradabilidade das proteínas no rúmen**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

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

HRISTOV, A. N., MCALLISTER, T. A., CHENG, K. J. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide-degrading activities of ruminal contents. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 79, n. 1, p. 73-81, Mar. 1999.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 3. Rumen pool size and digestion kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v, 33, n. 3-4, p. 275 - 287, June 1991.

_____. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethyl cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 245 - 255, Mar. 1992.

HUHTANEN, P.; VANHATALO, A.; VARVIKKO, T. Enzyme activity of rumen particles and feed samples incubated *in situ* with differing types of cloth. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 79, n. 2, p. 161 – 168, Feb. 1998.

KHALILI, H.; HUHTANEN, P. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 3-4, p.263 – 273, June 1991

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. 214 p.

KOZLOSKI, G.V. et al. Intake and digestion by lambs fed just dwarf elephant grass hay (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Mott) or supplemented with urea and different levels of cracked corn grain. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 125, n. 1 -2, p. 111 - 122, Jan. 2006a.

KOZLOSKI, G. V. et al. Nutritional value of diets based on a low-quality grass hay supplemented or not with urea and levels of cassava meal. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 1, n. 3, p. 38 – 46, Oct. 2006b.

KOZLOSKI, G. V. et al. Microbial colonization and degradation of forage samples incubated *in vitro* at different initial pH. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, v. 3 -4, p. 356 – 367, Apr. 2008.

KRAUSE, D. O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 5, p. 663 – 693, Dec. 2003.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Purine quantification in digesta from ruminants by

spectrophotometric and HPLC methods. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 107 – 112, Feb. 1999.

MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v. 67, n. 3, p. 407 – 413, Mar. 1995.

MCALLAN, A. B. The fate of nucleic acids in ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 41, n. 3, p. 309 - 316, Feb. 1982.

McALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 3004–3018, Nov. 1994.

MCBURNEY, M. I.; ALLEN, M. S.; VAN SOEST, P. J. Praseodymium, and copper cation-exchange capacities of neutral-detergent fibres relative to composition and fermentation kinetics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 39, n. 7, p. 666 – 672, July 1986.

MERTENS, D. R. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 36, n. 2, p. 187 – 192, Feb. 1977.

MERTENS, D. R.; LOFTEN, J. R. The effect of starch on forage fibre digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 9, p.1437–1446, Sep. 1980.

MICHALET-DOREAU, B. et al. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 41, n. 2, p. 187–194, Mar./Apr. 2001.

MILLER, G. L. et al. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 1, n. 2, p. 127-132, Sep. 1960.

MIRON, J., BEN-GHEDALIA, D., MORRISON, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1294–1309, June 2001.

MIRON J. et al. Some aspects of cellobiose effect on bacterial cell surface structures involved in lucerne cell walls utilization by fresh isolates of rumen bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 30, n. 1 -2, p. 107-120, July 1990.

MORGAVI, D. P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma Longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1310–1321, June 2000.

MORGAVI, D. P. et al. Trichoderma enzymes promote Fibrobacter succinogenes S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 10, p. 1083–1090, Aug. 2004.

MORRIS, E.J. Characteristics of the adhesion of *Ruminococcus albus* to cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 51, n. 1 – 2, p. 113–117, June 1988.

MOSONI, P.; FONTY, G.; GOUET, P. Competition Between Ruminal Cellulolytic Bacteria for Adhesion to Cellulose. **Current Microbiology**, New York, v. 35, n. 1, p. 44 – 47, July 1997.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 1-14, Dec. 1983.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 15-30, Dec. 1983.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA; R. A.; WEIMER, P. J. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 848-859, Apr. 2001.

NOZIÈRE, P.; MICHALET-DOREAU, B. Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, n. 4, p. 471 – 476, Apr. 1997.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas tropicais. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 357-364, Abr. 2002.

PATERSON, J. A. et al. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant animal intake and performance. In: Fahey Jr., G. C. (Ed.). **Forage quality, eEvaluation and utilization**. Madison: ASA, 1994. p. 564-612.

PIWONKA, E. J.; FIRKINS J. L. Effect of glucose on fiber digestion and particle-associated carboxymethylcellulase activity in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 129-139, Jan. 1993.

PIWONKA, E. J.; FIRKINS, J. L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 12, p. 2196-2206, Dec. 1996.

RASMUSSEN, M. A.; WHITE, B. A.; HESPELL, R. B. Improved assay for quantitating adherence of ruminal bacteria to cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 2089-2091, Aug. 1989.

RUSSEL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1955-1963, July 1998.

RUSSELL, J. B., DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 604-610, Mar. 1980.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 118, n. 2, p. 271 – 279, Feb. 1988.

_____. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1503–1509, Aug. 1996

SAS - **Statistical Analysis Systems User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute, 2001. 1042 p. Version 6.

SENGER, C. C. D. et. al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p. 169 – 174, Sep. 2008.

SILVA, A. T.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 407 – 415, May 1987.

TAMMINGA, S. Influence of feeding management on ruminal fibre digestibility. In: Jung, H. et al. (Eds.), **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, 1993. p. 571-602.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. **Journal of the British Grassland Society**, Aberystwyth, v. 18, n. 2, p. 104-111, June 1963.

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

WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1496–1502, Aug. 1996.

WHITERS, P. C. **Comparative animal physiology**. New York: Saunders College Publishing, 1992. 949 p.

WILLIAMS, A. G.; STRACHAN, N. H. The distribution of polysaccharide-degrading enzymes in the bovine rumen digesta ecosystem. **Current Microbiology**, New York, v. 10, n. 4, p. 215–220, July 1984.

ANEXOS

ANEXO A - Solução tampão fosfato

Foi pesado, separadamente, em balança de precisão:

- 25,2g de Fosfato de Potássio Dibásico Anidro (K_2HPO_4);
- 20g de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4);
- 2,6g de Cloreto de Sódio (NaCl);
- 0,180g de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$);
- 0,360g de Sulfato de magnésio monohidratado ($MgSO_4 - H_2O$)

Cada um dos reagentes foi diluído em, aproximadamente, 200 ml de água destilada, após a diluição os reagentes foram misturados, e foi completado o volume total de 4 litros com água destilada.

ANEXO B - Solução de 3,5-dinitro-salicilato (DNS 1%)

Para o preparo dessa solução era dissolvido com aquecimento:

- 5 gramas do ácido 3,5-dinitro-salicílico em 100 ml de NaOH 2N
- 150 gramas de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 ml de água destilada.

Estas duas soluções eram então misturadas e transferidas para um balão volumétrico de 500ml, ajustando-se o volume com água destilada.

ANEXO C - Composição da solução tamponante¹

Composição do Meio	
Ingredientes:	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NH ₄ HCO ₃	2,88
NaHCO ₃	35,0
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	9,45
KH ₂ PO ₄	3,32
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,60
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/1000mL
Cysteine HCl (gramas)	6,25
Água destilada (mL)	950
NaOH 1M (mL)	40
Na ₂ S (gramas)	6,25
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/l
Rezasurina	1,0

¹ Adaptado de Dryhurst & Wood (1998), proposto por Härter (2009)

ANEXO D – Solução complexante

Pesar:

- 3,8 g de molibdato de amônio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O)

- 5 g ácido bórico (H₃BO₃)

Diluir, adicionar 70,7 ml ácido clorídrico concentrado (HCl) e completar volume de 1 litro com água destilada

ANEXO E – Solução redutora

Pesar:

- 0,25 g ácido amino - naftol – sulfônico ($\text{NH}_2\text{C}_{10}\text{H}_5(\text{OH})\text{SO}_3\text{H}$)
- 0,50 g sulfito de sódio (Na_2SO_3)
- 14,6 g de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)

Diluir e completar volume de 100 ml com água destilada

ANEXO F - Composição da solução tamponante²

Composição do Meio	
Ingredientes:	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NH ₄ HCO ₃	2,88
NaHCO ₃	87,5
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	23,63
K ₂ HPO ₄	8,29
MgSO ₄ 7 H ₂ O	1,50
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/L
Cysteine HCl (Quilograma)	0,00625
Água destilada (Litro)	0,95
NaOH 1M (Litro)	0,04
Na ₂ S (Quilograma)	0,00625
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/L
Rezasurina	1,0

APÊNDICES

Apêndice A - Aderência bacteriana (mg de purina/g de MS incubada ou mg de P/g de MS incubada) e degradabilidade de gramíneas forrageiras (degradabilidade MS ou FDN).incubadas a diferentes pHs, nos 3 ensaios.

Ensaio	Amostra	pH	degradabilidade MS	mg purina/g MS incubada
1	Cynodon	7,0	42,2	0,748
1	Cynodon	7,0	43,3	0,288
1	Cynodon	7,0	42,3	0,225
1	Cynodon	7,0	39,9	0,319
1	Cynodon	6,5	35,1	0,533
1	Cynodon	6,5	35,0	0,636
1	Cynodon	6,5	39,4	0,567
1	Cynodon	6,5	37,0	0,552
1	Cynodon	6,0	30,7	0,486
1	Cynodon	6,0	29,9	0,472
1	Cynodon	6,0	32,0	0,755
1	Cynodon	6,0	32,3	0,669
1	Cynodon	5,5	28,8	0,483
1	Cynodon	5,5	29,8	0,613
1	Cynodon	5,5	30,1	0,411
1	Cynodon	5,5	27,7	0,358
1	Azevém	7,0	59,3	0,247
1	Azevém	7,0	64,1	0,533
1	Azevém	7,0	59,9	0,828
1	Azevém	7,0	56,0	0,691
1	Azevém	6,5	57,8	0,647
1	Azevém	6,5	60,9	0,675
1	Azevém	6,5	61,0	0,724
1	Azevém	6,5	69,9	0,745
1	Azevém	6,0	51,9	0,496
1	Azevém	6,0	48,4	0,210
1	Azevém	6,0	46,1	0,099
1	Azevém	6,0	44,9	0,717
1	Azevém	5,5	45,2	0,664
1	Azevém	5,5	44,8	0,412
1	Azevém	5,5	44,3	0,574
1	Azevém	5,5	43,4	0,570
1	Cynodon	7,0	43,5	0,570
1	Cynodon	7,0	42,6	0,303
1	Cynodon	7,0	40,1	0,160
1	Cynodon	7,0	42,4	0,193
1	Cynodon	6,5	32,1	0,409
1	Cynodon	6,5	59,7	0,484
1	Cynodon	6,5	40,5	.

1	Cynodon	6,5	43,1	0,766
1	Cynodon	6,0	29,9	.
1	Cynodon	6,0	35,7	2,400
1	Cynodon	6,0	36,0	2,096
1	Cynodon	6,0	35,3	1,271
1	Cynodon	5,5	31,0	0,880
1	Cynodon	5,5	29,8	0,867
1	Cynodon	5,5	28,5	0,699
1	Cynodon	5,5	28,5	0,708
1	Azevém	7,0	64,5	0,994
1	Azevém	7,0	59,1	0,959
1	Azevém	7,0	64,6	1,108
1	Azevém	7,0	68,3	.
1	Azevém	6,5	51,1	0,934
1	Azevém	6,5	55,3	0,758
1	Azevém	6,5	50,3	0,711
1	Azevém	6,5	69,5	.
1	Azevém	6,0	44,3	0,606
1	Azevém	6,0	49,4	0,733
1	Azevém	6,0	51,8	0,999
1	Azevém	6,0	53,1	0,745
1	Azevém	5,5	44,3	0,823
1	Azevém	5,5	45,3	0,617
1	Azevém	5,5	45,5	0,802
1	Azevém	5,5	44,5	0,816

Ensaio	Amostra	pH	degradabilidade MS	mg P/g MS incubado
2	Cynodon	7	40,9	
2	Cynodon	7	41,8	0,599
2	Cynodon	7	45,1	0,736
2	Cynodon	7	43,5	0,730
2	Cynodon	6,5	38,5	0,616
2	Cynodon	6,5	39,5	0,650
2	Cynodon	6,5	39,0	0,737
2	Cynodon	6,5	38,0	0,643
2	Cynodon	6	32,5	
2	Cynodon	6	31,2	0,478
2	Cynodon	6	30,9	
2	Cynodon	6	28,9	
2	Cynodon	5,5	28,8	0,609
2	Cynodon	5,5	29,1	0,733
2	Cynodon	5,5	28,4	0,617
2	Cynodon	5,5	28,5	0,609
2	Cynodon	7	45,0	1,022
2	Cynodon	7	47,7	1,079

2	Cynodon	7	44,6	1,045
2	Cynodon	7	45,4	0,989
2	Cynodon	6,5	43,2	0,933
2	Cynodon	6,5	42,0	0,948
2	Cynodon	6,5	39,7	0,922
2	Cynodon	6,5	38,1	0,818
2	Cynodon	6	37,3	0,747
2	Cynodon	6	37,4	0,791
2	Cynodon	6	33,2	0,753
2	Cynodon	6	36,5	0,767
2	Cynodon	5,5	33,1	0,618
2	Cynodon	5,5	34,0	0,666
2	Cynodon	5,5	30,8	0,379
2	Cynodon	5,5	33,4	0,425
2	Azevém	7	59,4	0,827
2	Azevém	7	63,6	1,034
2	Azevém	7	55,7	0,855
2	Azevém	7	59,6	0,840
2	Azevém	6,5	60,7	0,660
2	Azevém	6,5	63,2	0,699
2	Azevém	6,5	58,6	0,746
2	Azevém	6,5	61,3	0,653
2	Azevém	6	50,1	0,637
2	Azevém	6	48,8	0,628
2	Azevém	6	46,5	0,614
2	Azevém	6	52,5	0,688
2	Azevém	5,5	43,6	0,634
2	Azevém	5,5	43,6	0,616
2	Azevém	5,5	43,4	0,544
2	Azevém	5,5	42,4	0,542
2	Azevém	7	59,6	0,669
2	Azevém	7	63,5	0,694
2	Azevém	7	58,1	0,613
2	Azevém	7	67,7	0,809
2	Azevém	6,5	52,5	0,658
2	Azevém	6,5	55,4	0,596
2	Azevém	6,5	60,1	0,635
2	Azevém	6,5	58,2	0,610
2	Azevém	6	59,0	0,561
2	Azevém	6	61,0	0,561
2	Azevém	6	61,4	0,596
2	Azevém	6	57,1	0,555
2	Azevém	5,5	50,8	0,506
2	Azevém	5,5	48,7	0,483
2	Azevém	5,5	55,2	0,540
2	Azevém	5,5	54,7	0,527

Ensaio	Amostra	pH	degradabilidade	mg P/g MS
			FDN	incubada
3	Cynodon	7	30,2	0,486
3	Cynodon	7	25,5	0,453
3	Cynodon	7	31,6	0,585
3	Cynodon	7	23,8	0,504
3	Cynodon	6,5	22,9	0,441
3	Cynodon	6,5	19,1	0,332
3	Cynodon	6,5	26,4	0,462
3	Cynodon	6,5	25,0	0,490
3	Cynodon	6	17,9	0,344
3	Cynodon	6	16,1	0,350
3	Cynodon	6	14,2	0,257
3	Cynodon	6	15,6	0,307
3	Cynodon	5,5	10,2	0,209
3	Cynodon	5,5	11,0	0,212
3	Cynodon	5,5	10,4	0,261
3	Cynodon	5,5	11,8	0,215
3	Cynodon	7	30,6	0,629
3	Cynodon	7	30,3	0,543
3	Cynodon	7	35,6	0,612
3	Cynodon	7	33,1	0,574
3	Cynodon	6,5	25,3	0,489
3	Cynodon	6,5	25,6	0,532
3	Cynodon	6,5	27,0	0,472
3	Cynodon	6,5	26,1	0,531
3	Cynodon	6	18,0	0,316
3	Cynodon	6	17,4	0,301
3	Cynodon	6	19,0	0,353
3	Cynodon	6	16,5	0,260
3	Cynodon	5,5	10,6	0,196
3	Cynodon	5,5	14,1	0,201
3	Cynodon	5,5	11,5	0,252
3	Cynodon	5,5	12,0	0,202
3	Azevém	7	53,7	0,563
3	Azevém	7	48,3	0,500
3	Azevém	7	49,6	0,549
3	Azevém	7	52,9	0,571
3	Azevém	6,5	50,1	0,456
3	Azevém	6,5	49,5	0,470
3	Azevém	6,5	47,5	0,446
3	Azevém	6,5	50,8	0,531
3	Azevém	6	37,1	0,387
3	Azevém	6	36,9	0,442
3	Azevém	6	39,7	0,394
3	Azevém	6	29,4	0,361

3	Azevém	5,5	21,3	0,335
3	Azevém	5,5	21,6	0,332
3	Azevém	5,5	24,5	0,128
3	Azevém	5,5	24,0	0,323
3	Azevém	7	43,9	0,562
3	Azevém	7	46,4	0,558
3	Azevém	7	57,8	0,795
3	Azevém	7	53,9	0,682
3	Azevém	6,5	42,2	0,620
3	Azevém	6,5	50,2	0,627
3	Azevém	6,5	35,1	0,527
3	Azevém	6,5	41,1	0,605
3	Azevém	6	33,6	0,476
3	Azevém	6	27,4	0,390
3	Azevém	6	28,8	0,428
3	Azevém	6	36,7	0,440
3	Azevém	5,5	21,7	0,381
3	Azevém	5,5	20,1	0,394
3	Azevém	5,5	22,9	0,399
3	Azevém	5,5	24,6	0,396

Apêndice B - Aderência bacteriana (mg de P/g de MS incubada) e degradabilidade da FDN de gramíneas forrageiras incubadas com diferentes concentrações iniciais de glicose, nos 4 ensaios.

Amostra	ensaio	[] glicose (mg/dl)	DIVFDN	mg P/g MS incubada
Cynodon	1	0	24,71	
Cynodon	1	0	25,17	0,674
Cynodon	1	0	26,60	0,774
Cynodon	1	0	26,42	0,718
Cynodon	1	0	24,91	0,659
Cynodon	1	100		
Cynodon	1	100	26,05	
Cynodon	1	100	27,13	0,782
Cynodon	1	100	30,24	0,784
Cynodon	1	100	28,08	0,676
Cynodon	1	200	27,19	
Cynodon	1	200	27,93	0,721
Cynodon	1	200	25,10	0,775
Cynodon	1	200	23,52	0,803
Cynodon	1	200	20,02	0,850
Cynodon	1	300	27,32	
Cynodon	1	300	27,73	0,727
Cynodon	1	300	26,57	0,795
Cynodon	1	300		0,824
Cynodon	1	300	24,73	0,809
Cynodon	2	0	23,28	
Cynodon	2	0	22,74	1,017
Cynodon	2	0	23,26	0,936
Cynodon	2	0	23,76	0,969
Cynodon	2	0	22,80	0,970
Cynodon	2	100	26,77	
Cynodon	2	100	23,78	1,055
Cynodon	2	100	20,03	0,977
Cynodon	2	100	27,11	1,074
Cynodon	2	100	26,71	1,120
Cynodon	2	200	25,90	
Cynodon	2	200	21,95	1,080
Cynodon	2	200	18,06	0,937
Cynodon	2	200	21,46	0,830
Cynodon	2	200	24,07	0,902
Cynodon	2	300	25,19	
Cynodon	2	300	28,20	0,952
Cynodon	2	300	23,85	0,971
Cynodon	2	300	20,41	0,876
Cynodon	2	300	24,53	0,844
Azevém	1	0	40,01	
Azevém	1	0	39,38	0,839
Azevém	1	0	36,28	0,874
Azevém	1	0		0,798

Azevém	1	0	40,30	0,886
Azevém	1	100	37,26	
Azevém	1	100	40,86	0,805
Azevém	1	100	39,23	0,778
Azevém	1	100	33,63	0,779
Azevém	1	100	35,35	0,705
Azevém	1	200	42,65	
Azevém	1	200	41,64	0,698
Azevém	1	200	40,28	0,670
Azevém	1	200	38,90	0,740
Azevém	1	200		0,772
Azevém	1	300	34,75	
Azevém	1	300	29,66	0,825
Azevém	1	300	37,59	0,912
Azevém	1	300	39,35	0,826
Azevém	1	300	36,58	0,980
Azevém	2	0	31,91	
Azevém	2	0	33,02	1,236
Azevém	2	0	33,33	1,214
Azevém	2	0	37,41	1,186
Azevém	2	0	30,67	1,161
Azevém	2	100	36,19	
Azevém	2	100	38,72	1,119
Azevém	2	100	29,22	1,108
Azevém	2	100	37,50	1,126
Azevém	2	100	35,91	1,081
Azevém	2	200	30,80	
Azevém	2	200	39,13	1,022
Azevém	2	200	30,55	1,280
Azevém	2	200	36,04	1,088
Azevém	2	200	35,22	1,133
Azevém	2	300	36,76	
Azevém	2	300	40,89	
Azevém	2	300	37,15	1,069
Azevém	2	300	36,62	0,991
Azevém	2	300	37,43	0,988
Cynodon	3	0	27,63	
Cynodon	3	0	24,73	1,00
Cynodon	3	0	27,19	0,98
Cynodon	3	0	27,36	0,94
Cynodon	3	0	28,32	0,97
Cynodon	3	100	24,27	
Cynodon	3	100	21,24	0,85
Cynodon	3	100	21,53	1,00
Cynodon	3	100	23,19	1,04
Cynodon	3	100		1,02
Cynodon	3	200	24,15	
Cynodon	3	200	19,92	0,88
Cynodon	3	200	25,43	0,87
Cynodon	3	200	23,83	0,84
Cynodon	3	200	23,92	0,77

Cynodon	3	300	19,98	
Cynodon	3	300	29,23	0,83
Cynodon	3	300	24,30	0,86
Cynodon	3	300	22,08	0,87
Cynodon	3	300	22,81	0,83
Cynodon	4	0	17,33	
Cynodon	4	0	14,46	0,92
Cynodon	4	0	18,43	0,91
Cynodon	4	0	16,78	0,94
Cynodon	4	0	14,54	0,89
Cynodon	4	100	12,76	
Cynodon	4	100	11,27	0,87
Cynodon	4	100	18,08	0,98
Cynodon	4	100	13,38	0,98
Cynodon	4	100	15,77	0,99
Cynodon	4	200	15,56	
Cynodon	4	200	17,97	0,91
Cynodon	4	200	15,29	0,96
Cynodon	4	200	19,76	0,89
Cynodon	4	200	20,93	0,88
Cynodon	4	300	14,29	
Cynodon	4	300	19,95	0,93
Cynodon	4	300	15,53	0,85
Cynodon	4	300	18,27	0,77
Cynodon	4	300	19,24	0,77
Azevém	3	0	39,47	
Azevém	3	0	41,73	1,10
Azevém	3	0	40,07	1,14
Azevém	3	0	38,64	1,26
Azevém	3	0	43,32	1,06
Azevém	3	100	36,91	
Azevém	3	100	36,16	1,18
Azevém	3	100	38,04	1,24
Azevém	3	100	41,05	1,07
Azevém	3	100		1,06
Azevém	3	200	38,71	
Azevém	3	200	38,07	0,92
Azevém	3	200	40,63	0,93
Azevém	3	200	41,66	0,85
Azevém	3	200	39,54	1,00
Azevém	3	300	33,20	
Azevém	3	300	37,93	1,06
Azevém	3	300	35,21	1,04
Azevém	3	300	34,52	1,03
Azevém	3	300	34,46	1,04
Azevém	4	0	27,05	
Azevém	4	0	24,26	1,08
Azevém	4	0	25,81	0,98
Azevém	4	0	28,04	1,07
Azevém	4	0	27,53	1,15
Azevém	4	100	25,67	

Azevém	4	100	28,34	1,17
Azevém	4	100	26,42	1,05
Azevém	4	100	27,22	1,11
Azevém	4	100	27,14	0,98
Azevém	4	200	24,51	
Azevém	4	200	24,65	0,94
Azevém	4	200	29,38	1,02
Azevém	4	200	30,09	0,95
Azevém	4	200	26,78	1,04
Azevém	4	300	30,30	
Azevém	4	300	25,69	0,90
Azevém	4	300	25,74	0,95
Azevém	4	300	24,40	0,91
Azevém	4	300	22,36	1,00

Apêndice C - Atividade de enzimas bacterianas ruminais (nmol de açúcares redutores liberados/ g de MS/ minuto) extraídas de resíduo de azevém ou cynodon incubadas com carboximetilcelulose (CMC) ou xilana a diferentes pHs.

Ensaio	Resíduo	Substrato	pH	Ativ. Enzimática
1	Azevém	CMC	7,0	864
1	Azevém	CMC	7,0	1014
1	Azevém	CMC	7,0	1037
1	Azevém	CMC	7,0	1029
1	Azevém	CMC	7,0	1123
1	Azevém	CMC	7,0	1061
1	Azevém	CMC	7,0	998
1	Azevém	CMC	7,0	1069
1	Azevém	CMC	7,0	1076
1	Azevém	CMC	7,0	1029
1	Azevém	CMC	6,5	1160
1	Azevém	CMC	6,5	1097
1	Azevém	CMC	6,5	1019
1	Azevém	CMC	6,5	1191
1	Azevém	CMC	6,5	1207
1	Azevém	CMC	6,5	1254
1	Azevém	CMC	6,5	1325
1	Azevém	CMC	6,5	1270
1	Azevém	CMC	6,5	1293
1	Azevém	CMC	6,5	1246
1	Azevém	CMC	6,0	1253
1	Azevém	CMC	6,0	1332
1	Azevém	CMC	6,0	1340
1	Azevém	CMC	6,0	1340
1	Azevém	CMC	6,0	1277
1	Azevém	CMC	6,0	1136
1	Azevém	CMC	6,0	1065
1	Azevém	CMC	6,0	1151
1	Azevém	CMC	6,0	1120
1	Azevém	CMC	6,0	1065
1	Azevém	CMC	5,5	1165
1	Azevém	CMC	5,5	1110
1	Azevém	CMC	5,5	1134
1	Azevém	CMC	5,5	1338
1	Azevém	CMC	5,5	1094
1	Azevém	CMC	5,5	1204
1	Azevém	CMC	5,5	1196
1	Azevém	CMC	5,5	1149
1	Azevém	CMC	5,5	1204

1	Azevém	CMC	5,5	1393
1	Cynodon	CMC	7,0	806
1	Cynodon	CMC	7,0	833
1	Cynodon	CMC	7,0	800
1	Cynodon	CMC	7,0	819
1	Cynodon	CMC	7,0	859
1	Cynodon	CMC	7,0	997
1	Cynodon	CMC	7,0	833
1	Cynodon	CMC	7,0	885
1	Cynodon	CMC	7,0	898
1	Cynodon	CMC	7,0	721
1	Cynodon	CMC	6,5	930
1	Cynodon	CMC	6,5	943
1	Cynodon	CMC	6,5	956
1	Cynodon	CMC	6,5	930
1	Cynodon	CMC	6,5	982
1	Cynodon	CMC	6,5	1022
1	Cynodon	CMC	6,5	915
1	Cynodon	CMC	6,5	989
1	Cynodon	CMC	6,5	955
1	Cynodon	CMC	6,5	1022
1	Cynodon	CMC	6,0	1059
1	Cynodon	CMC	6,0	961
1	Cynodon	CMC	6,0	980
1	Cynodon	CMC	6,0	1035
1	Cynodon	CMC	6,0	1076
1	Cynodon	CMC	6,0	1028
1	Cynodon	CMC	6,0	946
1	Cynodon	CMC	6,0	884
1	Cynodon	CMC	6,0	1001
1	Cynodon	CMC	6,0	994
1	Cynodon	CMC	5,5	901
1	Cynodon	CMC	5,5	874
1	Cynodon	CMC	5,5	839
1	Cynodon	CMC	5,5	860
1	Cynodon	CMC	5,5	737
1	Cynodon	CMC	5,5	815
1	Cynodon	CMC	5,5	744
1	Cynodon	CMC	5,5	764
1	Cynodon	CMC	5,5	928
1	Cynodon	CMC	5,5	915
1	Azevém	Xilana	7,0	7063
1	Azevém	Xilana	7,0	7619
1	Azevém	Xilana	7,0	7586
1	Azevém	Xilana	7,0	8583
1	Azevém	Xilana	7,0	8419

1	Azevém	Xilana	7,0	7298
1	Azevém	Xilana	7,0	7487
1	Azevém	Xilana	7,0	8566
1	Azevém	Xilana	7,0	8910
1	Azevém	Xilana	7,0	7929
1	Azevém	Xilana	6,5	6948
1	Azevém	Xilana	6,5	7734
1	Azevém	Xilana	6,5	9007
1	Azevém	Xilana	6,5	8223
1	Azevém	Xilana	6,5	8321
1	Azevém	Xilana	6,5	8353
1	Azevém	Xilana	6,5	7942
1	Azevém	Xilana	6,5	8337
1	Azevém	Xilana	6,5	8169
1	Azevém	Xilana	6,5	8125
1	Azevém	Xilana	6,0	10070
1	Azevém	Xilana	6,0	9662
1	Azevém	Xilana	6,0	10152
1	Azevém	Xilana	6,0	8828
1	Azevém	Xilana	6,0	9106
1	Azevém	Xilana	6,0	9318
1	Azevém	Xilana	6,0	9842
1	Azevém	Xilana	6,0	9041
1	Azevém	Xilana	6,0	9580
1	Azevém	Xilana	6,0	9907
1	Azevém	Xilana	5,5	8512
1	Azevém	Xilana	5,5	7858
1	Azevém	Xilana	5,5	7450
1	Azevém	Xilana	5,5	8758
1	Azevém	Xilana	5,5	8905
1	Azevém	Xilana	5,5	7908
1	Azevém	Xilana	5,5	7631
1	Azevém	Xilana	5,5	9330
1	Azevém	Xilana	5,5	8006
1	Azevém	Xilana	5,5	7303
1	Cynodon	Xilana	7,0	6756
1	Cynodon	Xilana	7,0	6282
1	Cynodon	Xilana	7,0	6594
1	Cynodon	Xilana	7,0	6731
1	Cynodon	Xilana	7,0	5528
1	Cynodon	Xilana	7,0	4517
1	Cynodon	Xilana	7,0	5419
1	Cynodon	Xilana	7,0	5063
1	Cynodon	Xilana	7,0	4899
1	Cynodon	Xilana	7,0	4763
1	Cynodon	Xilana	6,5	5380

1	Cynodon	Xilana	6,5	5270
1	Cynodon	Xilana	6,5	5544
1	Cynodon	Xilana	6,5	5366
1	Cynodon	Xilana	6,5	5940
1	Cynodon	Xilana	6,5	6227
1	Cynodon	Xilana	6,5	6295
1	Cynodon	Xilana	6,5	6063
1	Cynodon	Xilana	6,5	6118
1	Cynodon	Xilana	6,5	6022
1	Cynodon	Xilana	6,0	6075
1	Cynodon	Xilana	6,0	6499
1	Cynodon	Xilana	6,0	6075
1	Cynodon	Xilana	6,0	6772
1	Cynodon	Xilana	6,0	6307
1	Cynodon	Xilana	6,0	6034
1	Cynodon	Xilana	6,0	7503
1	Cynodon	Xilana	6,0	7503
1	Cynodon	Xilana	6,0	7761
1	Cynodon	Xilana	6,0	7130
1	Cynodon	Xilana	5,5	7139
1	Cynodon	Xilana	5,5	7125
1	Cynodon	Xilana	5,5	6264
1	Cynodon	Xilana	5,5	6738
1	Cynodon	Xilana	5,5	7154
1	Cynodon	Xilana	5,5	6437
1	Cynodon	Xilana	5,5	6049
1	Cynodon	Xilana	5,5	6924
1	Cynodon	Xilana	5,5	7326
2	Azevém	CMC	7,0	1166
2	Azevém	CMC	7,0	1028
2	Azevém	CMC	7,0	979
2	Azevém	CMC	7,0	1036
2	Azevém	CMC	7,0	1101
2	Azevém	CMC	7,0	930
2	Azevém	CMC	7,0	979
2	Azevém	CMC	7,0	1085
2	Azevém	CMC	7,0	1085
2	Azevém	CMC	7,0	995
2	Azevém	CMC	6,5	1157
2	Azevém	CMC	6,5	1133
2	Azevém	CMC	6,5	1222
2	Azevém	CMC	6,5	994
2	Azevém	CMC	6,5	929
2	Azevém	CMC	6,5	913
2	Azevém	CMC	6,5	872
2	Azevém	CMC	6,5	864

2	Azevém	CMC	6,5	1002
2	Azevém	CMC	6,5	921
2	Azevém	CMC	6,0	1084
2	Azevém	CMC	6,0	1035
2	Azevém	CMC	6,0	1043
2	Azevém	CMC	6,0	970
2	Azevém	CMC	6,0	1328
2	Azevém	CMC	6,0	1401
2	Azevém	CMC	6,0	1230
2	Azevém	CMC	6,0	1238
2	Azevém	CMC	6,0	1230
2	Azevém	CMC	6,0	1377
2	Azevém	CMC	5,5	1044
2	Azevém	CMC	5,5	1069
2	Azevém	CMC	5,5	1150
2	Azevém	CMC	5,5	1118
2	Azevém	CMC	5,5	1118
2	Azevém	CMC	5,5	1101
2	Azevém	CMC	5,5	987
2	Azevém	CMC	5,5	979
2	Azevém	CMC	5,5	971
2	Azevém	CMC	5,5	930
2	Cynodon	CMC	7,0	622
2	Cynodon	CMC	7,0	725
2	Cynodon	CMC	7,0	718
2	Cynodon	CMC	7,0	732
2	Cynodon	CMC	7,0	718
2	Cynodon	CMC	7,0	815
2	Cynodon	CMC	7,0	691
2	Cynodon	CMC	7,0	698
2	Cynodon	CMC	7,0	1001
2	Cynodon	CMC	7,0	1032
2	Cynodon	CMC	6,5	1059
2	Cynodon	CMC	6,5	1087
2	Cynodon	CMC	6,5	1073
2	Cynodon	CMC	6,5	1094
2	Cynodon	CMC	6,5	914
2	Cynodon	CMC	6,5	949
2	Cynodon	CMC	6,5	1066
2	Cynodon	CMC	6,5	1059
2	Cynodon	CMC	6,5	853
2	Cynodon	CMC	6,5	956
2	Cynodon	CMC	6,0	1018
2	Cynodon	CMC	6,0	928
2	Cynodon	CMC	6,0	1231
2	Cynodon	CMC	6,0	1107

2	Cynodon	CMC	6,0	1128
2	Cynodon	CMC	6,0	1121
2	Cynodon	CMC	6,0	1093
2	Cynodon	CMC	6,0	1100
2	Cynodon	CMC	6,0	976
2	Cynodon	CMC	6,0	1024
2	Cynodon	CMC	5,5	1092
2	Cynodon	CMC	5,5	1071
2	Cynodon	CMC	5,5	961
2	Cynodon	CMC	5,5	995
2	Cynodon	CMC	5,5	975
2	Cynodon	CMC	5,5	1057
2	Cynodon	CMC	5,5	968
2	Cynodon	CMC	5,5	1092
2	Cynodon	CMC	5,5	975
2	Cynodon	CMC	5,5	988
2	Azevém	Xilana	7,0	7206
2	Azevém	Xilana	7,0	6948
2	Azevém	Xilana	7,0	6856
2	Azevém	Xilana	7,0	6750
2	Azevém	Xilana	7,0	6978
2	Azevém	Xilana	7,0	6780
2	Azevém	Xilana	7,0	6841
2	Azevém	Xilana	7,0	7024
2	Azevém	Xilana	7,0	7206
2	Azevém	Xilana	7,0	7298
2	Azevém	Xilana	6,5	8088
2	Azevém	Xilana	6,5	7906
2	Azevém	Xilana	6,5	7267
2	Azevém	Xilana	6,5	7586
2	Azevém	Xilana	6,5	7632
2	Azevém	Xilana	6,5	7632
2	Azevém	Xilana	6,5	7632
2	Azevém	Xilana	6,5	7677
2	Azevém	Xilana	6,5	7662
2	Azevém	Xilana	6,5	7738
2	Azevém	Xilana	6,0	8241
2	Azevém	Xilana	6,0	7860
2	Azevém	Xilana	6,0	8043
2	Azevém	Xilana	6,0	8043
2	Azevém	Xilana	6,0	8302
2	Azevém	Xilana	6,0	8226
2	Azevém	Xilana	6,0	8028
2	Azevém	Xilana	6,0	8149
2	Azevém	Xilana	6,0	8013
2	Azevém	Xilana	6,0	7860

2	Azevém	Xilana	5,5	4772
2	Azevém	Xilana	5,5	3463
2	Azevém	Xilana	5,5	3540
2	Azevém	Xilana	5,5	3342
2	Azevém	Xilana	5,5	3159
2	Azevém	Xilana	5,5	2809
2	Azevém	Xilana	5,5	3053
2	Azevém	Xilana	5,5	2931
2	Azevém	Xilana	5,5	2748
2	Azevém	Xilana	5,5	2840
2	Cynodon	Xilana	7,0	5571
2	Cynodon	Xilana	7,0	5610
2	Cynodon	Xilana	7,0	5404
2	Cynodon	Xilana	7,0	5507
2	Cynodon	Xilana	7,0	5416
2	Cynodon	Xilana	7,0	5597
2	Cynodon	Xilana	7,0	5700
2	Cynodon	Xilana	7,0	5622
2	Cynodon	Xilana	7,0	5120
2	Cynodon	Xilana	7,0	3369
2	Cynodon	Xilana	6,5	6049
2	Cynodon	Xilana	6,5	5895
2	Cynodon	Xilana	6,5	5753
2	Cynodon	Xilana	6,5	5830
2	Cynodon	Xilana	6,5	5624
2	Cynodon	Xilana	6,5	5830
2	Cynodon	Xilana	6,5	5766
2	Cynodon	Xilana	6,5	5689
2	Cynodon	Xilana	6,5	5547
2	Cynodon	Xilana	6,5	5470
2	Cynodon	Xilana	6,0	6369
2	Cynodon	Xilana	6,0	6176
2	Cynodon	Xilana	6,0	6073
2	Cynodon	Xilana	6,0	5636
2	Cynodon	Xilana	6,0	6863
2	Cynodon	Xilana	6,0	6953
2	Cynodon	Xilana	6,0	6953
2	Cynodon	Xilana	6,0	6618
2	Cynodon	Xilana	6,0	5455
2	Cynodon	Xilana	6,0	6786
2	Cynodon	Xilana	5,5	1788
2	Cynodon	Xilana	5,5	1286
2	Cynodon	Xilana	5,5	1711
2	Cynodon	Xilana	5,5	1376
2	Cynodon	Xilana	5,5	1440
2	Cynodon	Xilana	5,5	1428

2	Cynodon	Xilana	5,5	1363
2	Cynodon	Xilana	5,5	951
2	Cynodon	Xilana	5,5	1093
2	Cynodon	Xilana	5,5	1273

Apêndice D - Atividade de enzimas bacterianas ruminais (nmol de açúcares redutores liberados/ g de MS/ minuto) extraídas de resíduo de azevém ou cynodon incubadas com carboximetilcelulose (CMC) ou xilana com diferentes concentrações de glicose adicionadas ao substrato.

Ensaio	Resíduo	Substrato	mg glicose/dL substrato	Ativ. Enzimática
1	Azevém	CMC	0	2515
1	Azevém	CMC	0	2697
1	Azevém	CMC	0	2682
1	Azevém	CMC	0	2599
1	Azevém	CMC	0	2614
1	Azevém	CMC	0	2553
1	Azevém	CMC	0	2447
1	Azevém	CMC	0	2568
1	Azevém	CMC	0	2584
1	Azevém	CMC	0	2796
1	Azevém	CMC	100	2802
1	Azevém	CMC	100	3576
1	Azevém	CMC	100	4563
1	Azevém	CMC	100	4745
1	Azevém	CMC	100	4745
1	Azevém	CMC	100	5481
1	Azevém	CMC	100	4365
1	Azevém	CMC	100	3667
1	Azevém	CMC	100	4487
1	Azevém	CMC	100	4699
1	Azevém	CMC	200	6928
1	Azevém	CMC	200	6047
1	Azevém	CMC	200	6715
1	Azevém	CMC	200	6775
1	Azevém	CMC	200	6472
1	Azevém	CMC	200	6533
1	Azevém	CMC	200	6016
1	Azevém	CMC	200	6168
1	Azevém	CMC	200	6168
1	Azevém	CMC	200	6533
1	Azevém	CMC	300	5793
1	Azevém	CMC	300	4852
1	Azevém	CMC	300	4244
1	Azevém	CMC	300	4214
1	Azevém	CMC	300	4791
1	Azevém	CMC	300	5246
1	Azevém	CMC	300	5003
1	Azevém	CMC	300	5125

1	Azevém	CMC	300	5003
1	Azevém	CMC	300	4700
1	Cynodon	CMC	0	1450
1	Cynodon	CMC	0	1475
1	Cynodon	CMC	0	1401
1	Cynodon	CMC	0	1383
1	Cynodon	CMC	0	1493
1	Cynodon	CMC	0	1316
1	Cynodon	CMC	0	1621
1	Cynodon	CMC	0	1852
1	Cynodon	CMC	0	2340
1	Cynodon	CMC	0	1740
1	Cynodon	CMC	100	3751
1	Cynodon	CMC	100	3975
1	Cynodon	CMC	100	3368
1	Cynodon	CMC	100	3170
1	Cynodon	CMC	100	3751
1	Cynodon	CMC	100	3804
1	Cynodon	CMC	100	3962
1	Cynodon	CMC	100	4728
1	Cynodon	CMC	100	4160
1	Cynodon	CMC	100	3632
1	Cynodon	CMC	200	6225
1	Cynodon	CMC	200	6463
1	Cynodon	CMC	200	6331
1	Cynodon	CMC	200	6383
1	Cynodon	CMC	200	6146
1	Cynodon	CMC	200	6436
1	Cynodon	CMC	200	6251
1	Cynodon	CMC	200	6278
1	Cynodon	CMC	200	6278
1	Cynodon	CMC	200	5935
1	Cynodon	CMC	300	5829
1	Cynodon	CMC	300	5090
1	Cynodon	CMC	300	5839
1	Cynodon	CMC	300	5539
1	Cynodon	CMC	300	5882
1	Cynodon	CMC	300	6806
1	Cynodon	CMC	300	7123
1	Cynodon	CMC	300	7730
1	Cynodon	CMC	300	7281
1	Cynodon	CMC	300	7730
1	Azevém	Xilana	0	15801
1	Azevém	Xilana	0	16097
1	Azevém	Xilana	0	15801
1	Azevém	Xilana	0	14288

1	Azevém	Xilana	0	13614
1	Azevém	Xilana	0	13976
1	Azevém	Xilana	0	13614
1	Azevém	Xilana	0	13598
1	Azevém	Xilana	0	13976
1	Azevém	Xilana	0	13713
1	Azevém	Xilana	100	14865
1	Azevém	Xilana	100	15128
1	Azevém	Xilana	100	14405
1	Azevém	Xilana	100	16707
1	Azevém	Xilana	100	16542
1	Azevém	Xilana	100	15589
1	Azevém	Xilana	100	15424
1	Azevém	Xilana	100	16641
1	Azevém	Xilana	100	16345
1	Azevém	Xilana	100	15687
1	Azevém	Xilana	200	16616
1	Azevém	Xilana	200	18951
1	Azevém	Xilana	200	16616
1	Azevém	Xilana	200	18063
1	Azevém	Xilana	200	18491
1	Azevém	Xilana	200	18556
1	Azevém	Xilana	200	15465
1	Azevém	Xilana	200	15017
1	Azevém	Xilana	200	15597
1	Azevém	Xilana	300	9343
1	Azevém	Xilana	300	6877
1	Azevém	Xilana	300	7699
1	Azevém	Xilana	300	8932
1	Azevém	Xilana	300	10083
1	Azevém	Xilana	300	9672
1	Azevém	Xilana	300	11316
1	Azevém	Xilana	300	11316
1	Azevém	Xilana	300	9096
1	Azevém	Xilana	300	8274
1	Cynodon	Xilana	0	7005
1	Cynodon	Xilana	0	8006
1	Cynodon	Xilana	0	7724
1	Cynodon	Xilana	0	7403
1	Cynodon	Xilana	0	7813
1	Cynodon	Xilana	0	7762
1	Cynodon	Xilana	0	7711
1	Cynodon	Xilana	0	7788
1	Cynodon	Xilana	0	7390
1	Cynodon	Xilana	0	7839
1	Cynodon	Xilana	100	9169

1	Cynodon	Xilana	100	9169
1	Cynodon	Xilana	100	10530
1	Cynodon	Xilana	100	10556
1	Cynodon	Xilana	100	10710
1	Cynodon	Xilana	100	10325
1	Cynodon	Xilana	100	11069
1	Cynodon	Xilana	100	10222
1	Cynodon	Xilana	100	9067
1	Cynodon	Xilana	100	9400
1	Cynodon	Xilana	200	10714
1	Cynodon	Xilana	200	12254
1	Cynodon	Xilana	200	11997
1	Cynodon	Xilana	200	12767
1	Cynodon	Xilana	200	11278
1	Cynodon	Xilana	200	11535
1	Cynodon	Xilana	200	10483
1	Cynodon	Xilana	200	11663
1	Cynodon	Xilana	200	11201
1	Cynodon	Xilana	200	10919
1	Cynodon	Xilana	300	6145
1	Cynodon	Xilana	300	6979
1	Cynodon	Xilana	300	6145
1	Cynodon	Xilana	300	6273
1	Cynodon	Xilana	300	6915
1	Cynodon	Xilana	300	6209
1	Cynodon	Xilana	300	3450
1	Cynodon	Xilana	300	4028
1	Cynodon	Xilana	300	5632
1	Cynodon	Xilana	300	4017
2	Azevém	CMC	0	3021
2	Azevém	CMC	0	3756
2	Azevém	CMC	0	3259
2	Azevém	CMC	0	3080
2	Azevém	CMC	0	2961
2	Azevém	CMC	0	3436
2	Azevém	CMC	0	2951
2	Azevém	CMC	0	3100
2	Azevém	CMC	0	2524
2	Azevém	CMC	0	2892
2	Azevém	CMC	100	5834
2	Azevém	CMC	100	5184
2	Azevém	CMC	100	6217
2	Azevém	CMC	100	4906
2	Azevém	CMC	100	6436
2	Azevém	CMC	100	6018
2	Azevém	CMC	100	5654

2	Azevém	CMC	100	5954
2	Azevém	CMC	100	4886
2	Azevém	CMC	100	5263
2	Azevém	CMC	200	15934
2	Azevém	CMC	200	16053
2	Azevém	CMC	200	15179
2	Azevém	CMC	200	13232
2	Azevém	CMC	200	12318
2	Azevém	CMC	200	10927
2	Azevém	CMC	200	12498
2	Azevém	CMC	200	8980
2	Azevém	CMC	200	9576
2	Azevém	CMC	200	11777
2	Azevém	CMC	300	9323
2	Azevém	CMC	300	5688
2	Azevém	CMC	300	6880
2	Azevém	CMC	300	7317
2	Azevém	CMC	300	5608
2	Azevém	CMC	300	7635
2	Azevém	CMC	300	9741
2	Azevém	CMC	300	10854
2	Azevém	CMC	300	11052
2	Azevém	CMC	300	9701
2	Cynodon	CMC	0	2559
2	Cynodon	CMC	0	2673
2	Cynodon	CMC	0	2288
2	Cynodon	CMC	0	2481
2	Cynodon	CMC	0	2438
2	Cynodon	CMC	0	2424
2	Cynodon	CMC	0	2481
2	Cynodon	CMC	0	2459
2	Cynodon	CMC	0	2481
2	Cynodon	CMC	0	2459
2	Cynodon	CMC	100	4520
2	Cynodon	CMC	100	4636
2	Cynodon	CMC	100	4272
2	Cynodon	CMC	100	4432
2	Cynodon	CMC	100	3778
2	Cynodon	CMC	100	3749
2	Cynodon	CMC	100	4578
2	Cynodon	CMC	100	4621
2	Cynodon	CMC	100	4301
2	Cynodon	CMC	100	4592
2	Cynodon	CMC	200	7606
2	Cynodon	CMC	200	7140
2	Cynodon	CMC	200	5046

2	Cynodon	CMC	200	6181
2	Cynodon	CMC	200	5715
2	Cynodon	CMC	200	3737
2	Cynodon	CMC	200	4755
2	Cynodon	CMC	200	5081
2	Cynodon	CMC	200	2690
2	Cynodon	CMC	200	2748
2	Cynodon	CMC	300	4759
2	Cynodon	CMC	300	5079
2	Cynodon	CMC	300	6883
2	Cynodon	CMC	300	5079
2	Cynodon	CMC	300	6423
2	Cynodon	CMC	300	4962
2	Cynodon	CMC	300	6009
2	Cynodon	CMC	300	6242
2	Cynodon	CMC	300	5748
2	Cynodon	CMC	300	6038
2	Azevém	Xilana	0	12895
2	Azevém	Xilana	0	12531
2	Azevém	Xilana	0	13320
2	Azevém	Xilana	0	12733
2	Azevém	Xilana	0	13907
2	Azevém	Xilana	0	13037
2	Azevém	Xilana	0	13765
2	Azevém	Xilana	0	13462
2	Azevém	Xilana	100	12009
2	Azevém	Xilana	100	12252
2	Azevém	Xilana	100	12454
2	Azevém	Xilana	100	11685
2	Azevém	Xilana	100	12130
2	Azevém	Xilana	100	12495
2	Azevém	Xilana	100	12778
2	Azevém	Xilana	100	12697
2	Azevém	Xilana	200	16964
2	Azevém	Xilana	200	14050
2	Azevém	Xilana	200	16236
2	Azevém	Xilana	200	15264
2	Azevém	Xilana	200	16843
2	Azevém	Xilana	200	16600
2	Azevém	Xilana	200	14940
2	Azevém	Xilana	200	16479
2	Azevém	Xilana	300	10343
2	Azevém	Xilana	300	10444
2	Azevém	Xilana	300	8420
2	Azevém	Xilana	300	9129
2	Azevém	Xilana	300	8623

2	Azevém	Xilana	300	9230
2	Azevém	Xilana	300	8623
2	Azevém	Xilana	300	10849
2	Cynodon	Xilana	0	16884
2	Cynodon	Xilana	0	16170
2	Cynodon	Xilana	0	16621
2	Cynodon	Xilana	0	16302
2	Cynodon	Xilana	0	16377
2	Cynodon	Xilana	0	16189
2	Cynodon	Xilana	0	16452
2	Cynodon	Xilana	0	16658
2	Cynodon	Xilana	100	10795
2	Cynodon	Xilana	100	12307
2	Cynodon	Xilana	100	12860
2	Cynodon	Xilana	100	12598
2	Cynodon	Xilana	100	12162
2	Cynodon	Xilana	100	12220
2	Cynodon	Xilana	100	11231
2	Cynodon	Xilana	100	11900
2	Cynodon	Xilana	200	15403
2	Cynodon	Xilana	200	14647
2	Cynodon	Xilana	200	13861
2	Cynodon	Xilana	200	15752
2	Cynodon	Xilana	200	16130
2	Cynodon	Xilana	200	16159
2	Cynodon	Xilana	200	16479
2	Cynodon	Xilana	200	14007
2	Cynodon	Xilana	300	10063
2	Cynodon	Xilana	300	9482
2	Cynodon	Xilana	300	10645
2	Cynodon	Xilana	300	9991
2	Cynodon	Xilana	300	9482
2	Cynodon	Xilana	300	10572
2	Cynodon	Xilana	300	9409
2	Cynodon	Xilana	300	8900

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)