

Degradabilidade *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas**In vitro degradability of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes**

DOI: 10.34188/bjaerv3n3-109

Recebimento dos originais: 20/05/2020

Aceitação para publicação: 20/06/2020

Fábio Martins Oliveira

Mestre em Zootecnia pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga-BA
Endereço: BR 415, km 04, S/Nº, CEP 45000-700, Itapetinga-BA
E-mail: atgpecuaria@hotmail.com.br, fmo.pc@bol.com.br

Mauro Pereira de Figueiredo

Doutor em Medicina Veterinária pela Tierärztliche Hochschule Hannover
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil,
Caixa-postal: 95
E-mail: mfigue2@yahoo.com.br

João Paulo Santos Roseira

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil,
Caixa-postal: 95
E-mail: joaopaulosantosroseira@yahoo.com.br

Roseane Mendonça de Figueiredo

Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos pela Universidade de São Paulo
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil
E-mail: fraurose@hotmail.com

Joel Queiroga Ferreira

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil
E-mail: jqferreira2009@gmail.com

Egídio Carlos de Oliveira Padre

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil
E-mail: egidio.carlos@hotmail.com

Fernando Salgado Bernardino

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa

Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
 Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil
 E-mail: fsbernardino@gmail.com

Yann dos Santos Luz

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB

Instituição: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus Vitória da Conquista-BA
 Endereço: Estrada do Bem Querer km 04, CEP: 45083-900 - Vitória da Conquista, BA – Brasil
 E-mail: yann_agronomia@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) do bagaço de cana com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. O bagaço de origem não industrial, foi submetido a dois níveis de uréia (0 e 7%) e três níveis de enzimas fibrolíticas (0; 0,5 e 1%) na base seca. Amostras de 0,5 g dos bagaços foram incubadas por períodos de 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 h. Para DIVMS, verificou-se interação ($P < 0,05$) entre uréia e enzimas fibrolíticas para tempo de colonização (TC). Para o bagaço sem adição de uréia, a adição de enzimas não alterou este parâmetro. Porém, nos bagaços que receberam uréia foram encontrados maiores TC ($P < 0,05$) para o bagaço com 0,5% de enzimas em relação ao bagaço que não recebeu enzimas e com 1% de enzimas. A fração solúvel “a”, coeficiente “c”, e degradabilidade efetiva (DE) a taxas de passagem de 2, 5 e 8% decresceram ($P < 0,05$), enquanto que a fração potencialmente degradável “b” e degradabilidade potencial (DP) não sofreram alteração com o uso da uréia. A adição de enzimas nas doses de 0,5 e 1% elevou a DE. Conclui-se que a adição de uréia reduz a fração solúvel “a”, coeficiente “c” e DE da MS no bagaço obtido de forma artesanal na fabricação de aguardentes. A adição de enzimas na dose de 0,5 e 1% eleva a DE da MS. O uso de uréia e enzimas no bagaço com teores mais elevados de carboidratos não fibrosos, do que os de origem industrial, aumenta o TC da MS e não altera os parâmetros de degradação e degradabilidade da FDN.

Palavras-chave: celulase, hemicelulase, tratamento químico, volumoso.

ABSTRACT

The objective of this study was evaluate the *in vitro* degradability of dry matter (IVDDM) and neutral detergent fiber (NDF) of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes. The bagasse non industrial source was subjected to two levels of urea (0 and 7%) and three levels of fibrolytic enzymes (0, 0.5 and 1%), based on DM. Samples of 0.5 g of bagasse were incubated for periods of 0 (washed directly), 6, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h. For IVDDM, there was interaction ($P < 0.05$) between urea and fibrolytic enzymes to colonization time (CT). For the bagasse without the addition of urea, the addition of enzymes did not change this parameter. The soluble fraction "a", coefficient "c", and effective degradability (ED), passage rates of 2, 5, and 8% decrease ($P < 0.05$), while the fraction potentially degradable "b" and potential degradability (PD) did not change with the use of urea. The addition of enzymes at doses of 0.5 and 1% increases the ED. It is concluded that the addition of urea reduces the soluble fraction "a", coefficient "c" and effective degradability (ED) of DM, on bagasse of non industrial origin. The addition of enzymes in doses of 0.5 and 1% increases the ED of DM. The use of urea and enzymes on bagasse with higher levels of non-fiber carbohydrates, than those of industrial origin, increases the CT da DM, and does not change the parameters of degradation and degradability of NDF.

Keywords: cellulase, hemicellulose, chemical treatment, bulky.

1 INTRODUÇÃO

O corte da cana-de-açúcar para processamento agroindustrial coincide com o período de escassez das pastagens. Assim, a elevada disponibilidade do bagaço da cana nas regiões onde tradicionalmente se produz aguardentes, representa uma alternativa para os problemas da redução da disponibilidade de alimentos volumosos para os ruminantes.

Entretanto, este volumoso constituído basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, tem sua utilização restrita por ser considerado volumoso de baixa qualidade nutricional. Assim, buscando melhorar o seu valor nutritivo, têm-se despendido esforços para encontrar meios de disponibilizar os nutrientes para ruminantes, com o uso da amonização (Gesualdi et al., 2001; Sarmiento et al., 2001).

Uma das formas de se determinar a eficácia da amonização se dá por meio da avaliação da degradabilidade ruminal dos volumosos (Pires et al., 2004). De acordo com Paiva et al. (1995), a degradação ruminal e o consumo de alimentos geralmente estão correlacionados, e o conhecimento da extensão da degradabilidade de forragens submetidas à amonização permite, portanto, obter estimativas da ingestão voluntária desses alimentos pelos ruminantes.

Mais recentemente, pesquisas com o uso de enzimas fibrolíticas exógenas tem sido conduzidas com o objetivo de aumentar o valor nutritivo dos alimentos volumosos e palhadas na alimentação de ruminantes. A aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas diretamente no alimento promove a liberação de carboidratos solúveis e remove barreiras estruturais que limitam a digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais (Beauchemin et al., 2000).

Resultados promissores foram encontrados por Tang et al. (2008), quando relataram que os níveis de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) de 5,0 e 7,5 g/kg MS proporcionaram os maiores valores de DIVMS e DIVMO em palhadas de cereais.

O tratamento de resíduos com elevado teor de fibra com uréia ou enzimas fibrolíticas tem isoladamente, proporcionado incrementos na degradabilidade ruminal e digestibilidade destes volumosos. Entretanto, o uso de enzimas fibrolíticas exógenas, posteriormente à amonificação, não foi ainda verificado no bagaço de cana.

Assim, objetivou-se avaliar a cinética de degradação ruminal *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar, de origem não industrial, com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas (celulases e hemicelulases).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no Campus de Vitória da Conquista, BA, no período de 30 de junho a 04 de agosto de 2010, com temperatura média de 17,3 °C, apresentando média para a máxima e mínima de 22,19 e 14,12 °C respectivamente, durante o período experimental.

Realizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%) com base na matéria seca, com 3 repetições (U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% de enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas e U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas).

As enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas, foram extraídas dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Humicola insolens*. O produto¹ a base de celulasas e hemicelulasas, tem apresentação na forma líquida, coloração marrom, densidade de 1,2 g/mL, tendo como condições ótimas para atividade enzimática da celulase 45-50 °C e pH 4,5-6,5 e, da hemicelulase, 40-60 °C e pH 5,0-6,5. Esta última, além da hemicelulase, contém outras enzimas, incluindo β -glucanases, xilanases, arabinases, celulasas e pentosanases.

Para a avaliação da atividade das enzimas celulasas e hemicelulasas, utilizou-se a metodologia descrita por Yoshioka et al. (1981) e Miller (1959). Para o preparo do meio foram homogeneizados 10 g de farelo de trigo e 10 mL de água destilada, ambos esterilizados. O preparo das enzimas foi feito com 9,95 mL de água destilada e 50 μ L de enzima, sendo utilizados 2 mL da solução. Foi feito controle positivo com solução de glicose a 0,5% em água destilada e outro, constituído apenas por farelo de trigo. Após período de incubação de 48 h, os extratos (triplicatas) foram obtidos por filtração com bomba a vácuo, e as leituras das respectivas absorbâncias determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC em λ de 540 nm. A quantificação dos açúcares redutores dos extratos recuperados, que representam as atividades das enzimas, foram de 51 e 28 mg/mL para celulasas e hemicelulasas, respectivamente, mostrando a efetividade das enzimas.

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizado, foi adquirido em usina de produção artesanal de cachaça da região de Vitória da Conquista-BA e, após o descarregamento, foi picado em máquina forrageira estacionária.

No bagaço de cana (4,5 kg de MN por unidade experimental) sem adição de uréia, apenas com enzimas (U0E05 e U0E1), após mensurar o pH e sem necessitar ajustá-los, as quantidades de 7,5 mL e 15 mL de enzimas, que correspondem a 0,5% e 1% de enzimas na base seca, foram diluídas em 100

¹ Novozymes Latin America Ltda: celulase (NS 50013) e hemicelulase (NS 22022).

mL de água destilada, na proporção de 60% de celulase e 40% de hemicelulase, sendo borrifadas no bagaço, deixando-as agir por 30 min (Kung Jr. et al., 2002). Em seguida, foram coletadas amostras de cada unidade experimental, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises. O restante do material foi vedado com fitas adesivas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m e armazenados em local protegido e cobertos com lona plástica durante o mesmo período do bagaço de cana com uréia.

No bagaço de cana com inclusão de uréia usou-se a quantidade de 7% de uréia (base MS), que foi misturada ao bagaço (4,5 kg de MN por unidade experimental), homogeneizadas e acondicionadas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m. Após o enchimento, todos os sacos foram vedados com fitas adesivas e armazenados em local protegido e cobertos com uma lona plástica durante o período de 35 dias, como recomendado por Sundstol et al. (1978).

Ao final do período de amonização, os sacos foram abertos e aerados por 6 h para permitir a liberação do excesso de amônia. Apenas no bagaço de cana com 7% de uréia e 1% de enzimas, devido à elevação do pH (6,90) após a amonização, foi necessário ajustar o pH para 5,0, utilizando 75 mL de ácido sulfúrico 1,0N. Logo após, foi aplicada a dose proposta de enzimas, da mesma forma do bagaço de cana com 0% de uréia e 0,5% de enzimas, e 0% de uréia e 1% de enzimas, deixando-as agir por 30 min. Em seguida foram coletadas amostras, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises.

As amostras coletadas em cada combinação, uréia e enzimas, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C, por 72 h, sendo posteriormente processadas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivos de 1 mm. A composição químico-bromatológica, carboidratos não-fibrosos (CNF) (Tabela 1), e contagem de unidades formadoras de colônias dos bagaços estudados, foram obtidas segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2005), Nunes et al. (2005), Sniffen et al. (1992) e Silva et al. (1997).

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Variáveis	Tratamentos					
	U0E0	U0E05	U0E1	U7E0	U7E05	U7E1
MS (%)	40,14	38,77	39,16	36,08	33,71	35,93
PB (%MS)	1,21	1,21	1,28	18,94	20,48	19,72
FDN (%MS)	66,58	65,65	66,92	73,93	74,34	72,83
FDNcp	66,10	65,39	66,72	73,49	73,97	72,52
FDA (%MS)	46,36	45,60	45,80	52,34	50,19	50,71
Extrato etéreo	1,44	1,75	1,68	3,14	3,03	1,75
Hemicelulose (%MS)	23,51	23,21	23,57	25,08	26,08	24,35
Celulose (%MS)	35,65	34,96	34,95	40,48	39,46	39,41
Lignina (%MS)	9,47	9,61	11,30	12,14	11,05	11,16
Cinzas (%MS)	1,02	1,01	1,05	1,10	1,14	1,33
NIDA (%NT)	28,86	12,22	22,73	3,31	3,18	3,16
NIDN (%NT)	40,66	29,26	27,57	4,41	4,52	4,07
CNF (%MS)	30,23	30,63	29,27	3,33	1,39	4,68

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA: fibra em detergente ácido; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro; CNF: carboidratos não-fibrosos.

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se duas vacas holandesas, canuladas no rúmen, com peso vivo médio de 500 kg, mantidas em pasto de *Brachiaria decumbens*. Os fluidos colhidos dos dois animais foram misturados para compor o volume necessário à condução dos ensaios.

A solução tampão foi preparada em recipientes pré-aquecidos (39 °C). A solução A (g/litro) foi composta por: 10,0 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g NaCl ; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g uréia e a solução B (g/100mL): 15,0 g Na_2CO_3 ; 1,0 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. As soluções foram misturadas adicionando-se cerca de 266 mL de solução B para 1330 mL de solução A (relação 1:5), a um pH final de 6,8 e temperatura de 39 °C.

Para determinar a degradabilidade *in vitro* da MS e FDN do bagaço foi utilizada metodologia ANKOM (ANKOM TECHNOLOGY, 2010), adaptada ao rúmen artificial, utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL). Foram colocados 0,5 g de amostra do bagaço de cana em sacos de filtro (F-57 ANKOM), que em seguida foram lacrados a quente utilizando-se uma seladora com lâmina incandescente marca Barbi M-300T. Os sacos foram colocados em sete jarros de incubação de vidro, sendo 24 amostras por jarro. Cada jarro correspondeu a um dos tempos de incubação, sendo 0 (lavados diretamente), 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas.

Após o período de incubação, os sacos de filtro foram retirados e lavados em água corrente, até o total clareamento, por aproximadamente 5 min. Após a lavagem, todos os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada (65 °C/48 h) e, na sequência, em estufa não-ventilada (105 °C/4 h), acondicionados em dessecador e pesados.

A determinação da degradação da FDN foi efetuada de acordo com a metodologia ANKOM (ANKOM TECHNOLOGY, 2010), com o uso do aparelho para determinação da fibra TE-149 (TECNAL). Após a digestão em detergente neutro por 1 h a 100 °C, os sacos de filtro foram lavados em água quente 4 vezes durante 5 min, e acetona durante 5 min. Após esse tratamento, os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada (65 °C/48 h) e em estufa não-ventilada (105 °C/4 h), acondicionados em dessecador e pesados.

As estimativas da fração degradada da matéria seca e da FDN foram obtidas pela diferença de peso encontrada entre as pesagens efetuadas antes e após a incubação no rúmen artificial e a extração com detergente neutro, expressos em porcentagem.

Foi utilizado o modelo de McDonald (1981) para a estimativa da degradabilidade potencial da MS e parâmetros da cinética da degradabilidade ruminal de cada bagaço de cana, de acordo com a fórmula: $p = a + b(1 - e^{-c \times (t-L)})$, em que “p”, é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h^{-1}); “t”, tempo de incubação (h) e “L”, tempo de colonização.

Para a fração fibrosa (FDN), foi utilizado o modelo de Mertens & Loften (1980), de acordo com a fórmula: $\hat{Y} = b \times e^{-c \times (T-L)} + I$ quando $t > L$ e $\hat{Y} = b + I$ quando $0 < t < L$, onde “Y” é o resíduo não degradável no tempo T; “b”, a fração potencialmente degradável da fibra (no tempo $t \leq L$, $b = \hat{Y} - I$); “c”, a taxa de degradação de b (h^{-1}); “T”, o período de incubação, em horas; “L”, a latência ou tempo de incubação (h); e “I”, a fração indigestível da fibra.

A degradabilidade efetiva do bagaço de cana-de-açúcar foi calculada pela fórmula: $p = a + [(b \times c) / (c + k) \times e^{-(c+k) \times L}]$ em que “k”, é a taxa de passagem (McDonald, 1981). Utilizaram-se as taxas de passagem de 2, 5 e 8% para o cálculo da degradabilidade efetiva.

Utilizou-se um esquema fatorial 2x3, com duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas fibrolíticas (0; 0,5 e 1%), em delineamento inteiramente casualizado, com seis combinações entre dose de uréia e enzimas fibrolíticas e três repetições, em oito períodos de incubação (0, 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas). O ensaio foi analisado como parcelas subdivididas, onde os tratamentos corresponderam às parcelas, e os tempos de incubação, às subparcelas. Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SAS (1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exceção da fração “b”, observou-se efeito significativo do uso da uréia ($P < 0,05$) para a fração “a” e coeficiente “c” nos parâmetros da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca (Tabela 3).

Para a fração “a”, observou-se que nos bagaços de cana amonizados, os valores médios foram significativamente menores (29,07%), quando comparados ao bagaço de cana sem uréia (32,78%).

Via de regra, o uso da uréia na amonização de resíduos agrícolas, promove aumento no teor de nitrogênio não-protéico e, como este é altamente solúvel em água, ocorre aumento da fração “a” (Carvalho et al., 2007), o que não foi constatado no presente trabalho. Uma das possíveis hipóteses, reside no fato de os microrganismos (bactérias e leveduras) terem utilizado o N que foi disponibilizado pela adição da uréia, consumindo assim, ao mesmo tempo, a elevada quantidade de carboidratos não fibrosos (30,23%) ainda existentes no bagaço de cana. Estes se mostraram superiores aos teores de CNF de bagaços oriundos de usinas de álcool que apresentam valores médios de 17,36% (Ferreira et al., 2009). Devido ao método de extração do caldo da cana ser mais eficiente nos processos industriais, quando comparado ao bagaço gerado em alambiques de produção de cachaça artesanal, os teores de CNF são inferiores nos primeiros. Esta hipótese encontra amparo na maior quantidade de UFC encontrada nos bagaços com uréia (Tabela 2).

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) para bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamentos	LogUFC/g
U0E0	15,87ab
U0E05	12,80b
U0E1	13,17b
U7E0	18,17a
U7E05	17,63a
U7E1	18,03a

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem ($P > 0,05$) pelo teste t.

O uso de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas não influenciou ($P > 0,05$) a fração “b”, apresentando valor médio para esta variável de 28,97%. Dessa forma, observa-se que a amônia liberada pela adição da uréia não foi eficiente em solubilizar a hemicelulose do bagaço de cana, resultando em aumento da fração “b” do bagaço de cana. De forma oposta, Pires et al. (2004) verificaram menores valores da fração “b” no bagaço de cana controle e com Na_2S (40,85 e 44,74%), e maiores para os bagaços com NH_3 e com $\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{S}$ (53,26 e 48,81%), respectivamente. Diferenças nesta fração foram também constatadas por Martins et al. (2007) em bagaço de cana, sem e com adição de enzimas fibrolíticas exógenas, com valores de 33,27 e 42,57%, respectivamente.

Para o coeficiente “c”, observou-se médias significativamente menores nos bagaços de cana amonizados (0,02%/h), quando comparados ao bagaço de cana sem uréia (0,03%/h). Resultados semelhantes a este último para taxa de degradação, foram encontrados por Carvalho et al. (2007) com bagaço de cana amonizado com uréia, sendo os valores de 0,035 e 0,036%/h para 0 e 7,5% de uréia (base MS), respectivamente. Também Krueger et al. (2008) trabalhando com enzimas fibrolíticas (Biocellulase A20) e NH₃ em feno de capim bermuda, relataram que o coeficiente “c” não foi afetado, apresentando valores de 4,75; 5,14; 4,27; 3,84 e 4,09%/h para o controle, NH₃ e enzimas aplicadas após o corte, no enfardamento e no momento da alimentação dos animais, respectivamente.

Tabela 3 - Resultados médios da fração solúvel (a), fração potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	a (%)		
0	32,12	28,39	30,25A
0,5	32,77	29,37	31,07A
1	33,46	29,44	31,45A
Média	32,78a	29,07b	
			CV (%) = 2,61
	b (%)		
0	27,50	28,76	28,12A
0,5	28,22	32,91	30,57A
1	26,81	29,63	28,22A
Média	27,51a	30,43a	
			CV (%) = 12,41
	c (%/h)		
0	0,03	0,02	0,02A
0,5	0,03	0,02	0,02A
1	0,03	0,03	0,02A
Média	0,03a	0,02b	
			CV (%) = 23,96

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se efeito significativo do uso da uréia e das enzimas fibrolíticas exógenas ($P < 0,05$) para a degradabilidade efetiva (DE), havendo interação entre a uréia e as doses de enzimas fibrolíticas para o tempo de colonização nos parâmetros da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca (Tabela 4).

Tabela 4 - Degradabilidade potencial (DP) e efetiva (DE) e tempo de colonização da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	DP (%)		
0	59,62	57,15	58,38A
0,5	60,99	62,29	61,64A
1	60,27	59,08	59,67A
Média	60,29a	59,51a	
			CV (%) = 5,48
	DE 2%/h (%)		
0	45,84	38,62	42,23B
0,5	46,52	39,57	43,04AB
1	46,91	41,81	44,36A
Média	46,42a	40,00b	
			CV (%) = 2,68
	DE 5%/h (%)		
0	39,96	32,95	36,45B
0,5	40,37	33,47	36,92AB
1	41,01	35,58	38,29A
Média	40,44a	34,00b	
			CV (%) = 2,78
	DE 8%/h (%)		
0	37,30	30,84	34,07B
0,5	37,69	31,41	34,55AB
1	38,44	33,08	35,76A
Média	37,81a	31,77b	
			CV (%) = 2,83
	Tempo de colonização (h)		
0	3,45Ab	9,21Ba	6,33
0,5	3,97Ab	11,35Aa	7,66
1	3,02Ab	6,23Ca	4,62
Média	3,48	8,93	
			CV (%) = 14,37

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O uso de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas não influenciou ($P>0,05$) a DP, apresentando valor médio de 59,89% e, para DE, observou-se médias significativamente menores nos bagaços com uréia, com valores de 40,00; 34,00 e 31,77%; e de 46,42; 40,44 e 37,81% nos sem uréia, para taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h, respectivamente.

Estes resultados são diferentes dos encontrados por Carvalho et al. (2007) ao amonizarem o bagaço de cana com uréia nas doses de 0; 2,5; 5,0 e 7,5% (base MS), que obtiveram para as doses de uréia utilizadas os valores de 41,36; 46,06; 66,27 e 71,87% para DP; 26,32; 29,61; 42,60 e 46,20% para DE com taxa de passagem de 2%; 17,03; 19,28; 27,74 e 30,09% com taxas de passagem de 5%; e 12,59; 14,29; 20,57 e 22,30% com taxa de passagem de 8%, respectivamente.

Quando volumosos são amonizados, há uma tendência de os parâmetros da degradabilidade aumentarem devido ao incremento no teor protéico do alimento, assim como, ocorrer à solubilização da hemicelulose com decréscimo nos teores de FDN, o que elevaria as taxas de degradação destes

materiais. O decréscimo encontrado na fração solúvel (a) para o bagaço com ou sem uréia (32,78 e 29,07%, respectivamente), influenciou negativamente os resultados da degradabilidade efetiva (Tabela 4).

Em relação à aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas, as maiores degradabilidades efetivas a taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h, foram observadas nos bagaços de cana que receberam as doses de 0,5 e 1% de enzimas, que não diferiram ($P>0,05$) entre si, evidenciando o efeito positivo da adição de enzimas.

Segundo Beauchemin et al. (2000) a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas diretamente no alimento, promove a liberação de carboidratos solúveis devido a remoção de barreiras estruturais que limitariam a digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais.

Martins et al. (2007) trabalhando também com o bagaço de cana, demonstraram aumento da DP de 38,5 para 47,2% e DE (2%/h) da MS de 28,22 para 31,43% sem e com adição de enzimas fibrolíticas exógenas, respectivamente. Estes autores relataram que o teor de fibra existente no bagaço de cana pode ter disponibilizado maior número de sítios de degradação para a atuação enzimática de origem microbiana ou do próprio suplemento, uma vez que as enzimas foram aplicadas dentro do rúmen através de cânula ruminal, com isso propiciando maior tempo de contato entre a enzima e o bagaço.

Ao se avaliar o tempo de colonização (TC) verificou-se que, para o bagaço de cana sem adição de uréia, a adição de enzimas fibrolíticas não alterou este parâmetro. Porém, nos bagaços de cana que receberam uréia foram encontrados maiores TC ($P<0,05$) para o bagaço com 0,5% de enzimas fibrolíticas em relação aos demais. Ao se estudar o fator uréia dentro das doses de enzimas foram encontrados maiores TC ($P<0,05$) nos bagaços que receberam uréia.

Miranda et al. (1999) relataram valores de 2,5 a 3,0 h de tempo de colonização em incubações com restos da cultura de milho com 70% de FDN. Krueger et al. (2008), trabalhando com feno de capim bermuda, encontraram valores de 5,1; 4,3; 5,5; 3,7 e 4,4 h para tempo de colonização nos respectivos tratamentos: controle, NH_3 (3% base MS) e enzimas fibrolíticas exógenas (16,5 g/t) aplicadas no momento do corte, no enfardamento e no momento da alimentação, os quais são menores que os observados neste estudo.

Quanto menor o tempo de colonização, mais rapidamente a microbiota ruminal conseguirá degradar o alimento. Com isso, alimentos de baixa degradabilidade ruminal necessitam de um tempo mais longo para a ação dos microrganismos ruminais. Diante deste fato, observou-se que o uso da uréia e das enzimas fibrolíticas exógenas no bagaço de cana não contribuíram para diminuir o tempo

de colonização. Contrariando o esperado, ocorreu elevação para este parâmetro na degradabilidade da MS, em conformidade com as equações descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Equações ajustadas para a degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	Equações ajustadas	R2
U0E0	$\hat{Y} = p = 32,12 + 27,50 \times (1 - e^{-0,033x(t-3,45)})$	96,35
U0E05	$\hat{Y} = p = 32,77 + 28,22 \times (1 - e^{-0,028x(t-3,97)})$	96,17
U0E1	$\hat{Y} = p = 33,46 + 26,81 \times (1 - e^{-0,028x(t-3,02)})$	97,57
U7E0	$\hat{Y} = p = 28,39 + 28,76 \times (1 - e^{-0,023x(t-9,21)})$	96,22
U7E05	$\hat{Y} = p = 29,37 + 32,91 \times (1 - e^{-0,019x(t-11,35)})$	94,00
U7E1	$\hat{Y} = p = 29,44 + 29,63 \times (1 - e^{-0,025x(t-6,23)})$	96,81

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas.

$p = a + b(1 - e^{-cx(t-L)})$, em que “p” é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h^{-1}); “t”, tempo de incubação (h) e “L”, tempo de colonização.

Para os componentes da parede celular do bagaço de cana, a fração “b”, o coeficiente “c”, a fração indigestível da fibra “I”, DE a taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h e tempo de colonização da degradabilidade ruminal *in vitro* da FDN não foram alterados, não havendo efeito significativo do uso da uréia e das enzimas ($P > 0,05$) e nem interação entre as mesmas para nenhuma destas variáveis (Tabela 6 e 7).

Tabela 6 - Resultados médios da fração potencialmente degradável (b), taxa de degradação da fração “b” (c) e fração indigestível da fibra (I) da degradabilidade ruminal *in vitro* da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	b (%)		
0	38,97	37,47	38,22A
0,5	39,77	40,30	40,03A
1	39,83	39,17	39,50A
Média	39,52a	38,98a	
			CV (%) = 5,48
	c (%)		
0	0,05	0,04	0,04A
0,5	0,04	0,04	0,04A
1	0,04	0,04	0,04A
Média	0,04a	0,04a	
			CV (%) = 24,35
	I (%)		
0	61,03	62,53	61,78A
0,5	60,23	59,70	59,96A
1	60,16	60,83	60,49A
Média	60,47a	61,02a	
			CV (%) = 3,54

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Degradabilidade efetiva (DE) e tempo de colonização da degradabilidade ruminal *in vitro* da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	DE 2%/h (%)		
0	20,68	19,74	20,21A
0,5	21,50	20,73	21,11A
1	24,09	21,70	22,89A
Média	22,09a	20,72a	
			CV (%) = 10,22
	DE 5%/h (%)		
0	18,64	17,75	18,19A
0,5	19,63	18,36	18,99A
1	22,85	19,62	21,23A
Média	20,37a	18,58a	
			CV (%) = 13,20
	DE 8%/h (%)		
0	16,83	15,96	16,39A
0,5	17,92	16,30	17,11A
1	21,69	17,75	19,72A
Média	18,81a	16,67a	
			CV (%) = 16,40
	Tempo de colonização (h)		
0	3,62	3,55	3,58A
0,5	3,07	4,13	3,60A
1	1,84	3,44	2,64A
Média	2,84a	3,71a	
			CV (%) = 36,41

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Carvalho et al. (2007) verificaram decréscimo na fração indigestível “I”, com valores de 61,34 para 36,07%, e aumentos na fração “b”, de 38,66 para 63,93% com ou sem a adição de 7,5% de uréia. De forma semelhante, a DP e DE (2, 5 e 8%/h) da FDN aumentaram de 38,66 para 63,93% e de 23,20 para 41,88%, de 14,50 para 27,61% e de 10,54 para 20,59%, respectivamente, com a adição de uréia (7,5% MS) ao bagaço de cana. Estes resultados condizem com a maioria dos relatos da literatura de que, em volumosos amonizados, ocorre solubilização parcial da hemicelulose e expansão da parede celular, permitindo desta forma que os microrganismos do rúmen tenham maior superfície específica para se aderirem e, conseqüentemente, aumentar a degradabilidade ruminal do material.

Pires et al. (2004) observaram comportamento semelhante para a FDN residual, para o bagaço de cana-de-açúcar controle e com Na₂S, bem como para o bagaço com NH₃ e NH₃ mais Na₂S. Maiores valores da fração potencialmente degradável “b” e menores valores da fração indigerível “I” foram verificados para o bagaço com NH₃, independentemente do sulfeto de sódio, com valores de 44,03; 41,06; 51,64 e 53,43% para “b”; e 51,56; 49,79; 34,07 e 34,49% para “I”, respectivamente, para o bagaço controle, Na₂S, NH₃ e NH₃ mais Na₂S. Verificou-se, portanto, a eficácia da amônia anidra no aumento da degradabilidade da fibra em detergente neutro para o bagaço de cana-de-açúcar com NH₃, independentemente do sulfeto de sódio.

No presente experimento é demonstrado a não efetividade da reação de amoniólise nas ligações ésteres da parede celular e das enzimas fibrolíticas exógenas sobre a celulose e hemicelulose do bagaço de cana, sendo notado que, para a fração “b” (potencialmente degradável) da degradação da MS e da FDN, as médias foram semelhantes em todos os bagaços de cana, e a fração indigestível “I” da fibra em detergente neutro não sofreu alteração (Tabela 8).

Tabela 8 - Equações ajustadas para a fibra em detergente neutro residual do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	Equações ajustadas	R2
U0E0	$\hat{Y} = 38,97 \times e^{(-0,050x(T-3,62))} + 61,03$	97,34
U0E05	$\hat{Y} = 39,76 \times e^{(-0,039x(T-3,06))} + 60,23$	97,40
U0E1	$\hat{Y} = 39,83 \times e^{(-0,044x(T-1,84))} + 60,16$	97,81
U7E0	$\hat{Y} = 37,47 \times e^{(-0,038x(T-3,55))} + 62,53$	98,40
U7E05	$\hat{Y} = 40,13 \times e^{(-0,038x(T-4,13))} + 59,70$	97,97
U7E1	$\hat{Y} = 39,17 \times e^{(-0,045x(T-3,44))} + 60,83$	98,68

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas.

$\hat{Y} = b \times e^{(-c \times (T-L))} + I$, em que “Y” é o resíduo não degradável no tempo T; “b”, a fração potencialmente degradável da fibra; “c”, a taxa de degradação de b (h^{-1}); “T”, o período de incubação, em horas; “L”, a latência ou tempo de incubação (h); e “I”, a fração indigestível da fibra.

O crescimento microbiano no bagaço de cana com teores mais elevados de CNF foi potencializado pela adição da uréia, resultando em consumo das frações mais solúveis deste volumoso (Tabela 2). O consumo do nitrogênio pelos fungos e leveduras, provavelmente foi responsável pelo decréscimo da reação de amoniólise que, com a redução da concentração de amônia não promoveu as alterações esperadas na parede celular do bagaço. Processo semelhante é observado na ensilagem da cana-de-açúcar, quando ocorre extensa atividade de leveduras, podendo estar presentes na ordem de 10^6 UFC/g de forragem, convertendo os carboidratos solúveis a etanol, CO_2 e água e aumentando os teores de FDA das silagens (Alli et al., 1983).

4 CONCLUSÕES

Para o bagaço de cana-de-açúcar obtido de forma não industrial, com teores mais elevados de carboidratos não fibrosos residuais, para a degradabilidade da matéria seca, a adição única de uréia reduz a fração solúvel “a” e o coeficiente “c”. O uso de enzimas fibrolíticas exógenas nas doses de 0,5 e 1% proporciona aumento nas degradabilidades efetivas e não afeta o tempo de colonização. A combinação de uréia com enzimas fibrolíticas exógenas não altera a degradabilidade da fibra em detergente neutro do bagaço de cana oriundo da fabricação artesanal de aguardente.

REFERÊNCIAS

- ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E. et al. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. *Animal Feed Science and Technology*, v.9, p.291-299, 1983.
- ANKOM TECHNOLOGY - 08/05, *In Vitro* True Digestibility using the DAISY^{II} Incubator [on line], 2010. Disponível em <<http://www.ankom.com>> Acesso em 15 de julho de 2010.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; YANG, W.Z. et al. Enzymes and direct fed microbials in diets dairy cows, 2000. In: PROCEEDINGS OF THE TRISTATE NUTRITION CONFERENCE, 2000. 10 p.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; GARCIA, R. et al. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e da fração fibrosa do bagaço de cana-de-açúcar tratado com uréia. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, p.447-455, 2007.
- FERREIRA, M.A.; SILVA, R.R.; RAMOS, A.O. et al. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com dietas à base de palma forrageira e diferentes volumosos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p.159-165, 2009.
- GESUALDI, A.C.L.S.; SILVA, J.F.C.; VASQUES, H.M. et al. Efeito da amonização sobre a composição, retenção de nitrogênio e a conservação do bagaço e da ponta de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, p.508-517, 2001.
- KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A.T.; STAPLES, C.R. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. *Journal of Animal Science*, v.86, p.882-889, 2008.
- KUNG JR, L.; COHEN, M.A.; RODE, L.M. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2396-2402, 2002.
- MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T. et al. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.1927-1936, 2007.
- McDONALD, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, v.96, p.251-252, 1981.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1437-1446, 1980.
- MILLER, G.H. Use a dinitro-salicílico acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-429, 1959.
- MIRANDA, R.L.A.; COBOS, M.A.P.; MENDOZA, M.G.D. et al. Degradación *in vitro* de rastrojo de maíz con cultivos mixtos de bacterias ruminales. *Agrociência*, v.33, p.133-139. 1999.
- NUNES, C.S.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para determinação de fibra. In:

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Anais...Goiânia, 2005. CD-ROM.

PAIVA, J.A.J.; GARCIA, R.; QUEIROZ, A.C. et al. Efeito dos níveis de amônia anidra e períodos de amonização sobre a degradabilidade da matéria seca e de constituintes da parede celular da palhada de milho (*Zea mays L.*). Revista Brasileira de Zootecnia, v.24, p.693-705, 1995.

PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. Revista Brasileira de Zootecnia, v.33, p.1071-1077, 2004.

SARMENTO, P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. et al. Grãos de soja como fonte de urease na amonização do bagaço de cana-de-açúcar com uréia. Scientia Agricola, v.58, p.223-227, 2001.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. User's guide statistics: version 8.0 edition. Cary, 1999. 956p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: UFV, 2005. 235p.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, v.70, p.3562-3577, 1992.

SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E.M.; MOWAT, D.N. Mejora del valor nutritivo de la paja mediante tratamiento con amoníaco. Revista Mundial de Zootecnia, v.26, p.13-21, 1978.

TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L. et al. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. Journal of Animal Science, v.86, p.1164-1172, 2008.

YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N. et al. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Agricultural and Biological Chemistry, v.45, p.579-586, 1981.